

# PREPARACION DE CULTIVOS INICIADORES HOMOLACTICOS PARA SER UTILIZADOS EN LA FERMENTACION DE PRODUCTOS CARNICOS

## Homolactic starter culture preparation to be used in Fermented Meat Products

Alice Duarte de Sutherland  
Enrique Márquez Salas  
Alexis Ferrer  
Gisela Páez de Fernández

Unidad de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

### RESUMEN

Diferentes salchichones comerciales fueron utilizados para aislar y caracterizar las bacterias lácticas presentes en ellos, medir la eficiencia fermentativa de estas bacterias frente a diferentes azúcares, y a diferentes temperaturas y, finalmente, preparar un cultivo mixto para ser utilizado en la elaboración de un producto cárnico fermentado. La eficiencia del cultivo preparado en el laboratorio (L) se comparó con la eficiencia de un cultivo importado (I). Para esto se formularon y prepararon productos conforme al procedimiento utilizado por la industria. Se comparó la velocidad de caída del pH, la pérdida de peso durante todo el proceso y la calidad microbiológica de los productos finales.

Especies de Lactobacilos tales como *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* y *L. viridescens* fueron aislados de los diferentes salchichones comerciales. Los lactobacilos homofermentativos aislados fermentaron indistintamente la glucosa y la sacarosa y fueron más eficientes a 37° C que a 25° C. El cultivo L fue tan eficiente como el cultivo I en bajar el pH de los productos hasta un valor deseable (4.9 para el L y 5.1 para el I) durante los primeros cinco días. Ambos cultivos originaron una pérdida rápida de peso durante los primeros seis días y luego una pérdida lenta del séptimo al veintavo día, hasta obtener valores finales al cabo de 28 días para el tratamiento L de 30.2% y para I de 29.4%. Los dos productos cumplieron los requisitos microbiológicos establecidos por COVENIN.

**Palabras claves:** Cultivos iniciadores, lactobacilos, fermentación, productos cárnicos.

### ABSTRACT

Different commercial fermented meat products were used to isolate and characterized lactic acid bacteria, evaluate their efficiency against different sugars and temperatures and finally, prepare a culture to be utilized on the manufacture of a fermented meat product. The efficiency of the culture prepared in the lab (L) was compared with the efficiency of an imported starter culture (I). Products were formulated and prepared resembling the industry technique. Rate of pH decline, weight loss and microbiological quality were compared among products.

*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus*, and *L. viridescens* species of lactobacilli; were isolated from the different fermented commercial meat products. Isolated lactobacilli fermented both glucosa and saccharose and were more efficient at 35° C than at 25° C. The (L) culture was as efficient as the (I) culture to decrease pH of the products down to a desirable value (4.9 to L and 5.1 to I) during the first five days. Both cultures (L and I) produced a higher weight loss during the first six days, then weight loss rate slowed down until had final values of 30.2% to L and 29.4% to I at 28 days of processing. Both products met the microbiology requirements established by COVENIN.

**Key words:** Starter culture, lactobacillus, fermentation, meat products.

### INTRODUCCION

Las fermentaciones cárnicas constituyen uno de los métodos de preservación utilizados por la industria. Estas fermentaciones se caracterizan por modificaciones químicas de la materia prima y por el hecho de que los agentes

conservadores se forman en el seno del producto, gracias a la acción de microorganismos cuya principal función es transformar los azúcares en ácido láctico. La presencia de ácido láctico contribuye a darle el sabor característico de estos productos y produce una caída del pH originándose desnaturalización y pérdida de agua de hidratación de las proteínas, lo que trae como consecuencia una baja de la actividad del agua en el producto final<sup>[11,13,14,15]</sup>.

La técnica clásica de fermentación consiste en mantener carnes saladas durante cierto tiempo a temperaturas reguladas, que permitan el crecimiento de microorganismos lácticos homofermentativos que se encuentran como flora natural de las carnes. La técnica moderna consiste en el agregado de cultivos iniciadores a las carnes saladas en una proporción de  $10^8$  bacterias/gr de carne, asegurando de esta manera el característico sabor, olor y textura de estos productos y disminuyendo los riesgos de contaminación<sup>[4,6,22]</sup>. El cultivo iniciador consiste en una mezcla de bacterias lácticas principalmente pediococos y lactobacilos<sup>[20]</sup>.

En la actualidad, la industria venezolana importa estos cultivos, lo cual encarece los costos de producción, de allí que el objetivo de este trabajo fue el de estudiar la factibilidad de producir estos cultivos en el laboratorio para luego comparar su efectividad frente a cultivos importados.

## MATERIALES Y METODOS

Se seleccionaron tres tipos de salchichones comerciales para aislar y caracterizar las bacterias lácticas presentes. Se determinó el pH a cada producto comercial, utilizando un potenciómetro-Metron y la humedad de acuerdo al método de la AOAC<sup>[2]</sup>. Se procedió a aislar las bacterias lácticas utilizando caldo y agar MRS, siguiendo las técnicas establecidas en el APHA<sup>[3]</sup> para este tipo de producto. Seguidamente se le practicó a las colonias aisladas, extendido y coloración de gram y se caracterizaron de acuerdo al manual de Bergey's<sup>[21]</sup>. La prueba de homofermentación se realizó utilizando el método de Gibson modificado por Stamer y col.<sup>[22]</sup>.

Una vez conocidos los tipos de microorganismos presentes, se procedió a preparar cultivos de los mismos en una proporción de  $10^9$  bacteria/ml, utilizando medio MRS como caldo nutritivo.

### Determinación de la eficiencia del cultivo

#### 1. A diferentes temperaturas

Se midió la eficiencia del cultivo iniciador durante la etapa de fermentación a dos temperaturas (25 y 35° C). La eficiencia se relacionó con la caída del pH en el producto.

#### 2. Con diferentes azúcares

A nivel del laboratorio se formuló y se prepararon

productos cárnicos para medir la eficiencia del cultivo iniciador frente a dos azúcares (glucosa y sacarosa).

## Formulación y elaboración de los productos

La formulación de los productos se realizó conforme al procedimiento de la industria (TABLA I). A partir del cultivo iniciador se hicieron diluciones de  $10^8$  bacterias/g de carne y se agregó a las mezclas, el resto del proceso se realizó conforme a la industria. Se hizo un seguimiento de la caída del pH durante los primeros cinco días y de la pérdida de peso durante todo el proceso.

TABLA I

### FORMULACION DE LOS PRODUCTOS CARNICOS

Formulaciones	Productos cárnicos	
	A	B
Carne de res	50%	50%
Tocino	21%	21%
Sal	3%	3%
Azúcar	1.2%	1.2%
Pimienta	0.5%	0.5%
Eritorbato	0.001%	0.001%
Nitrato	0.005%	0.005%
Bacterias lácticas	$10^8/g$	$10^8/g$
Temperatura de fermentación	23°C	23°C
Temperatura interna	20°C	20°C

### Análisis microbiológico

Al producto cárnico listo para el consumo, se le practicó análisis microbiológico.

El análisis microbiológico se realizó atendiendo a las exigencias de las normas COVENIN para este tipo de producto.

Se realizaron determinaciones de estafilococos coagulasa positiva de acuerdo a norma COVENIN, N° 1292-79<sup>[7]</sup>.

Coliformes totales y fecales por el método del número más probable (NMP), norma COVENIN, N° 1104-84<sup>[9]</sup>.

Pruebas para detectar Salmonella norma COVENIN, N° 1291-79<sup>[8]</sup>, utilizando el medio de Rappaport - Vassiliadis modificado, cuya modificación consistió en bajar a un tercio la cantidad de verde de malaquita, y se cambió la temperatura de incubación de 37° C a 43° C y la proporción en que se usó el inóculo fue 0,2 ml para 20 ml de medio.

### Análisis estadístico

Los datos obtenidos en este estudio fueron analizados utilizando el sistema SAS PROC GLM<sup>[19]</sup>.

Las características de los productos comerciales se compararon utilizando análisis de varianza. El diseño

MRS = De Man, Rogosa, Sharpe.

APHA = American Public Health Association.

COVENIN = Comisión Venezolana Normas Industriales.

NMP = Número más probable.

estadístico para evaluar la eficiencia de los lactobacilos consistió en un análisis factorial 2 x 4. Los factores fueron: temperatura a dos niveles (25 y 35° C), y tiempo a cuatro niveles (0, 6, 12 y 24 hr). La prueba de Duncan<sup>[12]</sup> fue utilizada para detectar diferencias entre las medias. Los productos elaborados con los diferentes cultivos iniciadores (I = Industria; L = Laboratorio) se compararon utilizando pruebas de "t" de Student. Diferencias entre medias fueron declaradas al 5% de probabilidad.

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la TABLA II se puede observar el porcentaje de humedad, pH y bacterias lácticas encontradas en tres tipos de salchichones comerciales A. Crespone, B. Milano y C. Napole.

Se encontraron diferencias ( $P < 0.05$ ) en el contenido de humedad de los diferentes salchichones. En todos los casos, el porcentaje de humedad se encuentra dentro de los valores normales exigidos por COVENIN, el cual permite un máximo de 37%.

En cuanto a pH se refiere, se puede notar que están entre 5.0 y 5.26 sin encontrarse diferencias significativas.

Con respecto a las bacterias lácticas aisladas de los salchichones comerciales, se puede notar que en todos los tratamientos (A, B y C) se aislaron *Lactobacilos vividescens*, *Lactobacilos fermentum*, *Lactobacilos plantarum* y *Lactobacilos acidophilus* combinados en número de dos (diferentes especies de lactobacilos), además de la presencia de cocos gran positivos.

Los cultivos preparados en el laboratorio fermentaron con igual eficiencia la sacarosa (pH final 4.9) y la glucosa (pH final 4.8) (TABLA III). Nuestros resultados concuerdan con los de Acton y col.<sup>[11]</sup>, lo que permite sugerir la

TABLA II

### HUMEDAD, pH Y BACTERIAS LACTICAS ENCONTRADAS EN ALGUNOS SALCHICHONES COMERCIALES

Salchichón Comercial*	Humedad, %		pH		Bacterias Lácticas
A	25.0	3.35	5.26	0.12	L. vividescens
					L. fermentum
					L. plantarum
B	31.2	2.42	5.05	0.15	L. Acidophilus
					I. Plantarum
					L. vividescens
C	34.7	1.12	5.15	0.25	L. fermentum
					L. acidophilus
					L. vividescens

\* Los salchichones comerciales fueron los siguientes:  
A = Crespone, B = Milano, C = Napole.

TABLA III

### VALORES PROMEDIOS DEL pH DEBIDO A LOS DIFERENTES AZUCARES

Características	TRATAMIENTOS	
	Sacarosa	Glucosa
pH inicial	5.7	5.7
pH final <sup>a</sup>	4.9 <sup>b</sup>	4.8 <sup>b</sup>

a El pH final se midió a 35° C a las 24 h.

b Medias en una misma fila y un mismo tratamiento que tengan diferentes superíndice, difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

utilización de la sacarosa en sustitución de la glucosa, ya que la primera es más económica y fácil de conseguir.

Los resultados de la eficiencia en la caída del pH a dos temperaturas de fermentación (25° y 35° C) se presentan en la Fig. 1.

La gráfica muestra que a 35° C se consigue una caída más rápida del pH, observándose que a las 6 hr ya se había logrado un pH igual al observado a 25° C durante 24 hr. Estos resultados sugieren la posibilidad de iniciar el proceso de fermentación a 37° C durante las primeras 6 hr y luego bajar la temperatura para continuar con el proceso normal. A pesar de que a 37° C se observó mayor eficiencia, es importante mencionar que a ambas temperaturas el cultivo preparado en el laboratorio muestra una gran eficiencia en bajar el pH. Esto es explicable debido a que las temperaturas óptimas de crecimiento de estos microorganismos están en el rango de 20 a 37° C<sup>[3,4]</sup>.

Debido a su mayor resistencia, cepas de *pediococcus* se prefieren cuando la fermentación se realiza a altas temperaturas, mientras que los lactobacilos se prefieren cuando se utilizan bajas temperaturas.

La Fig. 2, muestra la baja de pH en los productos durante los primeros cinco días del proceso, debido a la acción de cultivos importados utilizados por la industria y cultivos desarrollados en el laboratorio. Se observó un descenso más pronunciado en el pH de los productos fermentados con cultivos elaborados en el laboratorio; sin embargo, las diferencias no fueron significativas. A los cinco días de fermentación el pH de los productos (I) fue de 5.1, mientras que el pH de los productos (L) fue de (4.9). Tales resultados en el pH se consideran deseables para la calidad del producto final.

El pH, es el parámetro más importante con el fin de monitorear la etapa de fermentación en los embutidos, a la vez que determina el tiempo de duración de la misma. En la práctica el rango de pH de embutidos oscila entre 4.7 y 5.4<sup>[16,17]</sup>.

La explicación del descenso más pronunciado al utilizar los cultivos desarrollados en el laboratorio, pudiera explicarse debido a que en este cultivo las bacterias lácticas se agregan reconstituidas y en periodos de 24 hr de crecimiento; por el contrario, los cultivos importados se añaden en polvo sin ser previamente reconstituidos, lo que trae como consecuencia la disminución en número de

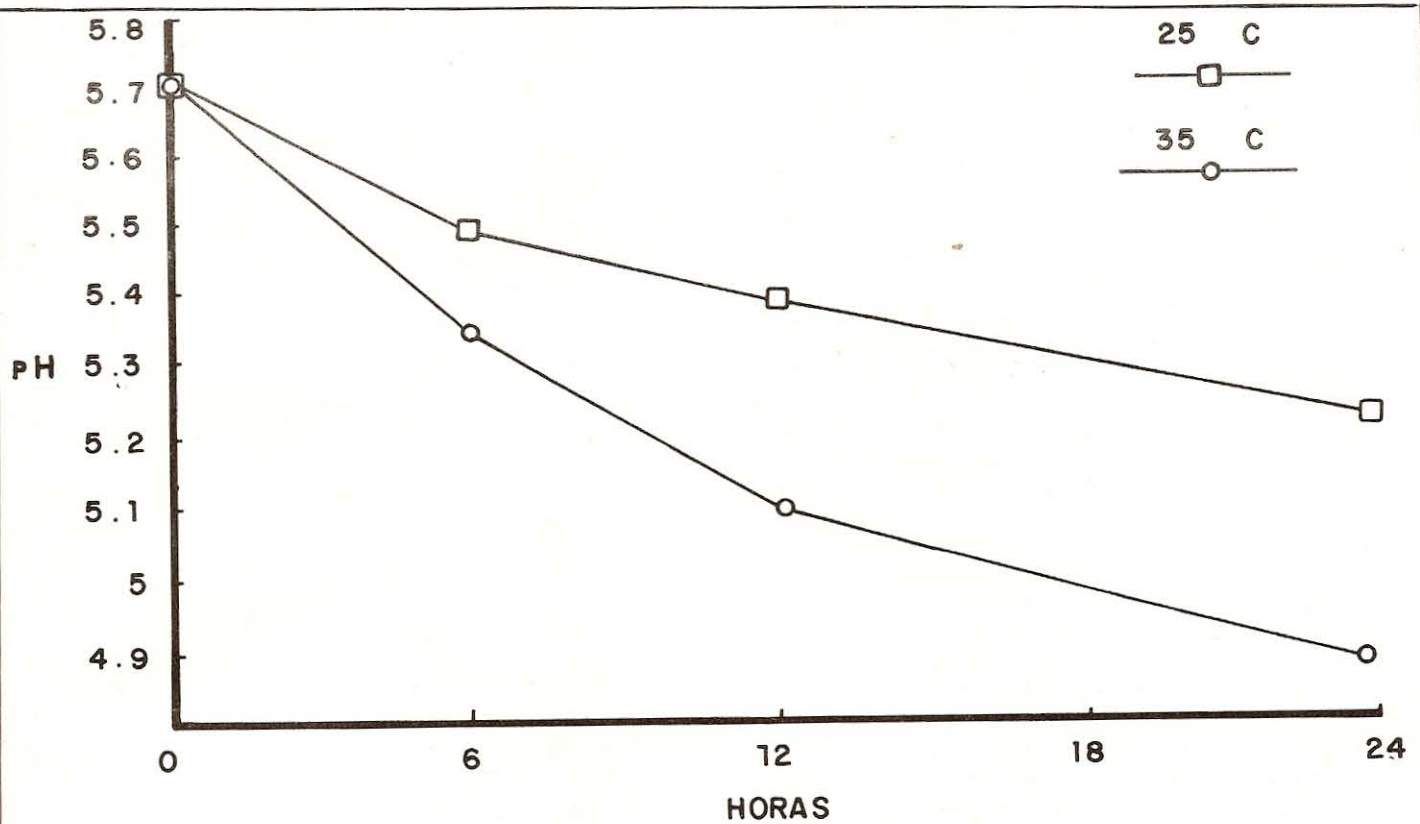


FIG. 1. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CAIDA DEL PH

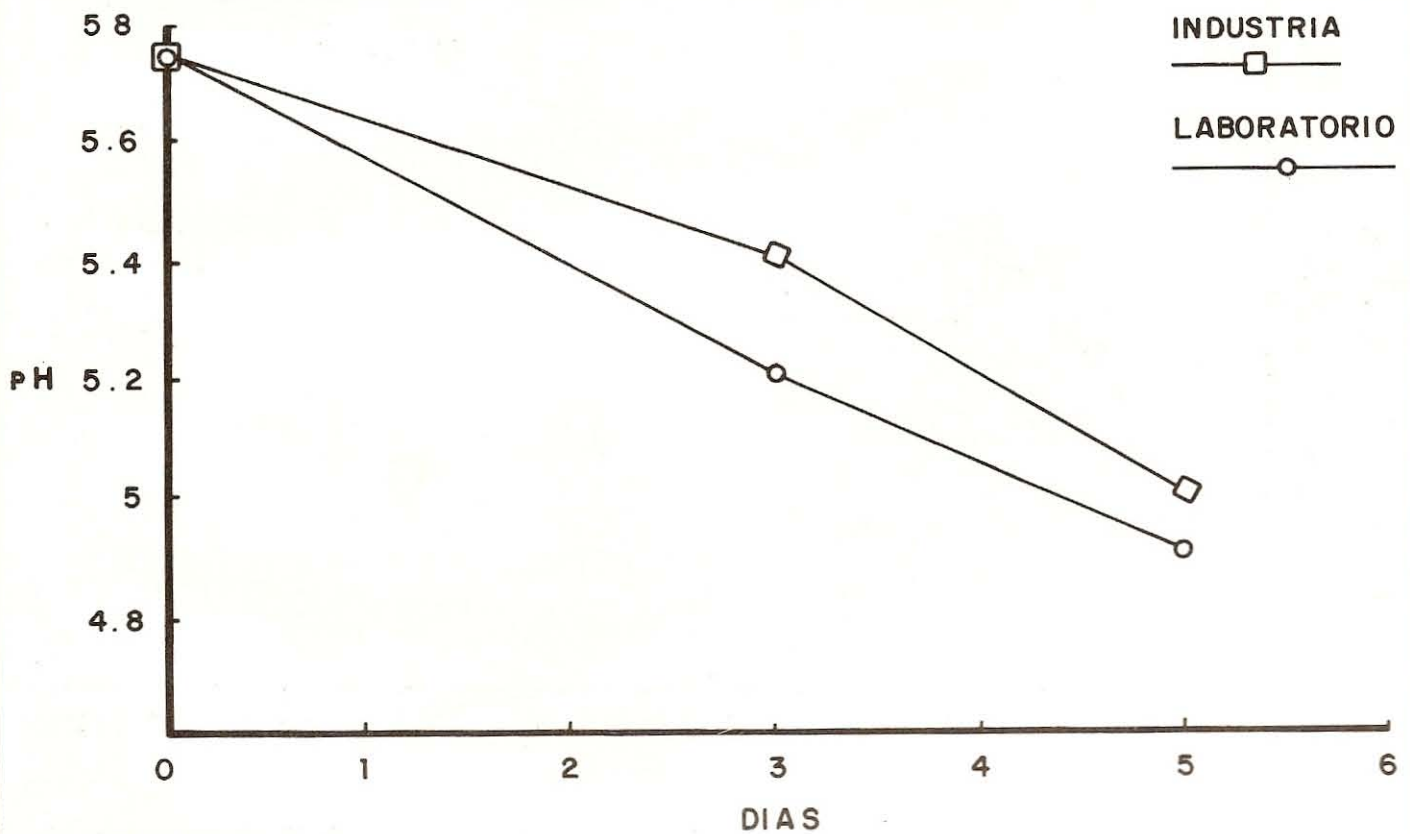


FIG. 2. CAIDA DEL PH DURANTE LOS PRIMEROS CINCO DIAS DE MADURACION

bacterias ácido lácticas. Así generalmente se aplican en la industria.

La adición de bacterias lácticas en el orden de  $10^7$  a  $10^9$  por gramo de carne produce una baja del pH a 5.3 o menos y ésta es una forma de obtener un margen de seguridad en el producto, lo que se traduce en un aumento de vida útil del mismo<sup>[5,6]</sup>.

En la Fig. 3, se observa el porcentaje de pérdida de peso, durante la fermentación, maduración y secado de los productos (L) y productos (I).

El comportamiento observado en la gráfica en ambos tratamientos es similar, notándose que en los primeros seis días es cuando se produce la mayor pérdida de peso (17.8%) para el tratamiento (I) y (18.8%) para el tratamiento (L). Luego se nota una pérdida de peso lenta del séptimo al veinteavo día, obteniéndose valores finales al cabo de 28 a 30 días, en el tratamiento (L) de (30.2%) y en el (I) de (29.4%).

La mayor pérdida de peso observada en los primeros seis días se relaciona con la caída del pH producida durante los primeros cinco días. Al bajar el pH las proteínas miofibrilares se desnaturalizan y pierden su capacidad de retención de agua. Es importante mencionar, que durante los primeros días de fermentación es cuando se utilizan las mayores temperaturas que combinadas con el bajo pH pudieran explicar esta mayor pérdida de peso en estos primeros días.

La TABLA IV presenta los promedios de coliformes

fecales, estafilococos coagulasa positiva y salmonella de los salchichones, preparados utilizando cultivo importado (I) y cultivo preparados en el laboratorio (L). El análisis estadístico aplicado a las medias demuestra que no existen diferencias significativas entre los dos tratamientos.

Los valores observados en cuanto a coliformes fecales son normales de acuerdo a los requisitos microbiológicos, establecidos en las normas COVENIN<sup>[7]</sup>, para

TABLA IV

**VALORES PROMEDIOS DE COLIFORMES FECALES, ESTAFILOCOCOS Y SALMONELLA ENCONTRADOS EN LOS PRODUCTOS FINALES**

Características	CULTIVO INICIADOR <sup>a</sup>	
	I	L
Coliformes fecales	42.98 <sup>b</sup>	43.20 <sup>b</sup>
Estafilococos	866.66 <sup>b</sup>	800.34 <sup>b</sup>
Salmonella	—	—

a Los cultivos iniciadores fueron de la siguiente manera: = importados por la industria; L = preparados en el laboratorio.

b Medias en una misma fila y un mismo tratamiento que tengan diferentes superíndices, difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

c Ausencia en 25 g de muestra.

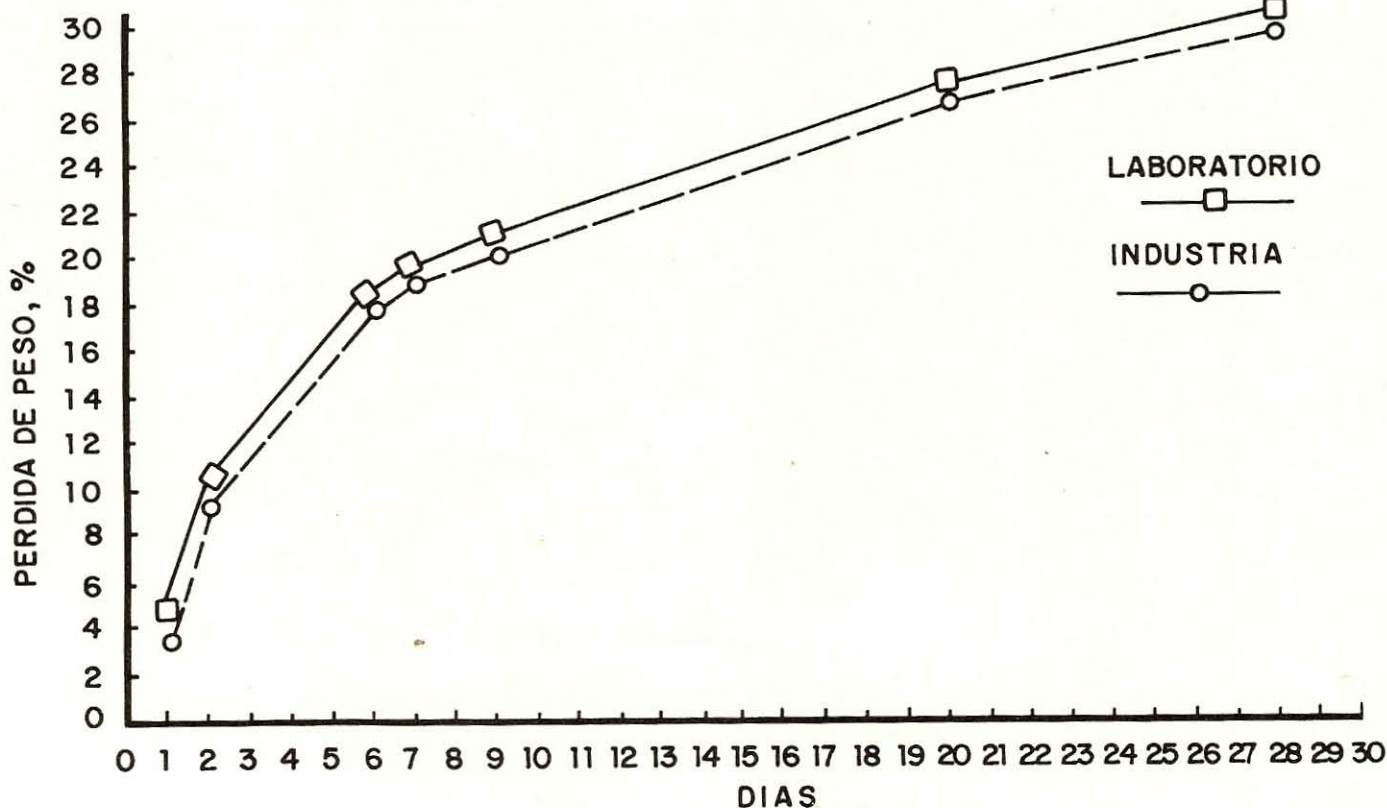


FIG. 3. PERDIDA DE PESO DURANTE EL PROCESO DE MADURACION Y SECADO

productos cárnicos que permite por cada 5 muestras, que sólo 2 de ellas estén dentro de los límites de 4 a 43 coliformes fecales, utilizando el método de NMP en serie de tres tubos. Estos valores a pesar de estar dentro del rango normal, se encuentran dentro de los límites superiores normales, por lo que nos indica la posibilidad muy cercana, de daños en el producto, más aún si las condiciones ambientales en las cuales se encuentra el mismo no son las óptimas.

En referencia a los valores de estafilococos observados en los productos finales podemos expresar que al igual que los coliformes fecales, están dentro de los límites superiores normales, establecidos en COVENIN<sup>[6]</sup> que indica que de 5 muestras, sólo 2 de ellas pueden tener entre 100 y 1.000 estafilococos. En el tratamiento (I) los resultados obtenidos fueron de (866.66) y en el tratamiento (L) de (800.34).

Diferentes investigadores han sugerido la utilización de cultivos iniciadores para reducir las posibilidades de contaminación con microorganismos patógenos<sup>[10,18]</sup>.

## CONCLUSION

Los resultados de este trabajo demuestran la factibilidad de preparar cultivos iniciadores que puedan ser utilizados por la industria para fermentar carnes. Sin embargo, entre las limitantes que se encontraron está el hecho de que estas cepas de lactobacilos exigen para su crecimiento medios nutritivos muy selectivos que contengan todos los aminoácidos esenciales. Como estos medios son importados, se encarecen los costos de producción del cultivo, por lo que hemos iniciado en nuestro laboratorio, investigaciones tendientes a formular medios de cultivos que permitan el crecimiento de lactobacilos a bajos costos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Acton, J., Dick, R. and Norris, R. Utilization of various carbohydrates in fermented sausage. *J. Food Sci.* 42:174. 1977.
- [2] AOAC. Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Twelfth edition. Washington. 1980.
- [3] APHA. Compendium of methods for the Microbiological examination of Foods. Ed. Marvin L. Speck. Washington D.C. 1976.
- [4] Arias de M., B., Márquez, E. y Gómez, E. Diferentes técnicas de fermentación en la elaboración de productos cárnicos fermentados. *Revista Científica. Fac. Veterinaria. LUZ.* Vol. II N° 1 p. 37. 1992.
- [5] Bacus, J. Utilization of Microorganisms in Meat Processing. *Food Technol.* 38:6. 1984.
- [6] Bacus, J. and Brown, W. Use of Microbial cultures: meat products. *Food Technol.* 1:74. 1981.
- [7] COVENIN. Norma Estafilococos coagulasa positiva N° 1292. 1979.
- [8] COVENIN. Norma Salmonella N° 1291-79. 1979.
- [9] COVENIN. Norma Coliformes totales y Coliformes fecales. N° 1104-84. 1984.
- [10] Coventry, J. & Hickey, M. Growth. Characteristics of Meat Starter Cultures. *Meat Sci.* 30:41. 1991.
- [11] Deibel, R. Technology of fermented, semidried and dried sausages, In Proceedings of the meat Industry Research Conference 57. American Meat Institute Foundation. Chicago, ILL. 1974.
- [12] Duncan, D. B. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* 11: 1.1955.
- [13] Everson, C. Use of starter cultures in sausage products. In Proceedings thirteenth Annual Meat Science Institute ed. Carpenter, J. and Brown, D. 11 National Independent Meat Packers Association and the University of Georgia. Athens, Georgia. 1971.
- [14] Everson, C., Danner, W. and Hammes, P. Bacterial starter cultures in sausage products. *J. Agr. Food Chem.* 18:570. 1970.
- [15] Komarick, S., Tresler, D. and Long, L. Dry and semidry sausages. In Food Products, Formulary, Meats, Poultry, Fish, Shell-Fish. *J. Food Sci.* 43:89. 1974.
- [16] Kramlich, W. Sausage products. In the Science of Meat and Meat Products. Ed. Price, J.F. and Schwegert, B., 2nd ed., p. 484. Freeman and Co., San Francisco. 1971.
- [17] Kramlich, W., Pearson, A. and Tauber, F. Sausage formulation. In "Processed Meats", p. 190. Avi Publishing Co., Westport, Conn. 1973.
- [18] Masters, B., Oblinger, J.L. and Goodfellow, J.N. Fate *Salmonella newport* and *Salmonella typhimurium* inoculated into summer sausage. *J. Food Protect.* 44:527. 1981.
- [19] SAS PROC. GLM. SAS User's Guide: Statistics (5th Ed.). SAS Institute Inc., Carry, N.C. 1985.
- [20] Smith, J. and Palumbo, S. Use of starter culture in meats. *J. of Food Protect.* 46:997. 1983.
- [21] Sneath, P.H., Mair, N.S. and Sharpe, M.E. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. William & Wilking Co., Baltimore. 1986.
- [22] Stamer, J. The Lactic Acid Bacteria: Microbes of Diversity *Food Technologist. Food Technol.* 18:60. 1979.