

INFORME TÉCNICO SEGUIMIENTO

PROGRAMA ASTURIAS

DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE I+D+i			
Referencia del Proyecto	IDI/2016/000205		
Acrónimo	MEATMETAGEN		
Título del Proyecto	Caracterización y optimización de los procesos tecnológicos en el embutido asturiano mediante el uso de la Metagenómica y selección de su microbiota		
Periodo de Justificación	Desde :	01/01/2016	Hasta: 31/12/2017

En Noreña , a 28 de febrero de 2018

1. MEMORIA TÉCNICA

Hito 1. Caracterización microbiológica del Chorizo Asturiano

Tarea 1.1. Determinación cuantitativa de las principales comunidades bacterianas

Actualmente existe una Marca Colectiva bajo la denominación de Chorizo Asturiano, regida por la ley de patentes y marcas. Dicha Marca Colectiva constituye un signo utilizado por la pluralidad de las empresas bajo el control y autorización de su titular, que certifica que los productos o servicios a los que se aplica cumplen unos requisitos comunes, en especial en lo que concierne a su calidad, componentes, origen geográfico y condiciones técnicas de elaboración del producto. Los requisitos de la misma vienen contemplados en el Reglamento de uso de la marca.

El Chorizo Asturiano viene definido en el reglamento como producto cárnico elaborado con mezcla de carnes picadas o troceadas de cerdo y/o vacuno, adicionada de sal, pimentón y otras especias, amasada y embutida que ha sufrido un proceso de maduración y/o desecación con ahumado natural.

A día de hoy son 24 las empresas pertenecientes a la Marca Colectiva Chorizo Asturiano, todas ellas industrias cárnicas establecidas en el Principado de Asturias.

Con el fin de tener una visión global de la microbiota característica del Chorizo Asturiano se hizo un muestreo en cada una de las empresas pertenecientes a la Marca Colectiva, seleccionando su producto más característico y/o representativo. Se seleccionaron finalmente un total de 3 lotes de cada uno de los fabricantes, tratando de que dichas muestras representaran la mayor variedad posible atendiendo a parámetros tales como la estacionalidad o los proveedores de materia prima, principalmente.

Para el procesado de las muestras y la realización de los ensayos microbiológicos se empleó lo descrito en la norma ISO 6887-1; Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para el examen microbiológico y la norma ISO 6887-2; Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico, parte 2, reglas específicas para la preparación de carnes y productos cárnicos.

Para realizar la caracterización de la ecología microbiana del Chorizo Asturiano se llevó a cabo una determinación cuantitativa de las principales comunidades bacterianas que podrían estar presentes en el producto. La ecología microbiana global del producto será de relevancia fundamental en los procesos tecnológicos que tienen lugar en el mismo, no sólo por aquellos microorganismos fermentadores que estén presentes, si no por las complejas interacciones que se producen entre los distintos grupos microbianos y que forman parte de su ecología.

Las técnicas empleadas, en el desarrollo de esta primera tarea fueron el cultivo de microorganismos o lo que se conoce como técnicas de microbiología clásica. Estas técnicas han sido tradicionalmente empleadas para la determinación cualitativa y cuantitativa de microorganismos. Además de permitir la determinación cuantitativa de los grupos de interés, es una primera forma de selección de la variabilidad microbiana presente atendiendo a sus características morfológicas o lo que es lo mismo, su expresión fenotípica en el cultivo en placa.

La obtención de cultivos microbianos en la superficie de un medio de cultivo permite el aislamiento y selección de los microorganismos, obtención de cultivos puros y la realización de las tareas de identificación tanto desde un punto de vista bioquímico como genético, que están planteadas a lo largo del desarrollo del proyecto. Además, la obtención de microorganismos en placa supone la confirmación de que se trata de microorganismos cultivables por las técnicas *in vitro* empleadas para el cultivo microbiano, ya que en matrices complejas con una ecología microbiana diversa, como puede ser el Chorizo Asturiano, pueden existir muchos microorganismos que sean viables, pero no cultivables. Si eso no fuera así, esos microorganismos no podrían ser usados posteriormente como cultivos iniciadores.

Con el fin además de llevar a cabo una segmentación adecuada de las muestras se realizó una clasificación en base a las características de cada uno de los fabricantes:

- **Zona geográfica de producción:** Centro, Oriente, Occidente y Sur de Asturias.
- **Tipo de producción:** Producción Industrial y Producción artesanal.

Se determinaron diferentes grupos bacterianos para tener una visión global de la biodiversidad de las muestras analizadas:

- **Aerobios mesófilos**, permiten tener una visión global de la carga microbiana de un producto, incluyendo microbiota tanto beneficiosa, como alterante. Para su determinación se empleó la metodología descrita en la UNE-EN ISO 4833-2:2014 Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos.
- **Enterobacterias y Enterococos** permiten conocer el estado higiénico sanitario de las muestras. Para la determinación de Enterobacterias se empleó la metodología descrita en la UNE-EN ISO 21428-2:2004 Método horizontal para la detección y recuento de Enterobacterias. Parte 2: Técnica de recuento en placa. Para el recuento de Enterococos se empleó un procedimiento interno basado en técnicas clásicas de cultivo empleando el medio Slanetz Bartley.
- **Psicrotróficos**, son microorganismos con un óptimo de temperatura de crecimiento más baja y cuya temperatura mínima de proliferación está entre $-5/+5$ ° C. Para la determinación se empleó el mismo método que para la determinación de aerobios mesófilos, pero los cultivos fueron incubados a 5 °C.
- **Levaduras**, determinadas según la Norma ISO 21527-2:2008, Método horizontal para el recuento de mohos y levaduras. Los mohos en la superficie del embutido son un signo de alteración de los alimentos. Las levaduras presentes en el embutido podrían tener algún efecto tecnológico sobre el proceso fermentativo, que será evaluado con el global de resultados del proyecto MEATMETAGEN.
- **Bacterias ácido lácticas (BAL)**, según la Norma ISO 15214:1998, Método horizontal para el recuento de bacterias ácido lácticas mesófilas. Técnica de recuento en placa a 30 °C. Es el grupo microbiano responsable de los procesos fermentativos en el embutido.
- **Cocos Gram + Catalasa + (CG+C+)**, para su determinación se empleó un procedimiento interno basado en técnicas de cultivo clásicas, empleando el medio Sal manitol. En muchos embutidos crudo-curados son responsables de algunas de sus características organolépticas.

Los resultados medios obtenidos (media obtenida del análisis de tres lotes diferentes de cada uno de los fabricantes) se muestran en la tabla a continuación, en todos los casos expresados en ufc/g:

Zona geográfica	A.mesófilos	Enterobacterias	Enterococos	Psicrotróficos	Levaduras	BAL	Staphylococos
Occidente	2,38E+10	4,85E+02	<100	3,04E+09	2,87E+04	1,03E+09	3,67E+04
Oriente	7,21E+08	5,77E+02	<100	4,97E+08	1,16E+03	6,17E+08	5,66E+04
Sur	2,70E+10	1,20E+02	<100	6,80E+08	<10	1,05E+10	<10
Centro	3,42E+09	2,38E+04	<100	4,69E+08	1,82E+04	1,26E+09	1,02E+06

Tabla 1.- Resumen de los datos microbiológicos medios obtenidos para los diferentes fabricantes de la Marca Colectiva Chorizo Asturiano.

Con las determinaciones llevadas a cabo se logró obtener una visión global de los grupos microbianos predominantes en el Chorizo Asturiano.

En resumen, los resultados fueron:

- Las bacterias aerobias mesófilas totales se enumeraron con el fin de tener una idea general acerca de la carga microbiana presente en las muestras. En el contenido de Aerobios mesófilos se encontró una elevada variabilidad entre las muestras, los niveles van desde 8 log ufc/g hasta 10 log ufc/g, resultados habituales en los productos fermentados.
- Las Enterobacterias se determinaron para valorar el nivel de contaminación a lo largo de la maduración. En el caso de la determinación de Enterobacterias, la variabilidad de los resultados es elevada ya que va desde muestras en las que los resultados están por debajo del límite de detección de la técnica analítica, 10 ufc/g, hasta un resultado de 5 log ufc/g.
- No se detectó en ninguno de los casos presencia de Enterococos, todas las muestras evaluadas se encuentran por debajo del límite de detección de 100 ufc/g.
- El contenido en Levaduras también ofrece una elevada variabilidad, hay muestras por debajo del límite de detección de la técnica analítica, 10 ufc/g, alcanzando de media en otra de las muestras de los fabricantes analizados 5 log ufc/g. Se esperan obtener datos más concluyentes en las tareas de evaluación del proceso fermentativo planteadas en las siguientes tareas a desarrollar en el proyecto MEATMETAGEN (estudios de Metagenómica).
- El recuento de bacterias ácido lácticas muestra un resultado (salvo en uno de los fabricantes) de valores por encima de 7 log ufc/g, siendo éstos los microorganismos responsables de los procesos fermentativos que tienen lugar en el Chorizo Asturiano.
- En cuanto a los Cocos Gram positivos Catalasa positivos, comentar que se consideran responsables de los procesos tecnológicos relacionados con las características organolépticas y que tienen lugar en los embutidos, principalmente debido a su actividad lipolítica y proteolítica. En este sentido hay muestras en las que el contenido en CG+C+ el resultado obtenido está por debajo del límite de detección de 100 ufc/g, así en estos casos este grupo bacteriano no parece tener importancia tecnológica en el proceso de estas muestras, mientras en otras muestras, la concentración final en el producto estabilizado es bastante elevada.

Tarea 1.2. Determinación cualitativa de los microorganismos con interés tecnológico

Dentro de todos los microorganismos determinados y presentes en el Chorizo Asturiano hay dos grupos tecnológicos de interés:

- **Bacterias ácido lácticas (BAL)**, responsables de los procesos fermentativos.
- **Cocos Gram + Catalasa + (CG+C+)**, responsables de algunas de las características organolépticas que se desarrollan en los embutidos crudo-curados y derivadas de su actividad lipolítica y proteolítica.

Para la determinación y asilamiento de ambos grupos de microorganismos se emplearon las técnicas de microbiología clásica:

- **Determinación de BAL**, mediante la Norma ISO 15214:1998, con el empleo del medio de cultivo MRS.
- **Determinación de CG+C+**, mediante protocolo interno, empleando el medio de cultivo Sal Manitol.

A partir de los cultivos obtenidos se seleccionaron 5 colonias de cada uno de los fabricantes, de la mayor dilución con crecimiento y en base a aquellos microorganismos más abundantes en función de su morfología y el azar.

Con cada una de las colonias seleccionadas se prepararon cultivos puros en medio MRS en el caso de las BAL y en medio Sal Manitol en el caso de los CG+C+.

Tras la incubación de cada uno de los aislados se procedió a su caracterización fenotípica mediante morfología de cultivo, tinción Gram, prueba de la oxidasa y prueba de la catalasa.

Cada cepa fue codificada con un código interno del laboratorio con el fin de guardar su trazabilidad y para las tareas de conservación.

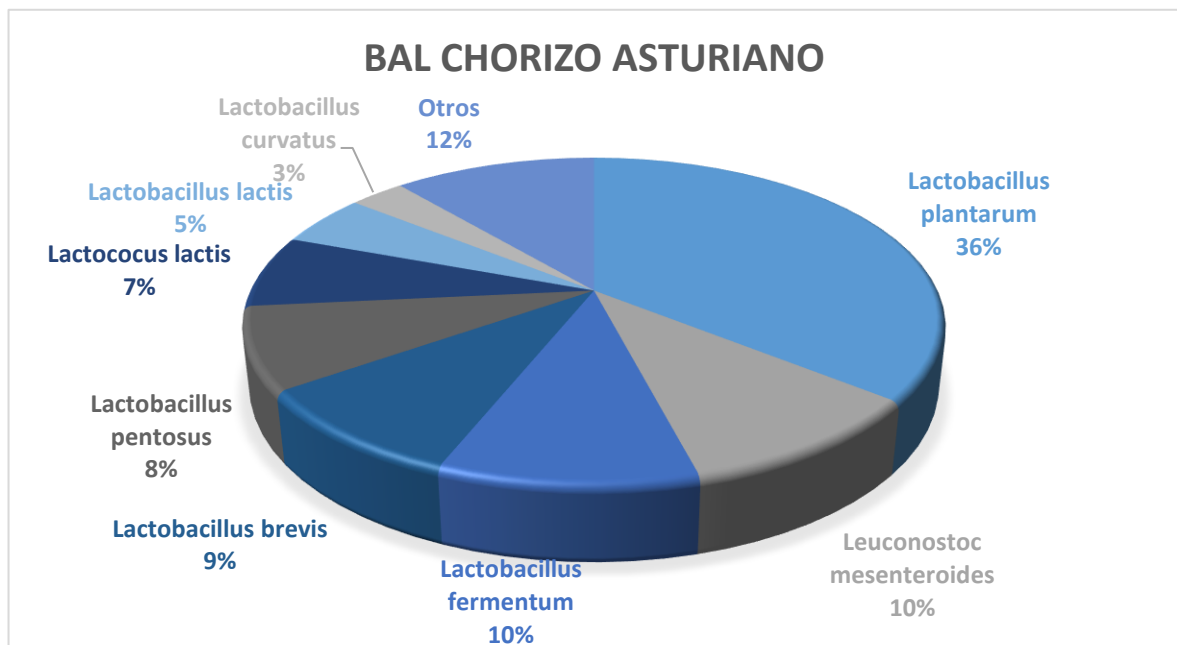
Una vez realizado el análisis inicial de identificación de microorganismos, se llevó a cabo la caracterización bioquímica para selección y cribado de microorganismos previo a la tipificación contemplada en la Tarea 1.3.

Para la caracterización bioquímica de las BAL se empleó el método API 50 CH empleado en la identificación de bacterias ácido lácticas mediante el estudio de la fermentación de sustratos pertenecientes a la familia de hidratos de carbono y derivados (heterósidos, polialcoholes, ácidos urónicos). La fermentación se traduce en un cambio del color consecuencia de la producción de ácido por crecimiento en anaerobiosis y revelada por un indicador de pH en el medio de cultivo.

Los sustratos empleados fueron: Glicerol, Eritritol, D-Arabinosa, L-Arabinosa, D-Ribosa, D-Xilosa, D-Adonitol, Metil-βD-Xilopiranosida, D-Galactosa, D-Glucosa, D-Fructosa, D-Mamnosa, L-Sorbosa, L-Rhamnosa, Dulcitol, Inositol, D-Manitol, D-Sorbitol, Metil-αD-Manopiranosida, Metil-αD-Glucopiranosida, N-Acetilglucosamina, Amigdalina, Arbutina, Esculina citrato férrico, Salicina, D-Celobiosa, D-Maltosa, D-Lactosa, D-Melibiosa, D-Sacarosa, D-Trehalosa, Inulina, D-Melezitosa, D-Rafinosa, Almidón, Glicógeno, Xilitol, Gentiobiosa, D-Turanosa, D-Lixosa, D- Tagatosa, D-Fucosa, D-Arabitol, L-Arabitol, Gluconato potásico, 2-Cetogluconato potásico, 5-Cetoglutonato potásico.

Se aislaron un total de 120 microorganismos de BAL, 5 de cada una de las 24 empresas pertenecientes a la Marca Colectiva Chorizo Asturiano. Se lograron identificar con alto nivel de correlación y según el perfil bioquímico, 98 microorganismos pertenecientes al grupo de las BAL.

La distribución de la prevalencia de cada una de las especies aisladas y caracterizadas se muestra en la gráfica a continuación:



Gráfica 1.- Distribución del % de prevalencia de las distintas especies de BAL en el Chorizo Asturiano.

Se identificó *Lactobacillus plantarum* como la especie bacteriana con mayor prevalencia en el producto tras la maduración y supone un 36 % de todas las cepas aisladas. *Leuconostoc mesenteroides* se confirmó en un 10% de los aislados al igual que *Lactobacillus fermentum*. Se encontraron otras cepas características en menor porcentaje y que

habitualmente se aíslan en otro tipo de embutidos fermentados tales como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus* y *Lactococcus lactis*.

Para la caracterización bioquímica de los CG+C+ se empleó el método API STAPH que permite identificar microorganismos pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kocuria* mediante una batería de pruebas bioquímicas.

Los sustratos empleados fueron: D-Glucosa, D-Fructosa, D-Manosa, D-Maltosa, D-Lactosa, D-Trehalosa, D-Manitol, Xilitol, D-Melibiosa, Nitrato de potasio, β -Nafti fosfato Priruvato de sodio, D-Rafinosa, D-Xilosa, D-Sacarosa, Metil- α -D-Glucopiranosida, N-Acetil-glucosamina, L-Arginina, Urea.

En 14 de los 24 fabricantes a los que se recogieron muestras, no se aislaron CG+C+. Finalmente, entre los aislados en cultivo puro, se lograron identificar correctamente 29 microorganismos pertenecientes al grupo de las CG+C+.

Los microorganismos identificados fueron los siguientes:

- *Staphylococcus capiti*, 8 aislados
- *Staphylococcus saprophyticus*, 7 aislados
- *Staphylococcus epidermidis*, 3 aislados
- *Staphylococcus sciuri*, 3 aislados
- *Staphylococcus capitalis*, 2 aislados
- *Kocuria varians*, 2 aislados
- *Micrococcus* spp., 2 aislados
- *S. lugunensis*, 1 aislado
- *S. auriculari*, 1 aislado

Se ha aislado un número limitado de microorganismos pertenecientes al grupo bacteriano de CG+C+, por lo que puede parecer que su implicación en el desarrollo tecnológico en el Chorizo Asturiano puede ser limitada.

Una vez caracterizados los microorganismos (tanto BAL como CG+C+) las diferentes cepas fueron crio-conservadas para su posterior recuperación en las tareas de tipificación y uso como cultivos iniciadores. Para ello de cada una de los aislados se preparó un cultivo en medio líquido overnight en las condiciones de aireación y temperatura óptimas, de manera que los microorganismos se encontraran en la fase de crecimiento exponencial. Se adicionó glicerol al 20 % como agente crio-protector y las cepas fueron congeladas para su conservación a -20 °C.

Se elaboró un cepario específico, de cultivos monoespecíficos y axénicos de los microorganismos presentes en el Chorizo Asturiano responsables de los procesos fermentativos (BAL) y de las características organolépticas (CG+C+).

Para la obtención de estos datos existe un trabajo previo como punto de partida con referencia IDE/2011/000708. En dicho trabajo se utilizaron técnicas de microbiología clásica para el aislamiento y caracterización de BAL, el número de aislados caracterizados fue menor, así como el número de empresas participantes. El trabajo aquí expuesto trata de representar de una manera más fiable el producto elaborado por el sector, incluyendo a 24 empresas, de las cuales un 60 % no estaban representadas en el anterior estudio y caracterizando un mayor número de microorganismos con el fin de tener una mayor visión de la riqueza biológica del producto.

En cuanto a los resultados obtenidos, la proporción de microorganismos en este estudio es diferente, ya que en el estudio preliminar *Leuconostoc mesenteroides* era el microorganismo con mayor prevalencia, microorganismo heterofermentativo y que puede producir alteraciones, representando un 29 % de la biodiversidad microbiana. Con la actualización de los resultados y este estudio más detallado, *L. mesenteroides* representa tan solo un 10 %. De forma contraria, *Lactobacillus plantarum*, que representaba un 13 %, tras la realización del estudio aquí planteado, mucho más exhaustivo, supone un 36 % de la biodiversidad de BAL encontrada en el Chorizo Asturiano tras la etapa de maduración.

De forma paralela ocurre con la caracterización de CG+C+, de manera que a pesar de que no se aislaron en todas las muestras, la biodiversidad microbiana encontrada en el proyecto MEATMETAGEN fue mucho mayor.

Tarea 1.3. Tipificación molecular de aislados

Las cepas aisladas y caracterizadas fenotípica y bioquímicamente fueron crio-conservadas para su mantenimiento en condiciones de viabilidad. Las actividades desarrolladas en la Tarea 1.2. sirvieron como punto de partida para la caracterización de los microorganismos aislados, pero para tener una buena caracterización y tipificación de los mismos se hizo necesario el empleo de técnicas moleculares.

El uso de técnicas moleculares permite una caracterización mucho más precisa de los microorganismos y constituye una etapa imprescindible, máximo si dichas cepas se emplean para el desarrollo de cultivos iniciadores donde será necesario garantizar tanto la inocuidad de las cepas empleadas, como su autenticidad. La tipificación permite su identificación a nivel de género, especie e incluso variedad o cepa.

A partir de los aislados crio-conservados, tanto de BAL como de CG+C+, se prepararon cultivos overnight, es decir se revivificaron en medio de cultivo líquido en condiciones adecuadas de aireación y temperatura para su óptima proliferación. Es importante en este momento que los microorganismos alcancen la fase de crecimiento exponencial, donde su estado fisiológico es el más adecuado. Además, en todos los casos es necesario verificar que se trata de un cultivo puro, sin contaminaciones de otros microorganismos.

Para la extracción del DNA genómico de los cultivos celulares obtenidos a partir de los aislados en MRS y Sal manitol (BAL y CG+C+ respectivamente) se utilizó un kit comercial de extracción de DNA genómico siguiendo las indicaciones del fabricante, con algunas modificaciones, para su uso con microorganismos Gram positivos. La concentración de ADN obtenida se calculó mediante espectrofotometría y las muestras se congelaron hasta su uso.

Para la identificación y tipificación a nivel de especie, el DNA obtenido y conservado, se amplificó mediante PCR. La PCR es un método de síntesis enzimática de DNA *in vitro*, que permite obtener múltiples copias de un segmento de DNA predeterminado usando para ello 3 elementos fundamentales: los cebadores o *primers*, que son secuencias de oligonucleótidos que hibridan en las cadenas complementarias del DNA que actúa como molde, flanqueando el fragmento que va a ser amplificado; la Taq DNA polimerasa, enzima termoestable que cataliza la elongación de dichos oligonucleótidos en la dirección 5'→3'; y los cuatro desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTPs) que son añadidos a la mezcla de reacción.

La PCR se basa en la reiteración cíclica de tres etapas:

- Desnaturalización: separación del DNA bicatenario diana o molde en dos cadenas sencillas por acción de temperaturas superiores a 90 °C.
- Anillamiento o hibridación: enfriamiento posterior que permite el reconocimiento del *primer* y su acoplamiento con el DNA molde. Es necesario que exista un exceso de *primer* en relación al DNA molde para asegurar de esta forma que la mayor parte de las cadenas diana hibriden con los *primers* y no entre sí.
- Extensión o elongación: extensión del primer por acción de la Taq DNA polimerasa en presencia de iones magnesio, que utiliza las cadenas del DNA diana como moldes.

La especificidad de la reacción de PCR viene marcada por las secuencias de *primers* específicos. Actualmente, gracias a los avances de las técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos es posible conseguir *primers* específicos para diferentes microorganismos. En función de la especificidad deseada (de género, de especie o de cepa) se pueden utilizar diferentes regiones del genoma como dianas. Las regiones variables que codifican para el RNA ribosómico (RNAr) 16S son las más utilizadas ya que permiten diferencia a nivel de género, especie e incluso cepa o variedad. Los RNAr poseen secuencias variables y secuencias constantes, que pueden ser utilizadas para comparar tanto microorganismos muy próximos, como muy alejados filogenéticamente.

La fracción 16S del RNAr ha sido la más estudiada ya que su tamaño permite una secuenciación rápida que suministra además mucha información. El RNA ribosomal 16S es un componente de la subunidad pequeña 30S de los ribosomas procariotas, ampliamente utilizado para establecer relaciones filogenéticas y para identificar a nivel de género y especie. Se basa en la presencia del gen 16S en todos los procariotas y la conservación universal de algunas regiones. La especificidad del gen 16S en algunas regiones variables hace posible la identificación bacteriana.

Actualmente se dispone de numerosas secuencias del gen que codifica para el RNAr 16S en las bases de datos, de manera que un microorganismo desconocido puede ser identificado en función del alineamiento de la secuencia de su RNAr 16S con las secuencias disponibles en estas bases de datos. Para especies de un mismo género existe un alineamiento en las secuencias, generalmente superior al 90% y para cepas de una misma especie, este valor es superior al 99%.

En este sentido, para la amplificación de los aislados de BAL y de GC+C+, se emplearon dos parejas de *primers* universales, respectivamente. Posteriormente se llevó a cabo la secuenciación de los productos de PCR obtenidos. El análisis de las secuencias del gen 16S rRNA ha sido realizado por los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo.

La secuenciación del ADN consiste en la comparación directa de secuencias del ADN bacteriano permitiendo determinar si dos cepas son similares o diferentes. Se deben seleccionar para la secuenciación genes o regiones con un determinado grado de variabilidad intraespecie. A lo largo de tiempo se han desarrollado diferentes métodos para obtener la secuencia de nucleótidos del ADN, sin embargo, actualmente los métodos más utilizados son la secuenciación automática y el método de terminación de cadena de Sanger también conocido como “método dideoxi” (Sanger et al., 1977).

La técnica se basa en el empleo de nucleótidos modificados que han perdido el grupo hidroxilo de la posición desoxirribosa, los dideoxi. Cuando estos nucleótidos se incorporan en una reacción de síntesis de ADN, ésta se detiene. El empleo de dideoxi marcados con distintos fluorocromos ha permitido su monitorización automática.

Los pasos serían el cultivo celular, y obtención del ADN molde. A partir de ahí tiene lugar la secuenciación automática (ddTTP, ddATP, ddCTP y ddGTP). Gracias al empleo de fluorocromos diferentes, se puede combinar el resultado de las 4 reacciones y aplicar la mezcla a un mismo pocillo del gel de electroforesis. Hay una etapa de desnaturalización para separar las hebras de ADN. Se obtienen las bandas donde el color de cada banda se corresponde al del dideoxinucleótido 3' terminal de ese fragmento. Se pasa por un láser, para excitar el fluoróforo, que libera un fotón y emite luz. No sólo se pueden detectar los 4 colores tras acabar la separación electroforética, sino incluso según va transcurriendo ésta el detector puede medir la presencia de las bandas que van pasando por el haz láser y su color.

Las secuencias obtenidas fueron editadas mediante un software de edición de secuencias de ADN y se compararon con librerías génicas disponibles en las bases de datos para la identificación de la especie.

Es destacable que no en todos los casos hay una correlación entre los resultados obtenidos mediante caracterización fenotípica frente a la caracterización génica. Así podemos decir que la identificación de análisis bioquímico sirve como herramienta para la primera selección a nivel de género, pero la identificación génica se hace necesaria cuando se quiere identificar de forma fiable la especie bacteriana de interés.

Hito 2. Caracterización de los procesos tecnológicos de elaboración del Chorizo Asturiano

Tarea 2.1. Estudio y evolución del proceso fermentativo mediante técnicas clásicas

La fermentación es uno de los procesos biotecnológicos más antiguos que se conocen y es fruto de la actividad metabólica desarrollada por los microorganismos en condiciones adecuadas, tanto ambientales, como de disponibilidad de nutrientes. Es por ello clave en el desarrollo y estudio de alimentos fermentados (como es el caso del Chorizo Asturiano) determinar los microorganismos responsables de dicho proceso.

Generalmente los procesos fermentativos en el Chorizo Asturiano tienen lugar a partir de los microorganismos que de forma natural están presentes en la masa y procedentes de la materia prima, ambiente de instalaciones e incluso manipulación. Durante la elaboración del embutido hay una disminución del pH de manera que tienen lugar la coagulación proteica e integración de la masa, mientras que paralelamente, y durante la maduración, se produce una reducción de la actividad de agua (a_w). Como medida indirecta de la actividad microbiana se determinaron en los 24 fabricantes pertenecientes a la Marca Colectiva Chorizo Asturiano, el pH y a_w una vez estabilizado el producto final y de nuevo en diferentes lotes de diferentes fabricaciones (al igual que en la caracterización microbiana) para tratar de representar la máxima variabilidad posible del producto.

Cuando la elaboración de los embutidos crudo curados se realiza sin adición de cultivos iniciadores, el crecimiento de una microbiota autóctona determinada depende en gran medida de las condiciones ambientales como el pH, la a_w y las relaciones que se establecen entre las diferentes poblaciones microbianas.

La determinación de pH se realizó por el método potenciométrico mediante medida directa sobre muestras homogeneizadas.

La determinación de a_w se realizó con un equipo Novasina Thermoconstanter TH-5000 a 25 °C.

Los datos medios obtenidos en cuanto a los valores de pH y a_w se muestran en la tabla a continuación:

Muestra	Zona Geográfica	Tipo de producción	pH	a_w
1	Occidente	Industrial	5,21	0.926
2	Occidente	Industrial	5,18	0.886
3	Oriente	Artisanal	5,26	0.918
4	Oriente	Industrial	4,74	0.819
5	Oriente	Artisanal	5,42	0.912
6	Centro	Industrial	4,77	0.872
7	Centro	Industrial	4,86	0.874
8	Centro	Industrial	5,89	0.899
9	Oriente	Artisanal	5,14	0.833
10	Oriente	Artisanal	5,34	0.912
11	Centro	Industrial	5,08	0.878
12	Centro	Industrial	4,77	0.913
13	Centro	Industrial	5,15	0.921
14	Oriente	Industrial	5,17	0.895
15	Centro	Industrial	5,32	0.857
16	Centro	Industrial	5,24	0.953
17	Centro	Industrial	5,38	0.913
18	Centro	Industrial	4,97	0.906
19	Occidente	Industrial	4,82	0.808
20	Oriente	Industrial	5,34	0.898
21	Centro	Industrial	5,23	0.936
22	Sur	Artisanal	5,34	0.860
23	Sur	Artisanal	5,33	0.919
24	Centro	Industrial	5,25	0.931

Tabla 2.- Valores medios de pH y a_w del producto perteneciente a la Marca Colectiva Chorizo Asturiano.

En todos los casos se observa que el pH en el producto final es próximo a los valores que favorecen la coagulación proteica y que además permiten el estado viable de las BAL presentes en la matriz. Teniendo como punto de referencia de las masas cárnicas un pH próximo a 6,0, la disminución del pH al final del proceso de maduración es de media de 0,8 puntos de pH.

En cuanto a los valores de a_w , en todos los casos excepto en dos fabricantes, el valor de a_w en el producto final está por debajo de 0,92. Este valor marca un límite fisiológico de crecimiento para muchos microorganismos de manera que con valores de a_w por debajo de 0.92 no son capaces de crecer, entre los que se encuentran algunos patógenos alimentarios.

Como ya fue comentado además de una caracterización del producto final se llevó a cabo la monitorización de un “proceso productivo tipo” teniendo en cuenta las etapas de ahumado-fermentación y de secado-maduración. Se seleccionaron varios procesos y finalmente de escogieron las condiciones óptimas para la elaboración del Chorizo Asturiano:

- Inicio de la elaboración: Elaboración de masa cárnica, picado, amasado y embutido; tiempo cero.
- Etapa de fermentación-ahumado: Paso del embutido al ahumadero. Durante el proceso fermentativo se prevee una elevada actividad microbiana.
- Etapa de secado-maduración: Paso del embutido a secadero de regulación, a temperatura y humedad controladas.

Finalmente se monitorizaron hasta 9 procesos productivos en cuanto a determinación de pH y a_w .

Los resultados se muestran a continuación:

Condiciones	Tiempo	Pruebas									Media pH
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Ahumadero	0	5,94	5,94	5,94	5,63	5,6	5,62	6,05	6,05	6,05	5,85
Ahumadero	24	5,92	5,94	5,94	5,34	5,4	5,38	5,81	5,63	5,82	5,63
Ahumadero	48	5,43	5,29	5,37	5,42	5,46	5,49	5,5	5,54	5,47	5,46
Ahumadero	72	5,54	5,57	5,65	5,34	5,34	5,33	5,51	5,5	5,47	5,45
Secadero	144	5,54	5,62	5,54	5,4	5,46	5,39	5,57	5,55	5,51	5,49
Secadero	168	5,47	5,58	5,5	5,14	5,3	5,39	5,54	5,54	5,53	5,42
Secadero	192	5,14	5,61	5,54	5,39	5,37	5,36	5,52	5,49	5,49	5,45

Tabla 3.- Valores de pH a lo largo de la monitorización de diferentes producciones de Chorizo Asturiano.

Condiciones	Tiempo	Pruebas									Media a_w
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Ahumadero	0	0,982	0,982	0,982	0,952	0,952	0,952	0,945	0,945	0,945	0,95
Ahumadero	24	0,963	0,976	0,977	0,951	0,952	0,943	0,944	0,94	0,945	0,95
Ahumadero	48	0,928	0,96	0,966	0,95	0,953	0,939	0,938	0,934	0,931	0,94
Ahumadero	72	0,949	0,936	0,943	0,922	0,925	0,907	0,933	0,922	0,927	0,93
Secadero	144	0,926	0,925	0,923	0,901	0,913	0,921	0,915	0,922	0,921	0,92
Secadero	168	0,921	0,911	0,92	0,933	0,92	0,912	0,922	0,921	0,917	0,92
Secadero	192	0,924	0,925	0,921	0,92	0,91	0,91	0,913	0,917	0,913	0,92

Tabla 4.- Valores de a_w a lo largo de la monitorización de diferentes producciones de Chorizo Asturiano.

En cuanto a los valores de pH, el producto obtenido se considera de baja acidez ya que presenta un valor por encima 4,6. La bajada de pH tiene lugar desde un valor de 5,85 hasta un pH final una vez estabilizado el producto hasta 5,45, se comprueba por tanto que el proceso fermentativo tiene lugar en las primeras horas del proceso tecnológico.

En cuanto a los valores de a_w , teniendo en cuenta que con $a_w > 0,98$ todos los microorganismos son capaces de proliferar y entre valores de 0,98-0,93 proliferan Enterobacterias y Bacterias ácido lácticas, se comprueba que la estabilidad del producto tiene lugar en las primeras etapas de secado y maduración.

Dentro de la monitorización del proceso productivo se consideró interesante determinar además la cinética de crecimiento de las BAL responsables de parte de los procesos tecnológicos que se desarrollan. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Condiciones	Tiempo	Pruebas									Media BAL ufc/g
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Ahumadero	0	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵	<10 ⁵
Ahumadero	24	2,7E+07	1,2E+07	2,0E+07	2,3E+09	1,3E+08	2,4E+08	1,9E+08	1,3E+07	8,2E+07	4,1E+08
Ahumadero	48	5,6E+07	2,2E+07	9,6E+07	3,2E+10	1,1E+10	3,3E+09	4,0E+07	3,0E+07	4,2E+07	6,5E+09
Ahumadero	72	5,9E+07	2,9E+07	2,3E+07	1,2E+08	1,5E+08	2,1E+08	1,0E+09	6,1E+08	6,3E+08	3,8E+08
Secadero	144	2,4E+08	1,1E+09	2,7E+07	1,1E+08	2,0E+08	2,2E+08	1,6E+10	3,0E+10	3,0E+10	1,1E+10
Secadero	168	5,7E+07	1,8E+09	5,9E+07	4,7E+08	1,2E+08	7,8E+07	3,0E+10	2,9E+10	3,0E+10	1,2E+10
Secadero	192	4,5E+07	1,1E+09	7,4E+07	2,0E+08	8,7E+07	1,1E+08	1,4E+11	8,4E+09	5,7E+09	2,1E+10

Tabla 5.- Valores de BAL a lo largo de la monitorización de diferentes producciones de Chorizo Asturiano.

En el momento inicial la carga microbiana en cuanto al contenido de BAL no es muy elevada, en torno a 10^5 ufc/g. En las primeras horas durante el proceso tecnológico de fermentación, el contenido en BAL se incrementa más de 3 log de ufc/g, lo que indica una fuerte actividad y proliferación microbiana en este momento. A las 48 horas se produce un nuevo incremento en 1 log ufc/g y al final del proceso en el momento de estabilización del producto la concentración microbiana de BAL alcanza, de media, las 10^{10} ufc/g.

Tarea 2.2. Estudio y evolución del proceso fermentativo mediante Metagenómica

Para desarrollar un cultivo/s iniciador/es autóctono y con el fin de proteger las características tradicionales de los productos cárnicos crudo-curados, es imprescindible comenzar por el estudio detallado de la ecología microbiana de los mismos y de los cambios que ocurren cuando sufren una fermentación espontánea y siguen una maduración natural. De esta forma se adquiere información acerca de los grupos microbianos predominantes, en qué cantidades se encuentran, cuál es su evolución a lo largo del procesado y qué efecto tiene su presencia en las características de estos embutidos crudo-curados.

El empleo de la Metagenómica para el estudio de los procesos fermentativos supone disponer de información completa sobre la ecología microbiana presente en el producto en diferentes momentos del proceso tecnológico de fermentación.

La Metagenómica es una herramienta molecular que permite la secuenciación simultánea de todo el DNA presente en una muestra, caracterizando así de forma global todos los microorganismos que están presentes. Para la identificación de especies se realizó la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S ya que es una potente herramienta que permite la identificación de especies y determinar la diversidad bacteriana. Esta secuenciación de alto rendimiento permite identificar una gran variedad de taxones bacterianos.

Las muestras fueron tomadas en 3 puntos del proceso productivo:

Análisis al inicio del proceso de elaboración. Las masas cárnicas preparadas para la elaboración del embutido cuentan con una microbiología propia y diversa derivada de la materia prima, el ambiente y también favorecida por los procesos de manipulación. Los microorganismos presentes en estas masas cárnicas frescas forman una ecología microbiana compleja, con interacciones entre sí, compitiendo por el acceso a los recursos. Se tomaron muestras de lotes diferentes, que fueron almacenadas y congeladas hasta la extracción del DNA bacteriano.

Análisis al fin de la fermentación. El proceso fermentativo del Chorizo Asturiano, y considerando los resultados que se fueron obteniendo a lo largo del desarrollo de la Tarea 2.1., tiene lugar en las 48 horas tras el embutido y durante el ahumado, momento en el cual el producto está a temperaturas adecuadas para favorecer la proliferación microbiana. Al igual que en el momento inicial, se tomaron muestras de 3 lotes diferentes a las 48 horas, y fueron almacenadas en congelación hasta la extracción del ADN bacteriano.

Análisis tras la etapa de secado y maduración. Una vez finalizados los procesos de fermentación- ahumado y secado-maduración, el producto se considera microbiológicamente estable, siendo previsible que la ecología microbiana haya cambiado significativamente desde las primeras etapas de procesado, debido a los cambios tecnológicos que ha sufrido el producto a lo largo del proceso. De nuevo las muestras tras los 7 días de procesado fueron congeladas para extraer posteriormente el DNA bacteriano.

Para la extracción del DNA bacteriano a partir de las diferentes muestras recogidas en diferentes momentos tecnológicos de elaboración del embutido se empleó un kit comercial, siguiendo las indicaciones del fabricante, para el aislamiento de DNA total a partir de matrices complejas. El DNA extraído se congeló hasta su secuenciación.

Previo al trabajo de secuenciación, el primer paso es la amplificación del DNA extraído mediante PCR amplificando las regiones variables del RNAr 16S.

Para la secuenciación masiva mediante Metagenómica se empleó la técnica Ion Torrent disponible en los Servicios Científico Técnicos de la Universidad de Oviedo. Esta técnica de secuenciación se basa en la incorporación de desoxirribonucleótidos trifosforilados (dNTP) en el DNA que se está amplificando, lo que supone la generación de un enlace covalente y la liberación de un pirofosfato y un protón, esto es detectado por un sensor de pH tipo ISFET. Los dNTP se incorporan únicamente cuando existe complementariedad con el nucleótido de la cadena molde. Tras cada ciclo, se lavan los nucleótidos para añadir un nuevo tipo y la reacción se volverá a producir o no dependiendo de la secuencia de nucleótidos de la cadena a secuenciar. La principal ventaja de este proceso es la velocidad de secuenciación. Tras la preparación de las librerías génicas, comenzó el proceso de secuenciación masiva.

Los análisis se hicieron por triplicado en cada punto del proceso. En la tabla a continuación se ven los resultados obtenidos en % relativo atendiendo a la categoría taxonómica Phylum.

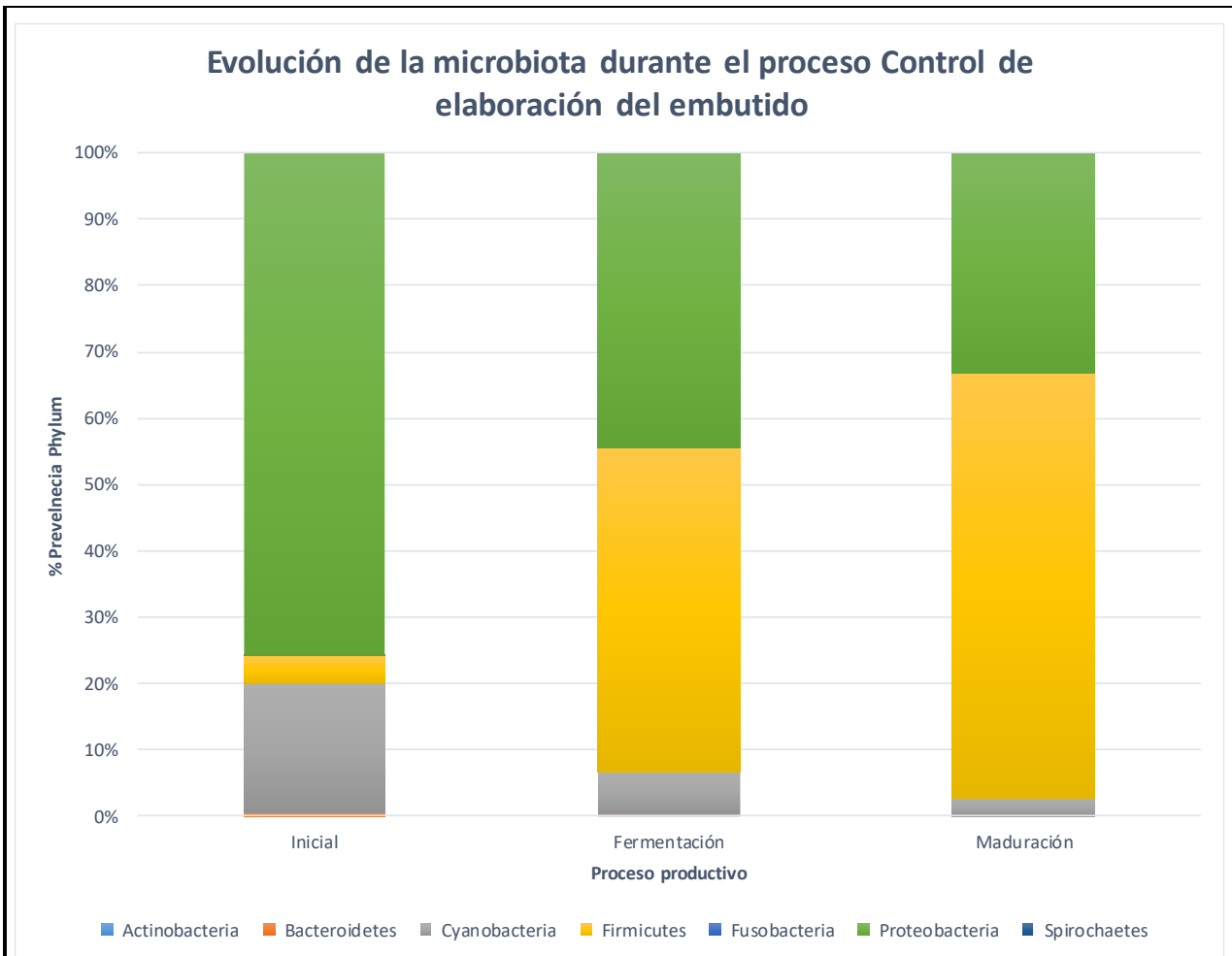
Phylum	Inicial	Fermentación	Maduración
Actinobacteria	0,06	0,03	0,02
Bacteroidetes	0,31	0,10	0,04
Cyanobacteria	19,59	6,49	2,70
Firmicutes	4,15	48,99	64,02
Fusobacteria	0,03	0,04	0,01
Proteobacteria	75,87	44,38	33,24
Spirochaetes	0,00	0,00	0,00

Tabla 6.- % Prevalencia de Phylum en las diferentes etapas del proceso Control de elaboración de embutido.

Existe una prevalencia de las Proteobacterias al inicio del proceso productivo. En este momento las materias primas cárnicas no han sufrido ningún proceso fermentativo. Los Firmicutes se encuentran aún en un porcentaje muy bajo. Es llamativa la presencia de Cyanobacterias ya que a este Phylum pertenecen las algas verde-azuladas. A medida que avanza el proceso fermentativo, aumenta la proporción del Phylum Firmicutes y disminuyen las Proteobacterias y Cyanobacterias.

En la etapa de maduración o estabilidad microbiológica del producto, a lo largo de este proceso, sigue aumentando de forma paulatina el Phylum Firmicutes y disminuyendo por contra el de las Proteobacterias. Así son los Firmicutes los responsables de los procesos de fermentación, hasta las 48 horas, pero sigue evolucionando de forma más paulatina a medida que avanza el proceso de maduración hasta la estabilización del producto.

A continuación, se muestra una gráfica con los resultados comentados en la que se puede ver de forma más clara la evolución:



Gráfica 2.- Evolución de la microbiota durante el proceso Control de elaboración del embutido.

La evaluación de los resultados, además de realizarlo en base a la categoría taxonómica Filo, se hizo en base la categoría Familia para tratar de afinar aquellos microorganismos con mayor importancia tecnológica en el proceso de fermentación y maduración del Chorizo Asturiano.

Los resultados nos muestran que al principio de la fermentación son abundantes las familias Enterobacteriaceae, Moraxellaceae, Nostocaceae y Pseudomonadaceae. A lo largo del proceso de fermentación y posterior maduración, se ve disminuida su prevalencia, aunque la familia Enterobacteriaceae y Pseudomonaceae siguen constituyendo microbiota predominante.

La familia Lactobacillaceae experimentó un fuerte incremento en su población cuando tienen lugar los procesos fermentativos. Tras el proceso de fermentación, la familia Lactobacillaceae sigue incrementando su prevalencia relativa, pero de forma más paulatina.

Tal y como parecía confirmarse en el desarrollo del Hito 1, las familias Staphylococcaceae y Micrococcaceae, con importancia tecnológica en otro tipo de embutidos, no parecen presentar aspectos fundamentales en el desarrollo del embutido ya que o bien están en un número relativamente muy bajo o bien no se encuentran.

Hito 3. Desarrollo de cultivos iniciadores y mejora de proceso

Tarea 3.1. Desarrollo de cultivos iniciadores a partir de aislados con interés tecnológico

Para el desarrollo de cultivos iniciadores específicos para el Chorizo Asturiano se seleccionaron 5 especies bacterianas de entre las aisladas, seleccionando cepas determinadas en producto de los diferentes fabricantes. En un principio las seleccionadas fueron las descritas a continuación:

- *Lactobacillus plantarum*
- *Lactobacillus lactis*
- *Lactococcus lactis*
- *Lactobacillus fermentum*
- *Lactobacillus delbrueckii*

Como se comprobó en el desarrollo de la Tarea 1.3. no todas las identificaciones bioquímicas (fenotípicas) se correspondieron con los resultados obtenidos mediante técnicas de secuenciación. Una vez tipificados todos los aislados se comprobó que los evaluados tecnológicamente eran cepas de las siguientes especies bacterianas:

- *Lactobacillus plantarum*
- *Lactobacillus sakei*
- *Lactobacillus curvatus lactis*
- *Lactobacillus plantarum*
- *Lactobacillus plantarum*

Estas cepas fueron las seleccionadas para la bioproducción de cultivos iniciadores. Como se comprobó mediante el estudio de los procesos tecnológicos de elaboración del embutido mediante Metagenómica, es la familia *Lactobacillaceae* la encargada de llevar a cabo los procesos tecnológicos que tienen lugar durante la fermentación y maduración del embutido.

Las bacterias seleccionadas fueron evaluadas en base a su potencial como cultivos iniciadores para la elaboración de Chorizo Asturiano de manera que la microbiota empleada como cultivo iniciador se instaure como microbiota predominante, dirigiendo la fermentación de forma adecuada con una caída de pH cercana al punto isoeléctrico de las proteínas en un periodo en 24 horas. Esto, además de permitir una buena coagulación proteica, inhibirá el desarrollo de microbiota alterante e incluso patógena que pudiera estar presente en la masa cárnica.

Para la bioproducción de microorganismos, se analizaron las condiciones óptimas de cultivo para ajustarlas previo al escalado en fermentador. Las condiciones evaluadas fueron: medios de cultivo y crecimiento para las BAL, composición gaseosa (aerobiosis y anaerobiosis), temperaturas mesófilas óptimas de crecimiento, viabilidad del cultivo y propiedades antibacterianas y biocidas de las cepas utilizadas.

Tarea 3.2. Mejora del proceso productivo mediante la incorporación de cultivos iniciadores

Se ha seleccionado el proceso productivo más adecuado para la incorporación de cultivos iniciadores en base a las condiciones de producción sobre formulación, tiempo y temperatura en la etapa de fermentación-ahumado, tiempo y temperatura en la etapa de secado-maduración.

Para la inoculación del Chorizo Asturiano se emplearon los cultivos iniciadores desarrollados y caracterizados en la Tarea 3.1.

Para la incorporación de los cultivos se valoraron 2 metodologías de incorporación de cultivos:

- Incorporación directa de los microorganismos en solución salina estéril.
- Incorporación de los cultivos liofilizados.

Tarea 3.3. Evaluación del proceso productivo mediante Metagenómica

Una vez elaborados los embutidos con la adición de los cultivos iniciadores previamente seleccionados, se evaluó su supervivencia. La mayor parte de los estudios a este respecto se han centrado en la selección de cultivos iniciadores en función de sus propiedades funcionales y tecnológicas y no tanto en estudiar la prevalencia real de estos cultivos iniciadores durante la maduración. Por lo tanto, es fundamental contar con una herramienta que permita monitorizar el desarrollo de los cultivos durante el proceso de fermentación y de maduración de forma precisa, distinguiendo las cepas inoculadas. Los métodos basados en microbiología clásica, no ofrecen resultados precisos en cuanto a la detección de la biodiversidad, considerándose así la Metagenómica una herramienta que permite proporcionar una información más completa acerca de la ecología bacteriana a diferentes niveles taxonómicos.

Se preparó un plan de recogida de muestras para evaluar los procesos fermentativos tras la incorporación de cultivos iniciadores y optimizar el proceso productivo. El esquema de trabajo fue el ya descrito en la Tarea 2.2.

El microorganismo seleccionado como cultivo iniciador para la evaluación del proceso fermentativo fue *Lactobacillus sakei* por presentar unas adecuadas capacidades tecnológicas.

El cultivo liofilizado fue adicionado a las masas cárnicas para favorecer los procesos fermentativos y determinar en qué medida se veía reducida la microbiota alterante e incluso patógena.

Para la ejecución de esta tarea se seleccionaron las muestras correspondientes a 3 procesos productivos y se extrajo el DNA para posteriormente llevar a cabo la secuenciación masiva.

Los resultados para la clasificación taxonómica Filo se pueden ver en la tabla a continuación:

Phylum	Inicial	Fermentación	Maduración
Actinobacteria	0,03	0,00	0,01
Bacteroidetes	0,35	0,07	0,02
Cyanobacteria	17,71	4,73	3,49
Firmicutes	9,10	59,31	75,16
Fusobacteria	0,06	0,01	0,01
Proteobacteria	72,76	35,89	21,35
Spirochaetes	0,01	0,00	0,00

Tabla 7.- % Prevalencia de Phylum en las diferentes etapas del proceso con adición de starters en la elaboración de embutido.

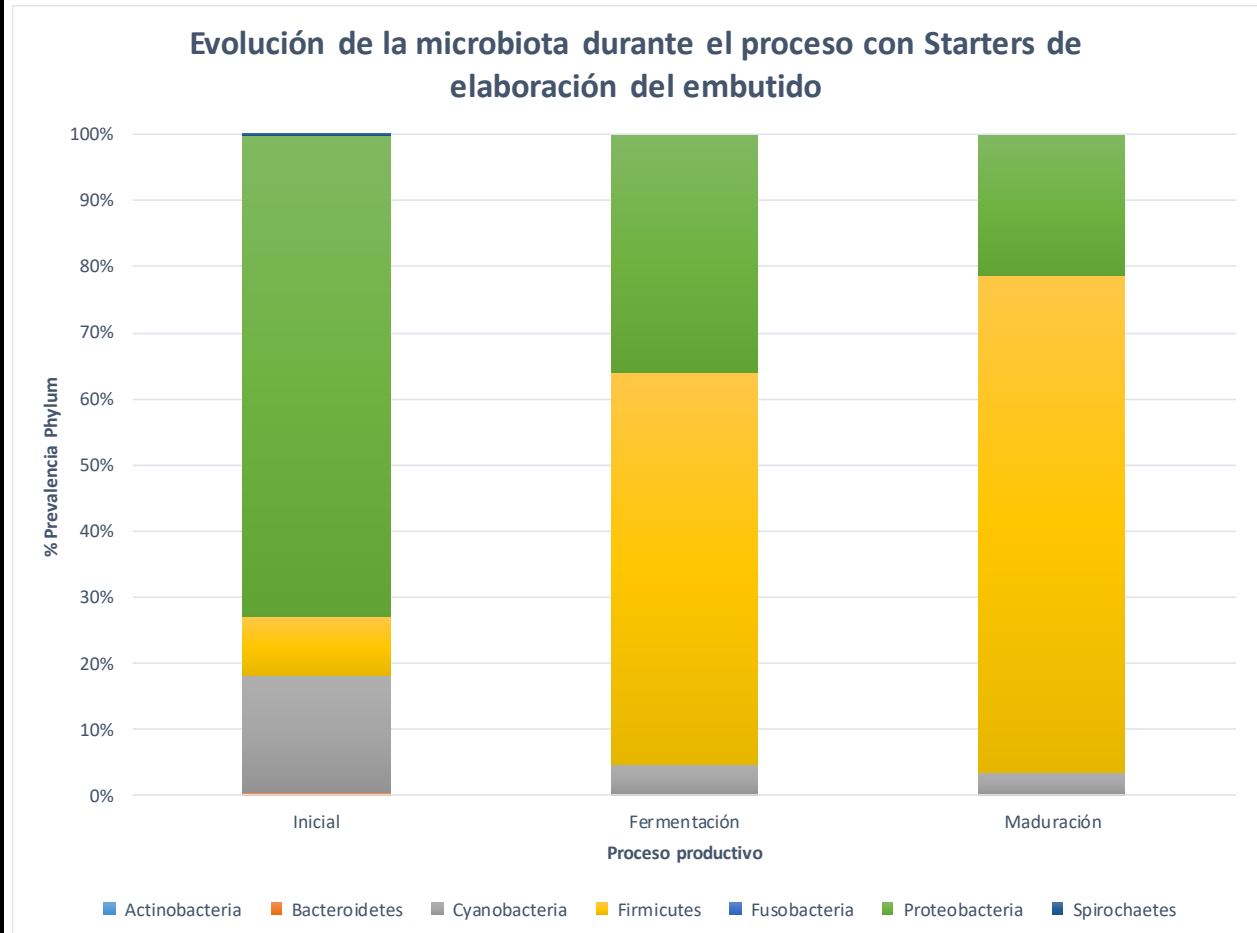
Hay una prevalencia clara de las Proteobacterias al inicio del proceso productivo, al igual que en el proceso sin cultivos iniciadores. En este momento las materias primas cárnicas no han sufrido ningún proceso fermentativo. Es de nuevo llamativa la presencia de Cyanobacterias ya que a este Phylum pertenecen las algas verde-azuladas.

A medida que avanza el proceso fermentativo, hay un crecimiento exponencial del Phylum Firmicutes, paralelamente hay una disminución del contenido relativo de Proteobacterias. Las Cyanobacterias también disminuyen a medida que avanza el proceso fermentativo.

En la etapa de maduración o estabilidad microbiológica del producto, a lo largo de este proceso, sigue aumentando de forma paulatina el Phylum Firmicutes y una mayor disminución de las Proteobacterias, dentro de las cuales se encuentran muchos de los patógenos alimentarios responsables de toxiinfecciones alimentarias y disminuyendo por el contrario el de las Proteobacterias. Las Cyanobacterias en este punto superan ligeramente el 3 % relativo.

Así son los Firmicutes los responsables de los procesos de fermentación y a la vista de los resultados parece que su incorporación en forma de cultivos iniciadores mejora esta etapa.

Se pueden ver los resultados de forma más clara en la gráfica que se muestra a continuación:



Gráfica 3.- Evolución de la microbiota (Phylum) durante el proceso con adición de starters en la elaboración del embutido.

La evaluación de los resultados, tras la incorporación del cultivo iniciador, además de realizarlo en base a la categoría taxonómica Filo, se hizo en base la categoría Familia para tratar de afinar aquellos microorganismos con mayor importancia tecnológica en el proceso de fermentación y maduración del Chorizo Asturiano.

Hito 4. Validación de resultados

Tarea 4.1. Evaluación de las características físico-químicas, organolépticas y microbiológicas del producto obtenido

Los productos cárnicos crudo curados desarrollados han sido caracterizados desde un punto de vista físico-químico, microbiológico y organoléptico. Los procesos fermentativos y de maduración se han visto mejorados con una mayor disminución del pH gracias al empleo de microbiota dirigida.

Evaluación nutricional

Una vez obtenidos los productos enriquecidos, se realizó un estudio nutricional para validar el desarrollo. Para ello se determinaron humedad, cenizas, perfil lipídico (ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados), carbohidratos, concentración de proteína, fibra, sal y valor energético. También se evaluó el pH y la a_w . No se ha visto modificado el perfil nutricional de los productos desarrollados con cultivos iniciadores, frente a los que se han elaborado sin el empleo de microbiota dirigida.

Estudio microbiológico

La validación de cualquier protocolo industrial alimentario conlleva una verificación en términos higiénico-sanitarios, garantizando que los productos obtenidos son seguros desde el punto de vista microbiológico. Se ha verificado que el empleo de microbiota dirigida puede ayudar en el control de microorganismos patógenos en el embutido.

Los productos elaborados con cultivos iniciadores no presentaban los microorganismos patógenos determinados: *E. coli*, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*.

Evaluación organoléptica

Se determinó el perfil organoléptico de los productos desarrollados en el proyecto MEATMETAGEN sin adición de cultivos iniciadores y tras su incorporación y/o modificaciones del proceso productivo.

Se realizó una cata hedónica de los diferentes productos, determinando que la incorporación de cultivos iniciadores al producto no supone ningún cambio en el perfil organoléptico del Chorizo Asturiano.