

INFORME TÉCNICO FINAL

PROGRAMA ASTURIAS

DATOS DE IDENTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE I+D+i

Referencia proyecto	IDI/2021/000416			
Acrónimo	NitraOut			
Título del Proyecto	Investigación de estrategias orientadas a preservar la calidad sensorial y seguridad alimentaria de los derivados cárnicos con reducción y/o eliminación de aditivos nitrificantes			
Periodo de Justificación	Desde:	01/10/2021	Hasta:	31/12/2023

En Noreña , a 21 de Marzo de 2024

1. MEMORIA TÉCNICA

Explique **DETALLADAMENTE** las actividades realizadas, incluyendo la descripción de la metodología empleada, con referencia expresa a los hitos, tareas y plan de trabajo de la solicitud.

Hito 1. IDENTIFICACION DE ALTERNATIVAS AL USO DE NITRIFICANTES

Tarea 1.1 Identificación y caracterización de las funcionalidades tecnológicas de los nitrificantes en los derivados cárnicos.

Los nitratos y nitritos ejercen un importante papel como antimicrobianos y antioxidantes, participan en la formación y estabilización del color y contribuyen al desarrollo del aroma típico en los derivados cárnicos.

Del total de nitritos que se añade a los productos cárnicos, la mayor parte desarrolla una función antimicrobiana, mientras que sólo una pequeña fracción contribuye al color, al sabor, al aroma y a la estabilidad oxidativa del producto (EFSA, 2003).

La composición de la carne favorece el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, por ello, los productos cárnicos han requerido del uso de métodos eficaces para su conservación.

La conservación de la carne mediante curado es un método muy eficaz practicado desde hace siglos. Los productos cárnicos curados son muy diversos. Estos productos incluyen:

- curados frescos sin recibir tratamientos térmicos: crudos adobados (lomo adobado, costilla adobada) o sin adobar (chorizo fresco).
- curados tratados con calor, enlatados o no (lacón cocido)
- los curados crudos sometidos a maduración y secado y, opcionalmente, ahumado (embutidos madurados: chorizo, jamón serrano, cecinas, etc.).

Actividad antimicrobiana

La acción antimicrobiana de los nitrificantes es una de las funciones más destacables. Inicialmente, la adición intencionada de sales nitrificantes a los productos cárnicos se basó en la formación del color, pero más tarde se descubrió su importante acción antimicrobiana.

Mientras que el nitrato no presenta actividad antimicrobiana, si no que actúa como reserva de nitritos, el nitrito controla la proliferación *Clostridium botulinum* y la producción de su toxina, así como el crecimiento de bacterias putrefactivas causantes del deterioro de la carne. Los nitratos no tienen acción antimicrobiana por si solos, se reducen a nitritos por reducción microbiana.

En los productos curados, el efecto antimicrobiano de los nitritos depende de varios factores, como el contenido de sal, el pH, su concentración, la tensión de oxígeno, o la presencia de agentes reductores, de modo que su acción puede sumarse, potenciarse o anularse.

El mecanismo de inhibición microbiana de los nitritos se debe a la formación de sustancias reactivas a partir de su descomposición en ácido nitroso y posteriormente en óxido nítrico. El nitrito se transforma en ácido nitroso (HNO_2) en medio ácido. El ácido nitroso es muy inestable y se disocia rápidamente dando lugar a varias moléculas reactivas, que son las verdaderas responsables de la actividad antimicrobiana del nitrito.

El óxido nítrico (NO), presenta un electrón desapareado que le confiere gran capacidad de reacción con electrones desapareados de otros átomos y moléculas. En condiciones aeróbicas forma ONOO⁻ (Peroxinitrito), otra molécula reactiva.

El óxido nítrico también puede reaccionar con grupos tiol de aminoácidos y con iones metálicos de proteínas formándose S-nitrosotioles (S-NO) y complejos metálicos de nitrosilo, respectivamente, especies reactivas de nitrógeno. Estos dos compuestos, junto al N₂O₃, el N₂O₄ y los compuestos N-nitroso, son considerados potentes agentes nitrosantes y actúan de liberadores lentos de óxido nítrico, dilatando su vida, para que éste pueda interaccionar con otras biomoléculas.

Estas moléculas reaccionan con diversas moléculas de las bacterias como las proteínas hierro-azufre, aminoácidos, aminas, ácidos nucleicos y lípidos mediante N y S-nitrosilación, nitración, formación de puentes disulfuro, formación de compuestos nitrosil-hemo, interacción con radicales o por peroxidación lipídica. En consecuencia, se produce una interferencia con las funciones de proteínas (enzimas), membranas y ADN, lo que puede desencadenar la alteración del metabolismo energético, del transporte de nutrientes y de la multiplicación celular impidiendo su desarrollo.

Los microorganismos tienen diferente sensibilidad frente al nitrito. El nitrito ejerce una acción antibacteriana dirigida fundamentalmente a bacterias anaerobias, siendo su acción más importante la inhibición del crecimiento de *Clostridium botulinum*. Se trata de un bacilo Gram positivo anaerobio, productor de la toxina botulínica, agente causal del botulismo. El nitrito inhibe tanto el crecimiento de la forma vegetativa como de la toxina botulínica. Diversas teorías en relación a los mecanismos responsables de la actividad antimicrobiana de los nitritos frente a *Clostridium botulinum*:

- Formación de determinados compuestos a partir del nitrito y otros componentes de la carne, con capacidad para inhibir el crecimiento de *Clostridium botulinum*.
- Interferencia del nitrito con compuestos de la membrana, limitando el intercambio celular y el transporte de sustratos a través de ésta.
- Actuación del nitrito o de otros compuestos intermedios como agentes oxidantes de enzimas intracelulares y ácidos nucleicos.
- Secuestro por parte del nitrito, de hierro y de otros metales esenciales para el metabolismo del *Clostridium botulinum*. El hierro juega un papel importante en la actividad antibotulínica, puesto que diversos estudios demuestran que la adición a la carne de agentes quelantes de hierro como el EDTA, potencia la acción inhibidora del nitrito frente a este patógeno, mientras que incrementos en el contenido de hierro producen un descenso en esta actividad inhibidora.

La cantidad de nitrito necesaria para un control efectivo frente a *Clostridium botulinum* depende de cada tipo de producto, siendo el nivel de nitrito residual presente en el producto determinante para impedir su crecimiento.

También se ha demostrado el efecto inhibidor del nitrito sobre *Staphylococcus aureus* y *Salmonella spp.* Y que su utilización permite controlar importantes bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*: Durante el desarrollo del proyecto NITRARED se han realizado ensayos de inoculación de embutidos con *Listeria spp.* En ausencia de sales nitrificantes, *Listeria* se multiplicó durante la fase fermentativa, lo que motivó que los recuentos finales fueran similares a los iniciales. En presencia de nitrificantes se observó una inhibición desde

las primeras etapas del proceso de maduración, cuya dependencia de la concentración de nitratos y nitritos se hizo evidente a partir de la primera semana. Los recuentos finales fueron aproximadamente 1,5 log ufc/g mayores en los lotes con reducción de nitrificantes al 75 y 50% respecto del lote con el máximo permitido.

Las bacterias gran positivas como las acidolácticas y micrococáceas, reductoras de nitratos a nitritos, son resistentes a la acción de los nitritos, factor importante para el desarrollo de la flora microbiana fundamental en la elaboración de los embutidos. De igual modo, los enterococos (*Streptococcus faecium* y *S. faecalis*), todas las especies de lactobacilos y *Staphylococcus aureus* resisten bastante bien las concentraciones de nitrito habituales en los productos cárnicos.

Por el contrario, *Pseudomonas* spp., *E. coli* y coliformes, y todas las especies de bacilos se inhiben en mayor o menor grado en presencia de nitrito y sus efectos son potenciados a valores bajos de pH, en torno a 4,5-5,5 y en condiciones de anaerobiosis, como por ejemplo es el envasado al vacío.

Diversos estudios parecen demostrar que la actividad mínima de nitrito requerida para conseguir este efecto antimicrobiano es de alrededor de 120 mg/kg. La legislación europea establece actualmente una dosis máxima de 150 mg/kg.

Efecto de los nitritos en el color

El color frecuentemente se asocia a la evaluación de la calidad y el buen estado de conservación de los alimentos. La formación del color es un proceso complejo en el que intervienen sustancias de diversa naturaleza.

La coloración de la carne fresca depende principalmente de la mioglobina, una proteína que en estructura y en función se parece a la hemoglobina. La mioglobina es la encargada de transportar el oxígeno en el músculo vivo.

La mioglobina ésta está constituida por una proteína globular (globina), un grupo prostético (hemo) y un anillo porfirínico con un ión ferroso en el centro. Las propiedades y el color de este complejo dependen del estado del ión ferroso y el estado físico de la proteína.

La mioglobina tiene afinidad por el oxígeno. Cuando se combinan la mioglobina y el oxígeno, es decir, cuando esta se oxigena, se produce la oximioglobina, responsable del color rojo brillante de la carne.

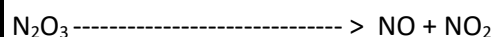
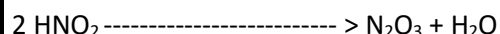
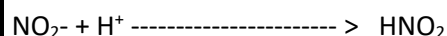
En cambio, cuando la mioglobina se oxida, o el oxígeno oxida el ión ferroso, se convierte en metamioglobina y la carne toma un color pardo característico de la carne almacenada por mucho tiempo.

Durante el proceso de curado a la carne fresca se le añaden sales curantes que contienen nitrificantes, los cuales, además de servir como agentes antimicrobianos y conservantes, le confieren un sabor y color característico.

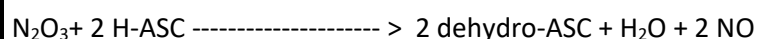
Inicialmente se asociaba esta coloración característica a los nitratos. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que en realidad era la forma reducida de los nitratos, los nitritos, los responsables.

El nitrato se reduce a nitrito por la acción de las nitrato reductasas, enzimas producidos por lactobacilos y enterobacterias, entre otras bacterias reductoras.

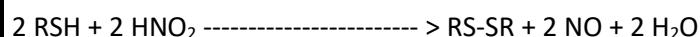
El nitrito primero se transforma en varios intermediarios, que darán lugar a óxido nítrico (NO), responsable del desarrollo del color. Uno de los intermediarios formados es el trióxido de dinitrógeno (N₂O₃) que se transforma en NO (óxido nítrico) según las siguientes reacciones:



Otra vía de formación del óxido nítrico es a partir de la reducción del trióxido de dinitrógeno (N₂O₃) con ascorbato:



Por otro lado, el nitrito también puede reaccionar con los grupos sulfhídricos de las proteínas y liberar óxido nítrico a través de una reacción de oxidación-reducción:



El óxido nítrico (NO) es el componente activo que se combina con la mioglobina del músculo para formar nitrosomioglobina (NO-MbFe+2), dando como resultado la fijación del color rojo característico de los productos cárnicos curados.



La cantidad teórica necesaria para convertir en nitrosomioglobina el 50% de la mioglobina presente es de 20 ppm de nitrito y la cantidad mínima de nitrito necesaria para producir un color adecuado en la carne y en los productos cárnicos se estima en unos 40-50 ppm aproximadamente, aunque puede estar condicionada por otros factores como la temperatura o características físico químicas de la pieza.

Las condiciones en las que se mantienen estos productos durante el almacenamiento hasta su venta (loncheado, tipo de envase, temperatura e iluminación) influye en la evolución de este pigmento y por lo tanto en su color.

Cuando la nitrosomioglobina (MbFe+2-NO) se somete a temperaturas de entre 50 y 60 °C la fracción proteica se desnaturaliza separándose del complejo nitroso-porfirínico, y se convierte en un compuesto llamado nitrosohemocromo, responsable de la coloración rosada característica de las carnes curadas cocidas, mas estable que la nitrosomioglobina.

La microbiota que no es destruida y por lo tanto resiste durante la cocción, permite que se mantenga un nivel mínimo de formación de nitritos a partir de nitratos, lo que suponen un aporte progresivo de los mismos durante la vida útil del producto. Este nitrito de nueva formación, contribuye a la estabilidad de color del producto al permitir una cierta regeneración del pigmento.

Debido a esta función como reservorio de nitritos, actualmente los nitratos son utilizados en la elaboración de productos cárnicos de larga curación. Por lo tanto, los nitritos se pueden generar a partir de la reducción del nitrato, o bien pueden ser añadidos directamente en la formulación.

Efecto en el sabor y aroma

La diferencia en el flavor de un producto curado y cocido respecto a ese mismo producto sin adición de nitrito es fácilmente detectable. El desarrollo de las características de flavor de los productos cárnicos curados es complejo, siendo el aspecto menos entendido.

El desarrollo del sabor y aroma de las carnes curadas depende de factores como la actividad microbiana, la actividad de las enzimas propias de la carne, los ingredientes utilizados y de fenómenos químicos como la oxidación lipídica y las reacciones del nitrito.

Estudios demuestran que a partir de la reacción de sustancias propias de la carne con el nitrito o con su forma más activa, el óxido nítrico, se general compuestos volátiles como el benzonitrilo y el fenilacetónitrilo, que contribuyen al aroma característico de los productos curados.

El benzonitrilo y el fenilacetónitrilo (compuestos aromáticos) también han sido identificados en productos curados sometidos a tratamiento térmico. Algunos nitrilos también han sido detectados en productos madurados, pero no de forma habitual, por lo que se puede relacionar la formación de estos compuestos con la aplicación de calor.

De forma indirecta, los nitratos y nitritos participan en el sabor y aroma de los productos curados mediante la modulación de la oxidación lipídica e incrementando la degradación de aminoácidos como la valina, leucina e isoleucina. Algunos estudios señalan que, en productos elaborados únicamente con nitratos, los compuestos volátiles derivados de la degradación de aminoácidos y de la fermentación de carbohidratos así como la reducción de la oxidación lipídica se incrementan en comparación con los elaborados con nitritos.

Este papel de los nitratos y nitritos en la formación del aroma de la carne se ve reforzado por estudios que señalan que la sustitución de los nitratos y nitritos por otros antioxidantes no da lugar a productos con el típico aroma de las carnes curadas.

Actividad antioxidante

El nitrito puede actuar a la vez como un compuesto altamente oxidante y reductor (sobre todo en forma de óxido nítrico).

Por un lado, el óxido nítrico puede oxidar metaloproteínas o promover la oxidación de proteínas y lípidos mediante la generación de peroxinitrito.

Por otra parte, su función como agente reductor, le confiere capacidad antioxidante que, al proteger a los lípidos del enranciamiento, modula la generación del sabor y aroma en los productos curados.

Se han propuesto diversos mecanismos que tratan de explicar la actividad antioxidante del nitrito y sus derivados. Algunos autores la atribuyen a la oxidación del óxido nítrico al óxido de nitrógeno, secuestrando así el oxígeno presente en la matriz cárnica.

Otros autores la atribuyen a la acción del óxido nítrico, que, al ser un compuesto lipofílico, se combinaría fácilmente con los radicales libres formados en la oxidación lipídica.

Los lípidos se oxidan por distintos mecanismos, siendo uno de los más importantes los que tienen lugar a través de la formación de radicales libres. El proceso se inicia por la presencia del oxígeno y posteriores

reacciones con producción de hidroperóxidos, ocasionando las reacciones de oxidación de las grasas. Estas reacciones de oxidación lipídica se ven potenciadas a través de los catalizadores, como los iones metálicos, ferrosos, férricos, cuprosos, entre otros, presentes en los productos cárnicos.

La propia nitrosomioglobina (NOMB) podría considerarse como un agente antioxidante, tanto por actuar como reservorio de óxido nítrico, como por su capacidad para desactivar radicales libres. Asimismo, la unión del óxido nítrico con el hierro del anillo de porfirina de la mioglobina o con complejos cisteína-hierro de otras proteínas evita que este ion metálico actúe de catalizador de la oxidación lipídica. La reacción de los pigmentos con el nitrito retiene el hierro en el hemo, a menudo en su forma reducida (Fe^{++}), lo que hace que no pueda actuar como catalizador. Los nitritos también actúan como potentes quelantes de metales, los cuales son uno de los principales compuestos prooxidantes de los lípidos en los productos cárnicos.

La inhibición de la oxidación por parte del nitrito y su repercusión en el aroma a curado tiene una mayor importancia en productos curados cocidos, donde por efecto de la temperatura las reacciones de oxidación se incrementan y por tanto sí tendría una importante repercusión el retraso de la oxidación y de la consecuente generación de aromas a rancio.

Sin embargo, en los productos cárnicos crudos curados las reacciones de oxidación se producen más lentamente al no darse temperaturas tan elevadas como en el caso de la cocción.

Aspectos legales del uso de nitratos y nitritos en los productos cárnicos curados

Los nitratos y nitritos están recogidos en la legislación de la UE como aditivos conservadores, permitiéndose el uso de nitrito potásico (E-249) y sódico (E-250) y nitrato sódico (E-251) y potásico (E-252).

En el año 2008, la UE aprobó el Reglamento 1333/2008 sobre aditivos alimentarios y posteriormente el Reglamento 1129/2011 transfirió los niveles y las demás condiciones de uso de nitratos y nitritos en productos cárnicos establecidos por la Directiva 2006/52/CE al anexo II del Reglamento 1333/2008, que se aplica desde el 1 de junio de 2013 (Comisión Europea, 2011).

El Reglamento 1333/2008 sobre aditivos alimentarios clasifica los derivados cárnicos en diferentes categorías. Así, establece las siguientes cantidades permitidas para el uso de nitratos y nitritos:

- **08. Carne**
 - **08.1 Carne fresca**, excluidos los preparados de carne: no permite nitritos/nitratos
 - **08.2 Preparados de carne**: carne fresca, incluida la carne que ha sido troceada, a la que se han añadido productos alimenticios, condimentos o aditivos, o que ha sido sometida a transformaciones que no bastan para alterar la estructura interna de la fibra muscular ni, por lo tanto, para eliminar las características de la carne fresca.
- Solo permite nitritos (150 añadidos) en lomo de cerdo adobado, pincho moruno, careta de cerdo adobada, costilla de cerdo adobada.
- No se permiten nitratos.

- **08.3 Productos cárnicos:** la superficie de corte muestra que el producto final ha dejado de poseer las características de la carne fresca. El Reglamento (CE) n.º 1333/2008 establece las siguientes categorías de cara al uso permitido de aditivos:
- **La categoría 08. 3. 1** incluye los productos cárnicos no sometidos a tratamiento térmico: Nitritos y nitratos: 150 añadidos
- **La categoría 08. 3. 2** comprende los productos cárnicos sometidos a tratamiento térmico. Nitritos 150 añadidos; 100 añadidos en los esterilizados. Nitratos no autorizados.
- **La categoría 08. 3. 3** se refiere las tripas, recubrimientos y decoraciones para carne.
- **La categoría 08. 3. 4** corresponde a los productos cárnicos tradicionales curados con disposiciones específicas para nitritos y nitratos. Las cantidades permitidas: Nitritos: de 150 a 180 añadidos; 50-175 residuales. Nitratos: 250-300 añadidos y 10-250 residuales.

Esta categoría incluye a su vez tres categorías de productos:

- **La categoría 08. 3. 4. 1**, de productos tradicionales que se sumergen en una solución de curado (productos cárnicos curados por inmersión en una solución de curado que contiene nitritos y/o nitratos, sal y otros componentes).
- **La categoría 08. 3. 4. 2**, de productos tradicionales curados en seco (el procedimiento de curado en seco supone la aplicación en seco a la superficie de la carne de una mezcla de curado que contiene nitritos y/o nitratos, sal y otros componentes, seguido de un periodo de estabilización y maduración).
- **La categoría 08. 3. 4. 3**, de otros productos curados por métodos tradicionales (procesos de inmersión y curado en seco utilizados conjuntamente, o inclusión de nitritos y/o nitratos en un producto compuesto, o inyección de la solución de curado en el producto antes de cocinarlo).

Restricciones o excepciones solo salchichón y chorizo tradicionales de larga curación y productos similares: maduración de treinta días como mínimo E 251-252 Nitratos 250 (40) (7) (59)

En 1995 la UE aprobó la primera directiva comunitaria sobre aditivos alimentarios distintos de colorantes y edulcorantes (Directiva 95/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, 1995), que se transpuso en España en el Real Decreto 145/1997 (Ministerio de Sanidad y Consumo, 1997).

En esta norma y en su posterior actualización (Real Decreto 142/2002, del Ministerio de Sanidad y Consumo) se recogían las cantidades añadidas indicativas y/o los niveles residuales para los nitratos y nitritos en los productos cárnicos.

En concreto, se establecían para los productos crudos curados en general, y sin hacer distinción entre ellos, cantidades añadidas indicativas de 300 mg/kg y 150 mg/kg y cantidades residuales en el punto de venta de 250 mg/kg y 50 mg/kg, para nitratos y nitritos, respectivamente.

Estos niveles se mantuvieron en posteriores modificaciones legislativas hasta que en el año 2006, la UE, tras un dictamen emitido por la EFSA (EFSA, 2003), modificó las autorizaciones en vigor con el objetivo de reducir los niveles de nitrosaminas, disminuyendo las concentraciones de nitratos y nitritos.

Así, la Directiva 2006/52/CE recogía las indicaciones de la EFSA y sustituía el término “cantidad añadida indicativa” por “cantidad máxima añadida” y eliminaba las cantidades residuales excepto para los productos tradicionales (Parlamento y Consejo Europeo, 2006).

Por otra parte, en 2008 se aprobó el Reglamento 889/2008 sobre la producción y etiquetado de los productos ecológicos (Comisión Europea, 2008). En esta norma se establecen unas cantidades añadidas indicativas de nitrato y nitrito de 80 mg/kg, y residuales máximas de 50 mg/kg para ambos (Tabla I.8).

Más recientemente la comisión ha propuesto una modificación integral de la regulación del uso de los aditivos nitrificantes en productos cárnicos.

La propuesta de la comisión de noviembre de 2021 era la siguiente:

NUEVOS LIMITES MÁXIMOS PROPUESTOS PARA NITRITOS Y NITRATOS (ÚLTIMA PROPUESTA EN ROJO)

	LEGISLACION ACTUAL	PROPUESTA ANTERIOR DE LA COMISIÓN EUROPEA MARZO DE 2021	ULTIMA VERSION DE LA COMISIÓN NOVIEMBRE DE 2021
NITRITOS (NO₂)			
08.2 Preparados de carne	150 añadidos En el caso español: solo lomo de cerdo adobado, pincho moruno, careta de cerdo adobada y costilla de cerdo adobada	NO AUTORIZADO	80 añadidos y 40 residuales ² En el caso español: solo lomo de cerdo adobado, pincho moruno, careta de cerdo adobada y costilla de cerdo adobada
08.3.1 Productos cárnicos NO sometidos a tratamiento térmico	150 añadidos	70 añadidos y 40 residuales ¹ 100 añadidos y 50 residuales ¹ , sólo para los productos fermentados con una aw superior a 0,94 [y/o grandes piezas curadas (que se definirán en mm y kg)] y/o con un contenido de sal inferior a 1,2 gr/kg	100 añadidos y 50 residuales ²
08.3.2 Productos cárnicos sometidos a tratamiento térmico	150 añadidos 100 añadidos en los esterilizados	100 añadidos y 50 residuales ¹ 60 añadidos y 35 residuales ¹ en los productos esterilizados	100 añadidos y 50 residuales ² 70 añadidos y 40 residuales ² en los productos esterilizados
08.3.4 Productos Tradicionales Curados	150-180 añadidos y 50-175 residuales	150 añadidos y 150 residuales ¹	150 añadidos y 50 - 150 ppm residuales ^{2 y 3}
NITRATOS			
08.2 Preparados de carne	NO AUTORIZADO	NO AUTORIZADO	NO AUTORIZADO
08.3.1 Productos cárnicos NO sometidos a tratamiento térmico	150 añadidos	120 añadidos y residuales ¹ 150 añadidos y residuales ¹ para embutidos sin nitritos añadidos	120 añadidos y residuales ² 150 añadidos y residuales ² para embutidos sin nitritos añadidos y piezas grandes de bacon
08.3.2 Productos cárnicos sometidos a tratamiento térmico	NO AUTORIZADO	NO AUTORIZADO	NO AUTORIZADO
08.3.4 Productos Tradicionales Curados	250-300 añadidos y 10-250 residuales	250 añadidos y 10-200 residuales ¹	250 añadidos y 10-200 residuales ^{2 y 3}

En dicha nueva reunión del Grupo de Trabajo de Aditivos de la Comisión Europea para tratar el tema de los nitrificantes, se ha elaborado una nueva propuesta sobre los nitratos y nitritos, destacando:

- Valores residuales: A diferencia de la versión anterior, en la que se proponía que los niveles residuales fuesen considerados únicamente como indicativos, en esta nueva propuesta se considera a los valores residuales como obligatorios. Los niveles residuales deben cubrir los nitritos/nitratos de todas las fuentes (especias, pimentón, etc.)

- Nitritos en los preparados de carne: La intención inicial de la Comisión Europea era prohibir el uso de nitritos en todos los preparados de carne. Sin embargo, en esta nueva versión la intención es seguir permitiendo el uso de nitritos en aquellos preparados de carne en los que actualmente están autorizados (en el caso español: solo lomo de cerdo adobado, pincho moruno, careta de cerdo adobada y costilla de cerdo adobada), aunque proponen reducir los niveles actuales permitidos, pasando de 150 ppm/kg a 80 ppm/kg.
- Productos cárnicos tradicionales: La normativa actual de aditivos contempla excepciones para el uso de nitrificantes en productos cárnicos tradicionales (dosis menos restrictivas). En la Categoría 08.3.4 “Productos cárnicos tradicionales curados con disposiciones específicas para nitritos y nitratos” se recogen los productos cárnicos tradicionales curados, las dosis máximas permitidas y las características para ser considerados como tradicionales (métodos y condiciones de curación). En esta categoría se citan algunos productos particulares y se añade la coletilla “y productos similares”, permitiendo cierta flexibilidad. En esta nueva versión la Comisión pretende eliminar la expresión “y productos similares”, por entender que esa mención dificulta la interpretación y labor de las autoridades de control oficial, dejando simplemente una lista cerrada de productos.
- Reducción de los niveles máximos añadidos de nitrificantes: La Comisión propone una reducción considerable de los niveles de nitratos y nitritos (principalmente en nitritos), aunque algo menos restrictivo que los contemplados en la versión anterior de marzo.

Propuesta final de la Comisión Europea sobre la revisión de los nitratos/nitritos:

La última propuesta de la Comisión de noviembre de 2022:

	LEGISLACION ACTUAL	PROPUESTA MARZO DE 2021	PROPUESTA NOVIEMBRE DE 2021 (SOMETIDA A CONSULTA PÚBLICA EN ABRIL DE 2022)	PROPUESTA NOVIEMBRE 2022
NITRITOS (NO₂)				
08.2 Preparados de carne	150 añadidos En el caso español: solo lomo de cerdo adobado, pincho moruno, careta de cerdo adobada y costilla de cerdo adobada	NO AUTORIZADO	80 añadidos y 40 residuales ³ En el caso español: solo lomo de cerdo adobado, pincho moruno, careta de cerdo adobada y costilla de cerdo adobada	100 añadidos y 50 residuales ⁶ En el caso español: solo lomo de cerdo adobado, pincho moruno, careta de cerdo adobada y costilla de cerdo adobada
08.3.1 Productos cárnicos NO sometidos a tratamiento térmico	150 añadidos	70 añadidos y 40 residuales ¹ 100 añadidos y 50 residuales ¹ , sólo para los productos fermentados con una aw superior a 0,94 [y/o grandes piezas curadas (que se definirán en mm y kg)] y/o con un contenido de sal inferior a 1,2 gr/kg	100 añadidos y 50 residuales ²	100 añadidos y 50 residuales ⁶
08.3.2 Productos cárnicos sometidos a tratamiento térmico	150 añadidos 100 añadidos en los esterilizados	100 añadidos y 50 residuales ¹ 60 añadidos y 35 residuales ¹ en los productos esterilizados	100 añadidos y 50 residuales ² 70 añadidos y 40 residuales ² en los productos esterilizados	100 añadidos y 50 residuales ⁶ 80 añadidos y 40 residuales ⁶ en los productos esterilizados
08.3.4 Productos Tradicionales Curados	150-180 añadidos y 50-175 residuales	150 añadidos y 150 residuales ¹	150 añadidos 50 - 150 ppm residuales ^{2 y 3}	150 ppm de añadidos 50 - 150 ppm de residuales ^{4, 5 y 6}

NITRATOS (NO3)				
	LEGISLACION ACTUAL	PROPUESTA MARZO DE 2021	PROPUESTA NOVIEMBRE DE 2021 (SOMETIDA A CONSULTA EN ABRIL DE 2022)	PROPUESTA NOVIEMBRE 2022
08.2 Preparados de carne	NO AUTORIZADO	NO AUTORIZADO	NO AUTORIZADO	NO AUTORIZADO
08.3.1 Productos cárnicos NO sometidos a tratamiento térmico	150 añadidos	120 añadidos y residuales ¹ 150 añadidos y residuales ¹ para embutidos sin nitritos añadidos	120 añadidos y residuales ² 150 añadidos y residuales ² para embutidos sin nitritos añadidos y piezas grandes de bacon	120 añadidos y residuales ⁷ 150 añadidos y residuales ⁷ para embutidos sin nitritos añadidos y piezas grandes de bacon
08.3.2 Productos cárnicos sometidos a tratamiento térmico	NO AUTORIZADO	NO AUTORIZADO	NO AUTORIZADO	NO AUTORIZADO
08.3.4 Productos Tradicionales Curados	250-300 añadidos 10-250 residuales	250 añadidos y 10-200 residuales ¹	250 añadidos 10-200 residuales ^{2 y 3}	250 añadidos 10-200 residuales ^{4, 5 y 7}

En 2017 la EFSA publicó dos opiniones científicas, evaluando la seguridad de los nitratos y los nitritos como aditivos alimentarios, concluyendo que los niveles de uso de estos aditivos, actualmente contemplados en la legislación de la UE, son seguros para los consumidores. Sin embargo, también se identificó que en ciertos subgrupos de población se superaba la Ingesta Diaria Admisible (IDA) de nitritos.

Este hecho, unido a que el nitrito está ligado a la posible formación de nitrosaminas, ha motivado a la Comisión a estudiar reducir los actuales niveles de uso de nitrificantes.

Si bien es cierto que la superación de las IDAs no puede achacarse solo al empleo de estas sustancias como aditivos, reducir su uso como tales es una forma efectiva para disminuir su ingesta en la dieta.

A continuación, se señalan los principales cambios desde la última propuesta de la Comisión de noviembre de 2021:

- Valores residuales: En un principio, la Comisión pretendía establecer los valores residuales de nitratos y nitritos como obligatorios. Finalmente se propondrá solamente niveles residuales obligatorios para los nitritos, mientras que para los nitratos serán simplemente indicativos, al menos hasta que la Comisión haya recopilado más información.

Los niveles residuales de nitritos serán obligatorios: Los niveles residuales cubrirán todas las fuentes y serán aplicables al final del periodo de curación. Los niveles se aplicarán durante toda la vida útil del producto.

Los nuevos niveles residuales para los nitratos serán sólo indicativos y podrán ser revisados en el futuro

- Nitritos en los preparados de carne: La intención inicial de la Comisión era prohibir el uso de nitritos en todos los preparados de carne. Sin embargo, parecen haber atendido la solicitud de seguir permitiendo el uso de nitritos en aquellos preparados de carne en los que actualmente están autorizados, aunque proponen reducir los niveles actuales permitidos, pasando de 150 ppm/kg a 100 ppm/kg. En su anterior propuesta del 11/2022 eran más restrictivos (80 ppm/kg).
- Productos cárnicos tradicionales: La normativa actual contempla excepciones para el uso de nitrificantes en productos cárnicos tradicionales (dosis menos restrictivas). En dicha categoría se citan

los productos y sus características, y se añade la coletilla “y productos similares”, permitiendo cierta flexibilidad. La Comisión pretendía eliminar dicha expresión, por entender que dificulta la interpretación y labor de las autoridades de control oficial, dejando simplemente una lista cerrada de productos. Finalmente, han decidido mantener dicha mención.

- Reducción de los niveles máximos añadidos de nitrificantes: La Comisión propone una reducción considerable de los niveles de nitratos y nitritos (principalmente en nitritos), aunque menos restrictivos que los contemplados en la versión anterior de 2021 y abril de 2022.

En los productos cárnicos no sometidos a tratamiento térmico, han pasado de la propuesta inicial de 70 ppm de nitritos añadidos a 100 ppm.

En los productos cárnicos esterilizados han pasado de la primera propuesta de 70 ppm de nitritos añadidos a 80 ppm en la última versión.

Además de las dosis máximas permitidas, la Comisión Europea también estuvo valorando otras cuestiones en relación a los nitrificantes, que se resumen a continuación:

- Concentración de sales de nitritos en sales de curado: La intención inicial de la Comisión Europea era establecer un nivel máximo de nitritos en la sal de curado utilizada (por ejemplo 0,6 % en general y 0,9% en alimentos con un contenido reducido en sodio), pero finalmente ha decidido retirar dicha propuesta y no establecer tal limitación.
- Forma de expresar los niveles de nitrificantes: Actualmente el Reglamento 1333/2008, sobre aditivos alimentarios, establece los niveles máximos de uso de nitritos y nitratos haciendo referencia al nitrito sódico o nitrato sódico (NaNO_2 y NaNO_3 respectivamente). Sin embargo, la intención es que en el futuro se expresen en forma de ión nitrato (NO_3) o ión nitrito (NO_2), puesto que la Ingesta Diaria Admisible (IDA) definida en la actualidad para estos aditivos se refiere a tales sustancias (misma forma que la utilizada en la evaluación de su seguridad).
- Uso obligatorio de otros aditivos junto a los nitrificantes: La Comisión Europea estaba valorando establecer como obligatorio emplear otros aditivos (como ascorbatos o eritorbatos) cuando se utilicen nitratos y nitritos, pero finalmente ha descartado esta opción.

Bibliografía

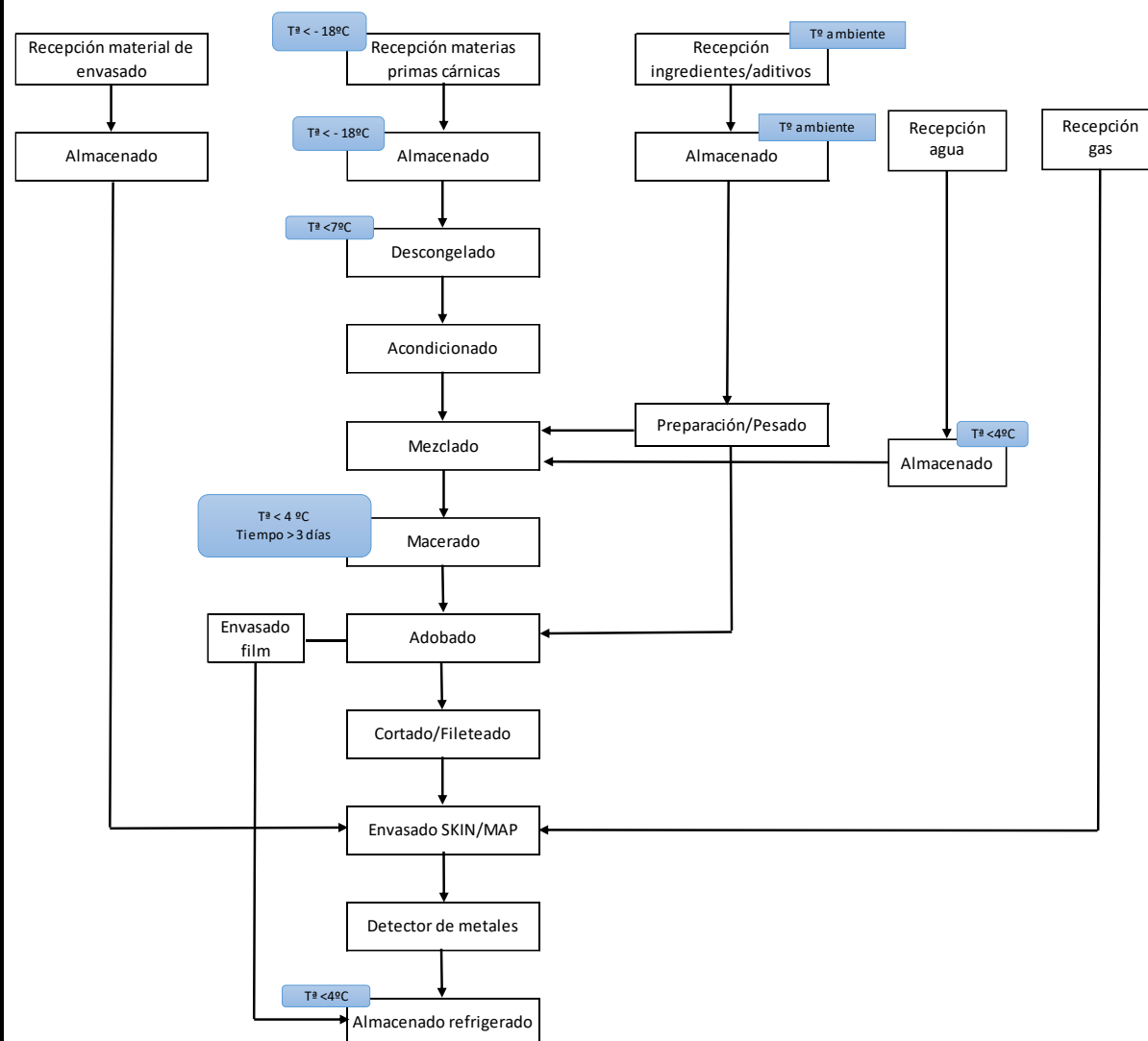
- Carballo, José. "Empleo de los nitratos y nitritos en la industria cárnica." (2012).
- Damodaran, Srinivasan, and Kirk L. Parkin. Química de alimentos de Fennema. Artmed Editora, 2018.
- EFSA (2003). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazard on the request from the Commission related to the effects of nitrates/nitrites on the microbiological safety of meat products. The EFSA Journal, 14, pp: 1-31. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2004.14>
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), et al. "Re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives." Efsa journal 15.6 (2017): e04786.

- EFSA. Nitrate in vegetables. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain (Question No. EFSA-Q-2006-071). EFSA J. 2008, 689, 1–79
- Frankel, Edwin N. "Recent advances in lipid oxidation." Journal of the Science of Food and Agriculture 54.4 (1991): 495-511.
- Haldane J. (1901). The red color of salted meat. J. Hyg., Camb. 1,115
- Hierro Paredes, Eva, and Manuela Fernández Álvarez. Estudio del efecto de la reducción del contenido de sales nitrificantes en la calidad microbiológica y aroma de los embutidos crudos curados. Diss. Universidad Complutense de Madrid, 2016.
- Hospital, X.F., Hierro, E., Fernández, M. 2012. Survival of *Listeria innocua* in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. International Journal of Food Microbiology 153, 395-
- Lehman K.B. (1899). Uber das Haemorrhodin, ein neues weitverbreitetes Blutfarbstoffderivat. Sber. Phys.-med.
- Londoño Pereira, Mateo, and Briana Davahiva Gómez Ramírez. "Nitratos y nitritos, la doble cara de la moneda." (2020).
- Martínez A., Haza A.I. y Morales P. (2000). N-nitrosaminas en los alimentos y riesgo para la salud (I). Alimentación Equipos y Tecnología. 7, 153-158.
- Molinero Sastre, Cristina. "Caracterización y optimización del proceso tecnológico de elaboración de la cecina de León." (2009).
- Nychas, G. J. E., and J. S. Arkoudelos. "Staphylococci: their role in fermented sausages." Journal of Applied Bacteriology 69.Supplement (1990).
- Ordóñez J, Anadón A, Arboix M, Centrich F, Juárez M, Palou A, et al. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre una cuestión planteada por la Dirección Ejecutiva de la AESAN, en relación con el riesgo de la posible presencia de N-nitrosaminas en productos cárnicos crudos adobados cuando se someten a tratamientos culinarios de asado o fritura. Rev del Comité Científico de la AESAN.2008; 8: 9-40.
- Polenski E. (1981). Uber den Verlust, welchen das Rindfleisch und Nahrwert durch das Pökeln erleidet, sowie über die Veränderungen salpeterhaltiger Pökellaken. Arb. K. Gesundheitsamt. 7, 471
- Restrepo, Jorge Andres Gallego. Fuente alternativa de nitratos para la industria cárnica: Influencia del extracto de apio y cultivos iniciadores sobre el color del jamón cocido tipo Medellín. Diss. Universidad Miguel Hernández, 2013.
- Richard Cammack, C.L Joannou, Xiao-Yuan Cui, Claudia Torres Martinez, Shaun R Maraj, Martin N Hughes, Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Volume 1411, Issues 2–3, 1999, Pages 475-488,
- Roberts T.A. y Dainty R.H. (1991). Nitrite and Nitrate as food additives: rationale and mode of action. En: Nitrates and Nitrites in food and water. Ed: Michael J. Hill. Ellis Horwood Series in Food and Technology. 113-130

- Scanlan R.A. (2003). Nitrosamines. En: Enciclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition). Eds: Caballero Benjamin, Trugo Luiz C. y Finglas Paul M. Elsevier Science Ltd, Oxford. 4142-4146.
- Sindelar, Jeffrey J., and Andrew L. Milkowski. "Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet." Nitric oxide 26.4 (2012): 259-266.
- Skibsted L.H. (1992). Cured meat products and their Oxidative Stability. En: The Chemistry of muscle-based Foods. Ed: Ledward D.A., Johnston D.E. y Knight M.K. The Royal Society of Chemistry. 266,287.
- Toldrá, Fidel, M-Concepción Aristoy, and Mónica Flores. "Relevance of nitrate and nitrite in dry-cured ham and their effects on aroma development." Grasas y aceites 60.3 (2009): 291-296.
- Ventanas, Sonia., et al. "Nitratos, nitritos y nitrosaminas en productos cárnicos (I)." Eurocarne 129 (2004): 1-15.
- Villamil-Galindo, Esteban Villamil-Galindo, and Andrea Marcela Piagentini. "El uso de Nitratos y Nitritos en la Industria cárnica, lo bueno, lo malo y el modelado matemático para optimizar su uso. Una revisión." Alimentos Hoy 29.56 (2021): 41-76
- Wood DS, Collins-Thompson DL, Usborne WR, Picard B. An Evaluation of Antibotulinal Activity in Nitrite-Free Curing Systems Containing Dinitrosyl Ferrohemochrome. J Food Prot. 1986 Sep;49(9):691-695.

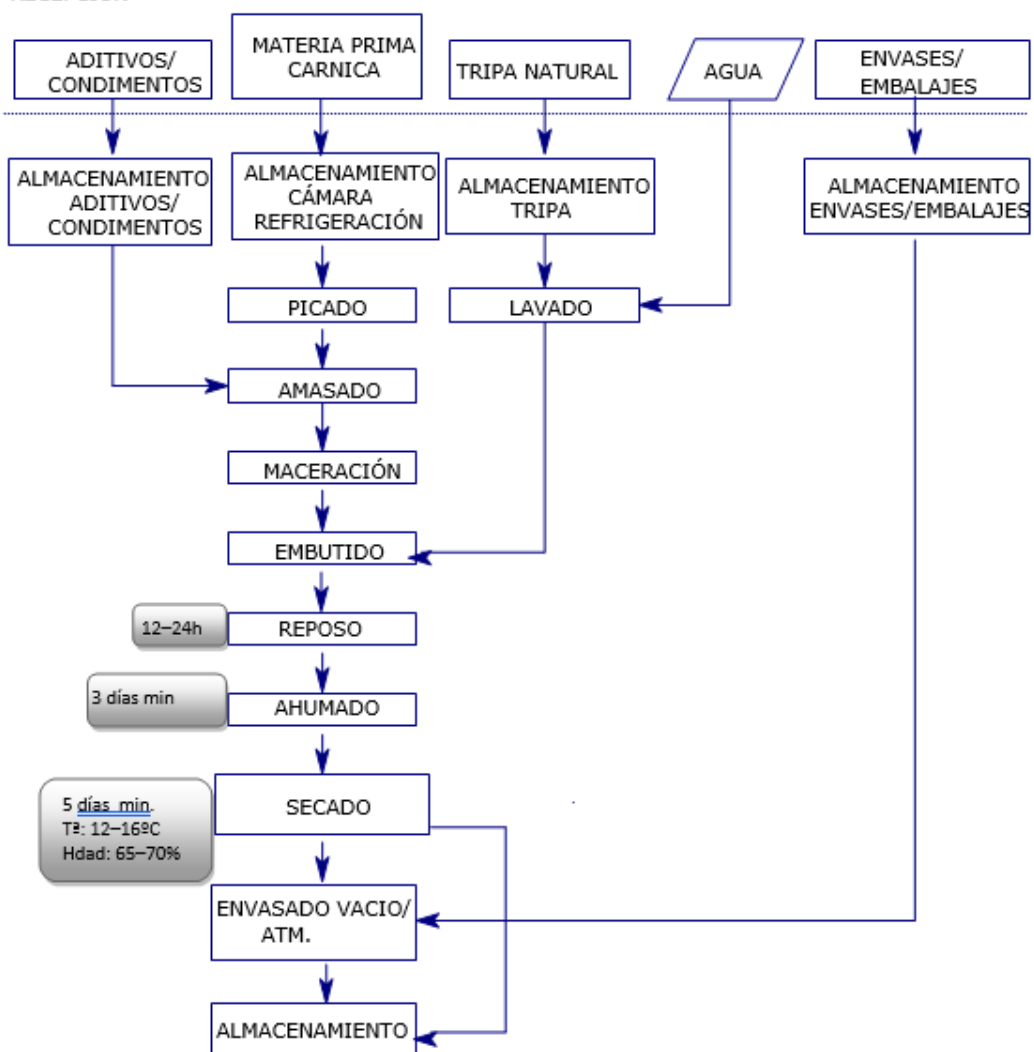
Etapas y parámetros tecnológicos de elaboración de los derivados cárnicos seleccionados:

LOMO Y COSTILLA ADOBADOS:



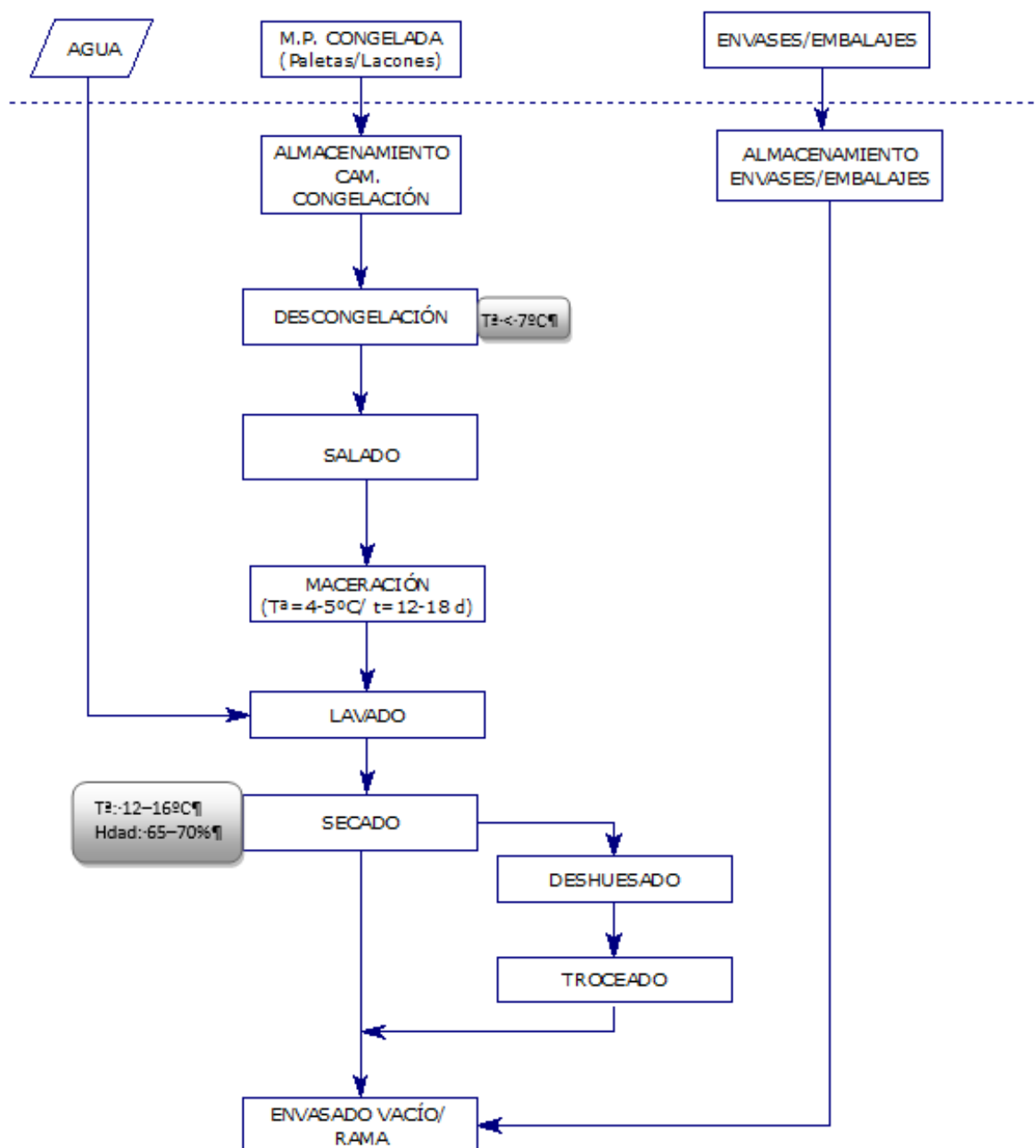
CHORIZO ASTURIANO

RECEPCIÓN



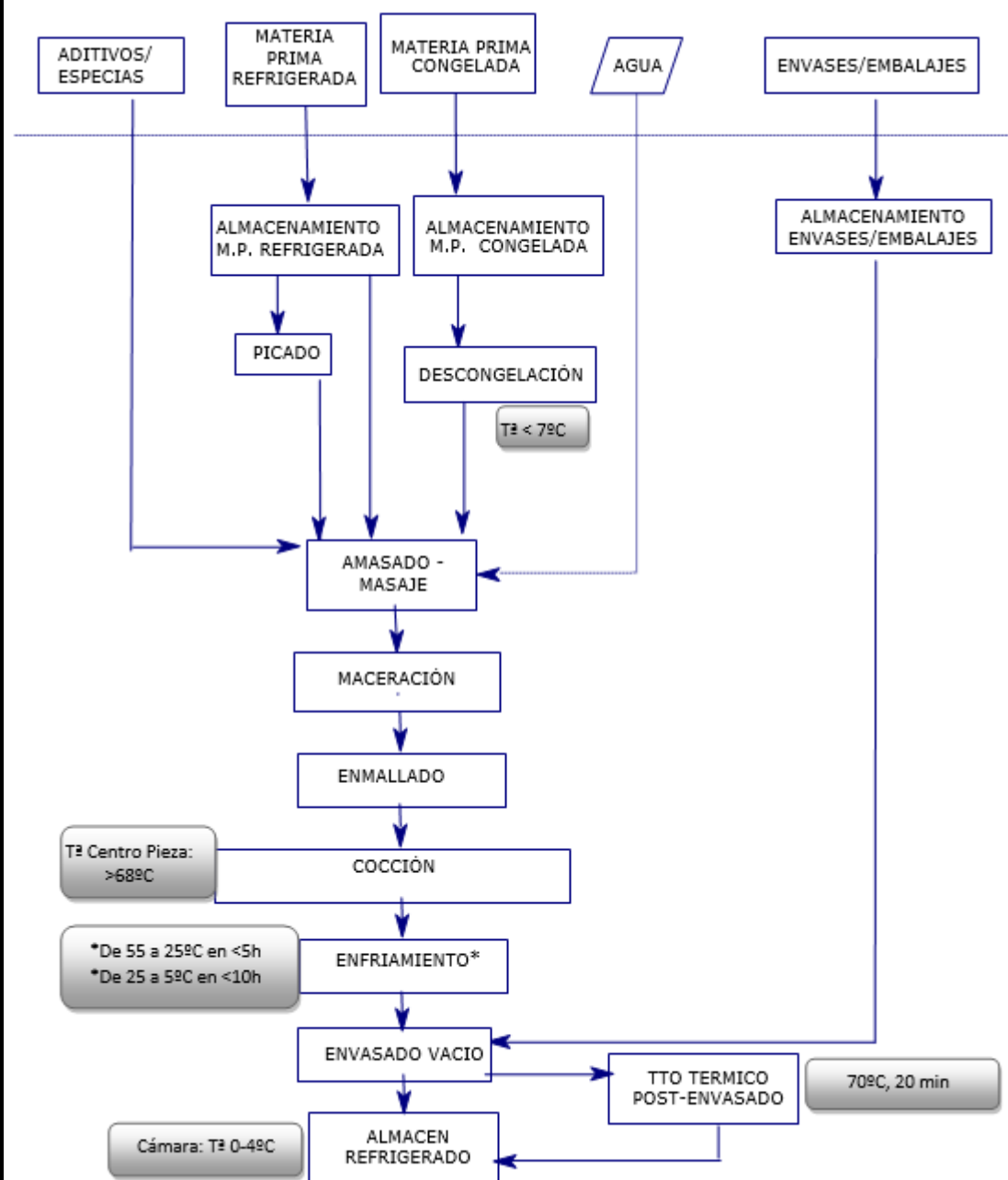
LAON CURADO

RECEPCIÓN

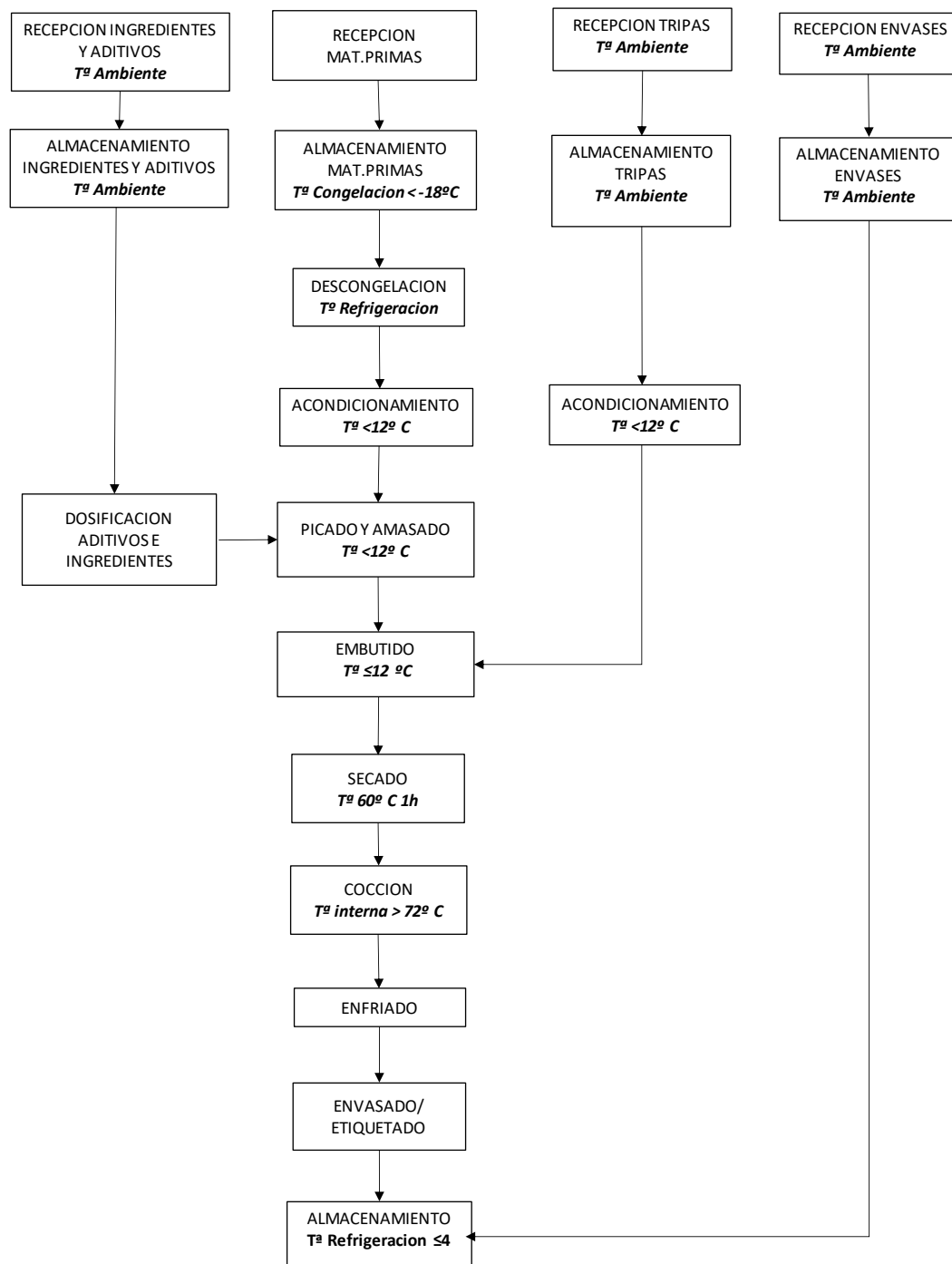


LACON COCIDO:

RECEPCIÓN



CRIOLLO COCIDO:



Tarea 1.2 Búsqueda de estrategias en función de las necesidades tecnológicas identificadas.

A la hora de reducir o eliminar el uso de los nitritos en los productos cárnicos hay que tener en cuenta las funciones que estos aditivos realizan. Los nitritos, además de un efecto antimicrobiano frente a microorganismos patógenos como *Clostridium botulinum* y otros patógenos, participan en el desarrollo y estabilidad del color, del olor y del flavor y tienen un efecto antioxidante.

En el desarrollo de esta tarea se ha realizado una búsqueda bibliográfica de las principales estrategias tecnológicas en relación con la reducción o eliminación de los aditivos nitrificantes en derivados cárnicos.

- Estrategias químicas:

Están basadas en el empleo de aditivos alternativos o ingredientes naturales que aporten unas funcionalidades tecnológicas análogas a los nitritos, de manera que sean sustitutos de forma total o parcial:

- Aditivos colorantes: Curcumina, ácido carmínico, caramelo natural, caroteno, extracto de pimentón y rojo remolacha. Los mejores resultados en el color se obtienen con el empleo de betanina.

Annato (bixina y la norboxina) para reducir los niveles de nitritos y obtener un color aceptable se recomienda la utilización conjunta de nitrito sódico (< 80 mg/kg) y annato. En productos cocidos (lacón cocido, criollo cocido) la utilización de annato presenta varios inconvenientes: al pH de este producto su coloración es amarilla, colorea las grasas y es poco estable en presencia de luz.

El extracto de remolacha presenta buenos resultados en productos frescos, pero su carácter termolábil condiciona su empleo en productos cárnicos cocidos

- Extracto de tomate ó Licopeno: permite la obtención de un tono rojo-marrón en productos fermentados. La utilización conjunta de extracto de tomate y una cantidad reducida de nitritos (<100 mg/kg) no modifica las propiedades organolépticas de los productos.

La utilización de derivados de tomate en productos cárnicos cocidos no es muy recomendable, ya que implica una disminución del pH lo que puede afectar de manera negativa a la capacidad de retención de agua, al rendimiento y a la aparición de defectos en las características sensoriales.

- koi rojo, colorante natural: se produce por el crecimiento de un moho *Monascus spp.* en arroz cocido. Se utiliza como colorante natural ya que estos mohos excretan un pigmento hidrosoluble de color rojo. En productos elaborados con <50 mg/kg de nitritos y con 1,5% de koi rojo pueden resultar con un color rojo oscuro,
- Colorante: Complejo protoporfirina-IX: la adición de este complejo a la carne implica la aparición de una coloración roja más oscura, aunque durante el proceso de cocción se transforma en marrón, debido a la ausencia de hierro en el compuesto protoporfirina-IX.
- Colorante: pigmento nitrosilhemocromo: formado a partir de extractos hemínicos de glóbulos rojos, en presencia de nitrito sódico y de ácido ascórbico. En los productos cárnicos cocidos en los que añadieron este compuesto se observó un color similar al

que se produce cuando se emplea nitrito sódico; sin embargo, en algunos casos se han detectado nitrosaminas.

- Hemopigmentos obtenidos a partir de glóbulos rojos de sangre de cerdo, incorporados en los derivados cárnicos favorecen la formación de color a partir de su reacción con el nitrito sódico. Se trata de compuestos muy sensible a la oxidación por la acción de la luz en presencia de oxígeno.
- Extractos vegetales sin aporte de nitritos: con propiedades antimicrobianas y antioxidantes. (ver apartado antioxidantes naturales).
- Ácidos Orgánicos y sus sales: Los ácidos orgánicos como el láctico, acético o cítrico, entre otros, tienen el gran inconveniente de modificar el pH del alimento sobre el que se aplica, lo que induce a cambios en el color, aroma, etc. Por este motivo, desde hace tiempo se ha trabajado sobre la sal, no sobre el ácido, por lo que se tiende a aplicar lactato, acetato, citrato o cualquier otra sal de este grupo.

El lactato de sodio es una sal que actúa como un ácido no disociado, pasa a través de la membrana microbiana para acidificar el interior celular. Además, también reduce la actividad del agua. Presenta capacidad de extender la vida útil de los productos cárnicos, debido a que tienen propiedades bactericidas y bacteriostáticos, inhibiendo el crecimiento de bacterias psicotrópicas aerobias y bacterias ácido-lácticas durante el almacenamiento refrigerado, manteniendo el color y las propiedades sensoriales.

El lactato mejora la palatabilidad de los productos cárnicos, y se postula como uno de los principales aditivos químicos sustitutos de los nitritos en los derivados cárnicos.

El lactato de sodio en combinación con los acetatos de sodio previene alteración prematura de los derivados causada por el microbiota alterante.

La aplicación en alimentación de ácidos fumárico, propiónico y acético es limitada, debido a que todos ellos poseen un fuerte olor y sabor. El diacetato sódico, es un potente antimicrobiano. Varios estudios indican que utilizado a niveles de 0,2% y más elevados, inhibe el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Sin embargo, estudios sensoriales señalan que dosis de uso tan elevadas producen un impacto inaceptable sobre el olor y sabor del producto final. Desde el punto de vista sensorial, el nivel máximo de utilización se situaría entre 0,10 y 0,12%.

- Antioxidantes sintéticos: Los antioxidantes son compuestos que pueden retardar o impedir la oxidación de los lípidos u otras moléculas por inhibición de la iniciación o propagación de las reacciones oxidativas. Los antioxidantes contrarrestan la oxidación de dos maneras diferentes; por ejemplo, protegiendo los lípidos objeto de la oxidación de iniciadores o por instalación en la fase de propagación. En el primer caso, los así llamados antioxidantes preventivos impiden la formación de las especies reactivas del oxígeno o atrapan las especies responsables de iniciar la oxidación. En el segundo caso, los llamados antioxidantes de rompimiento de cadena interceptan los radicales propagadores de la oxidación o participan indirectamente en detener la reacción de propagación. Dentro de los antioxidantes sintéticos más usados en

alimentos se encuentran el hidroxitolueno butilado (BHT), el hidroxianisol butilado (BHA), la butilhidroquinona (TBHQ) y el galato de propilo.

Sin embargo, estos antioxidantes tienen la desventaja de que son volátiles y se descomponen fácilmente a altas temperaturas. Además, han sido fuertemente cuestionados en torno a su seguridad y toxicidad, su uso está cuestionado desde el punto de vista de la seguridad alimentaria ya que diversos estudios clínicos han comprobado el efecto tóxico de estos aditivos sintéticos, cuyo uso ha sido regulado y restringido, ya que se comprobó que niveles altos de BHT, BHA y TBHQ pueden actuar como agentes promotores del cáncer y/o teratógenos, producir un aumento significativo del hígado y una marcada proliferación del retículo endoplásmico, debido a esto en la actualidad el interés en el desarrollo y uso de antioxidantes naturales ha tenido un incremento marcado.

- Antioxidantes naturales: la mayoría de los antioxidantes naturales evaluados para productos cárnicos están extraídos de plantas aromáticas o especias, que contienen compuestos químicos que exhiben propiedades antioxidantes, tales como polifenoles, vitamina C y vitamina E. Los extractos crudos de frutas, hierbas, vegetales, cereales y otras plantas, ricas en compuestos fenólicos, han incrementado el interés debido a que retardan la degradación oxidativa de los lípidos y, además, proveen calidad y valor nutricional al alimento.

La forma más fácil de conseguir la extracción de los antioxidantes naturales es eliminar el agua con secado y posteriormente realizar la extracción de las sustancias activas, para lo cual se usan solventes tales como metanol, hexano, etanol, acetona, entre otros. Muchos de estos extractos son preparados por hidrodestilación para eliminar sabores indeseables del material de las plantas. Luego se usan solventes acuosos que previenen problemas de solubilidad y residuos de solventes orgánicos. Una de las principales desventajas de los antioxidantes naturales es su escasa resistencia frente al oxígeno, especialmente cuando están expuestos a la acción de la luz, temperaturas elevadas o secado. La bibliografía disponible señala que los extractos y sustancias con propiedades antioxidantes (orégano, romero, salvia, té verde, café verde, piel de uvas, entre otros) adicionadas en productos cárnicos durante su elaboración han presentado buenos efectos sobre las propiedades tecnológicas y de conservación de los mismos; controlando la aparición, entre otros, de sabores a recalentado (WOF).

Antioxidantes hidrofóbicos:

Tocoferoles: Actúa como protector de las moléculas lipídicas, su acción consiste en proteger de la peroxidación a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana celular y en inhibir la peroxidación de las lipoproteínas. También: neutraliza el oxígeno, captura radicales libres hidroxilos, neutraliza peróxidos y captura el anión superóxido para convertirlo en formas menos reactivas.

Antioxidantes hidrofílicos

Ácido ascórbico: es un importante antioxidante hidrosoluble que actúa potenciando el efecto de otros antioxidantes como los tocoferoles. Sus principales funciones son neutralizar el oxígeno, capturar radicales hidroxilos y aniones superóxido y regenerar la forma oxidada de los tocoferoles.

Compuestos fenólicos o polifenoles; son componentes naturales de plantas, frutas y verduras. Han demostrado tener propiedades antioxidantes frente a la oxidación de lípidos y proteínas en derivados

cárnicos. La actividad antioxidante se debe principalmente a que pueden actuar eliminando radicales libres o como agentes quelantes de metales. Algunos de estos compuestos fenólicos pueden regenerar otros antioxidantes y actuar de forma sinérgica con ellos. La utilización de antioxidantes naturales permite prolongar la vida útil del producto lo que radica en un aumento de la estabilidad del color, así como mantiene sus condiciones organolépticas inalterables ralentizando fenómenos oxidativos como el enranciamiento del producto o aumentando la resistencia frente al crecimiento bacteriano, pues los antioxidantes de naturaleza polifenólica poseen actividad antimicrobiana.

Los extractos de plantas ricos en compuestos fenólicos parecen ser los mejores candidatos para su uso como antioxidantes en productos cárnicos ya que se obtienen fácilmente a partir de fuentes naturales y además evitan la aparición de fenómenos oxidativos. Destacando: el extracto de romero, aceites esenciales de romero, compuestos extraídos a partir de aceites esenciales de orégano, borraja y salvia. Los compuestos tipo terpeno-fenoles aislados de especias y/o hierbas aromáticas poseen gran capacidad antioxidante, siendo especias como el romero, la salvia, el clavo y el orégano las más eficaces frente a las reacciones de oxidación.

- **Estrategias físicas:**

Estrategias físicas, se basan en tratamientos tecnológicos para optimizar la vida útil y/o las propiedades organolépticas de los derivados cárnicos, como pueden ser las altas presiones hidrostáticas, la optimización de tratamientos térmicos postenvasado en productos cocidos, optimización y rediseño de las etapas de elaboración como salazón y maduración de los productos crudo curados, etapas de maceración en los frescos, optimización de sistemas de envasado, etc.

Optimización y rediseño de etapas de elaboración: según cada tipo de derivado cárnico: Adición directa de aditivos/ingredientes funcionales en la elaboración de derivados adobados, eliminando la etapa de salmuerizado y prolongando la etapa de adobado.

Salado en condiciones de vacío en productos cárnicos de pieza entera como el lacón, para acelerar el proceso de salado hacia el interior de las piezas.

Congelación previa en productos crudo-curados de pieza entera para favorecer el salado y posterior secado.

Modificación de las condiciones de temperatura de las etapas de maceración, incrementando la temperatura para favorecer el proceso de reducción del nitrito a NO y posterior reacción para la formación de nitrosomioglobina.

Incorporación de etapas dirigidas de estufaje bajo control de pH en el caso de embutidos crudo curados.

Tratamientos térmicos: la industria de la carne utiliza la pasteurización (65°C a 75°C) como método de conservación con la finalidad de inhibir enzimas y eliminar los microorganismos vegetativos, sin embargo, su efecto es limitado en la inhibición de esporas bacterianas, especialmente de *Clostridium spp.*

Altas presiones Hidrostáticas (APH): Las Altas Presiones Hidrostáticas (APH) es una de las nuevas tecnologías de conservación útiles para reducir el contenido de nitritos en productos cárnicos. La tecnología de APH está siendo aplicada de manera creciente para producir alimentos seguros y de alta calidad con efectos mínimos en las características sensoriales y nutricionales. En productos cárnicos se ha

estudiado el efecto de las APH con el propósito de mejorar la seguridad microbiológica. Las investigaciones incluyen la inhibición de microorganismos alterantes (Enterobacterias y BAL), psicrófilos (principalmente *Pseudomonas*) y patógenos (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*) que están asociados con el deterioro del alimento o pueden causar problemas de salud. La alta presión afecta substancialmente la membrana celular de los microorganismos, provocando alteraciones en la permeabilidad, sistema de respuesta osmótica. La barosensibilidad celular es característica del tipo de microorganismo y sus condiciones de crecimiento. Sin embargo, la pasteurización con alta presión tiene retos sustanciales, debido a la protección microbiana que aportan las matrices alimentarias ricas en nutrientes (proteínas, lípidos y carbohidratos, vitaminas) como es el caso de los productos cárnicos.

Microorganismo	Sustrato	Condiciones de tratamiento	Inactivación (log ₁₀ unidades de reducción)	Referencias
Esporas de <i>C. botulinum</i> tipo E (Alaska)	Amortiguador de fosfatos (0.067 M, pH7)	827 MPa/50°C/ 5min	5	Reddy y col. (1999)
Esporas de <i>C. sporogenes</i>	Pechuga de pollo	680 MPa/80°C/ 20 min	2	Crawford y col. (1996)
<i>B. stearothermophilus</i>	Agua	600 MPa/5°C/ 70 min x 6 ciclos	5	Hayakawa y col. (1994)
<i>C. sporogenes</i>	Emulsión de carne	621MPa/98°C/5min	>5 (<i>C. sporogenes</i>)	Wilson y Baker (2001)
<i>B. subtilis</i>			>9 (<i>B. subtilis</i>)	
Esporas de <i>B. stearothermophilus</i>			>10 (<i>B. stearothermophilus</i>)	
HIV-1	Medio de cultivo	550 MPa/25°C/ 10 min	Infectividad reducida por >4 log ₁₀	Otake y col. (1997)
Calicivirus felino	Cultivo de tejido	275 MPa/21°C/ 5 min	50% de los cultivos con una dosis infecciosa de 7 log ₁₀ fueron inactivados completamente	Kingsley y col. (2002)
Hepatitis A	Cultivo de tejido	450 MPa/21°C/ 5 min	>6 log ₁₀ reducción en unidades formadoras de plaquetas	Kingsley y col. (2002)
<i>Salmonella Senftenberg</i> 775W	Alimento	340 MPa/23°C/ 10 min	< 2	Metrick, Hoover y Farkas (1989)
<i>Escherichia coli</i> O157: H7 NCTC 12079	UHT leche Y Carne de ave	600 MPa/20°C/ 15 min	< 2 y 3	Patterson y col. (1995)
<i>Campylobacter jejuni</i>	Pudín de puerco	300 MPa/25°C/ 10 min	6	Shigehisa y col. (1991)
<i>Staphylococcus aureus</i>	UTH leche	600 MPa/20°C/ 15 min	2	Patterson y col. (1995)
	Carne de ave		3	
<i>Listeria monocytogenes</i>	UTH leche	375 MPa/20°C/ 15 min	<1	Patterson y col. (1995)
	Carne de ave		2	
<i>Listeria innocua</i>	Jamón cocido cerdo	550MPa/40°C/4min	4	Resultados inéditos
		550 MPa/55°C/10min	3.1	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> O3:K6	Ostras	300 MPa/10°C/ 3min	5	Cook (2003)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Pudín de puerco	300 MPa/20°C/ 10 min	2	Shigehisa y col. (1991)

Sensibilidad de algunos patógenos a altas presiones hidrostáticas (Patterson, 2005; Norton y Sun, 2008).

Electrones acelerados (EA): El tratamiento con EA (ionización electrónica) se considera una de las tecnologías no térmicas más adecuadas para higienizar alimentos, por su facilidad de aplicación, la posibilidad de hacerlo de forma continua en alimentos ya envasados y su capacidad para tratar un número muy elevado de producto en tiempos cortos. Además, es una tecnología barata (aproximadamente 0,10 euros/envase de 250 g), no requiere operaciones preparativas ni de postproceso y ofrece resultados repetitivos.

De acuerdo con las recomendaciones de las organizaciones internacionales (FAO, OMS, OIEA), a las que la AESAN se adhirió hace unos años, la dosis máxima autorizada es de 10 kGy. El poder bactericida de los EA se basa en el daño producido a moléculas vitales, normalmente los ácidos nucleicos, de los microorganismos (efecto directo) que mueren cuando no pueden reparar la lesión. A esto se une el efecto

de los radicales libres generados en la radiolisis (efecto indirecto), sobre todo a partir de moléculas de agua. El poder de penetración (5-8 cm en productos cárnicos) de los EA es menor que el de la radiación gamma y rayos X, pero suficiente para franquear el material de los envases comerciales de estos productos.

Uno de los factores limitantes de la aplicación de un determinado tratamiento es su repercusión en las características sensoriales del alimento. Las radiaciones ionizantes pueden originar cambios en el olor, color y sabor del producto con un impacto significativo en su aceptación por el consumidor. La máxima dosis que puede aplicarse es aquella que garantice un producto final con características sensoriales similares a las de un producto sin irradiar.

La aplicación de EA, aparte de inactivar hasta niveles seguros las bacterias patógenas, reduce también el número de bacterias alterantes, que se traduce en un aumento de la vida útil.

En general, con dosis ≤ 2 kGy, apenas se ve afectado el flavor, sin que se diferencien significativamente los productos tratados de los controles. En cambio, con dosis próximas a 3 kGy, se han apreciado modificaciones ligeras en el sabor y olor del alimento recién tratado que, normalmente, se disipa durante su almacenamiento. En productos a base de carne fresca con elevado contenido en mioglobina, como el vacuno, el tratamiento, aun siendo a bajas dosis, ocasiona una oxidación de la mioglobina a metamioglobina, adquiriendo un color pardo que sería cuestionable para el consumidor.

Pulsos de Luz: La utilización de tecnologías no térmicas para la inactivación microbiana ofrece interesantes posibilidades para asegurar el cumplimiento de los criterios establecidos por la legislación. Entre estas tecnologías se encuentran los pulsos de luz (PL). Se trata de destellos de luz blanca de amplio espectro (200-1.000 nm) y corta duración (10–3-102 ms) que se generan mediante la acumulación de energía en un condensador y su liberación rápida. La luz emitida abarca desde la región UV hasta el infrarrojo cercano, correspondiendo aproximadamente el 40% de la radiación emitida a la fracción UV, que es la principal responsable de la inactivación microbiana, debida a la formación de dímeros en la cadena de ADN.

En los alimentos sólidos, dada la escasa penetración de la luz, la descontaminación tiene lugar en la superficie, por lo que esta tecnología puede ser adecuada para la higienización de algunos productos cárnicos.

La eficacia del tratamiento con PL depende no sólo de la energía aplicada, sino también de la topografía superficial. Así, la presencia de rugosidades y fisuras puede crear zonas de sombra que protejan a los microorganismos de los efectos letales del tratamiento. Los productos cocidos y crudos-curados muestran una superficie más firme que la de la carne cruda, en la que los microorganismos pueden encontrar un mayor número de cavidades donde alojarse y protegerse de la luz. En algunos productos, la fluencia que proporcionó el mayor grado de inactivación modificó en cierta medida las propiedades sensoriales, con la aparición de una ligera decoloración, acompañada de notas azufradas o ácidas según el producto.

La tecnología PL se puede integrar fácilmente en las líneas de procesado y a un coste admisible. Además, habría que considerar el incremento de la vida útil que puede proporcionar en algunos productos cárnicos.

Sistema de envasado:

Envasado en vacío se considera el sistema de envasado de elección en este tipo de derivados cárnicos: sistema basado en la ausencia de aire, que mejora sustancialmente la presentación del producto y evita la aparición de exudados. La ventaja que aporta la ausencia de aire a la hora de minimizar la proliferación de

microorganismos aerobios y en el control de los fenómenos de oxidación. Requiere el uso de bolsas de envasado o film alta barrera al oxígeno.

Estrategias biológicas:

En relación con el diseño de procesos biotecnológicos para la reducción de nitrificantes se ha revisado bibliografía relacionada. Se ha comprobado que existen procesos biotecnológicos capaces de limitar el uso de nitrificantes, pero en todos los casos analizados, mediante el efecto sinérgico junto con otras estrategias que permitan mantener los estándares de calidad vinculados a los aspectos sensoriales del producto, a la par de un afianzamiento de la seguridad alimentaria en el producto final.

En la mayoría de los estudios se parte de la necesidad de la búsqueda de nuevos cultivos iniciadores por medio de los cuales se consigan unas adecuadas característica organolépticas y tecnológicas para el desarrollo de productos cárnicos. Es además bien conocido el efecto de los cultivos iniciadores y su adecuado uso en la mejora de la seguridad alimentaria de este tipo de productos. La mejora de la seguridad alimentaria viene dada por una disminución del pH, producción de ácidos orgánicos, competencia con microbiana con alterantes y/o patógenos y producción de bacteriocinas. La producción de bacteriocinas por cultivos iniciadores puede beneficiar a estas cepas en interacciones competitivas con bacterias patógenas de la matriz alimentaria.

Hay diferentes fuentes de recursos biológicos para la consecución de este objetivo, bien a partir de aislados obtenidos directamente de otros embutidos crudo curados o bien aislados de otros productos fermentados. Así, diferentes cepas descritas pertenecientes al género *Lactobacillus*, tales como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus sakei* aisladas de kimchi han sido probadas como cultivos iniciadores en la elaboración de embutidos fermentados y con capacidad de tolerar concentraciones de nitrato/nitrito con una buena capacidad de reducción de nitrito.

También bacterias ácido lácticas aisladas de un producto cárnico tradicional y pertenecientes a las especies *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus sakei* han presentado una excelente capacidad de reducción de nitritos a la par que se consolidan como microbiota dominante frente a otros microorganismos bien patógenos o bien alterantes y demostrando una reducción significativa en la reducción de nitrificantes durante el periodo de maduración. En este caso los productos obtenidos mostraban un producto sensorialmente más deseable, una mejor textura durante la maduración, mejor seguridad alimentaria y un mejor control de los nitritos residuales.

En general se excluyen cepas heterofermentativas y aquellas que no son capaces de proliferar en las condiciones tecnológicas de elaboración de los productos cárnicos. Otras cepas menos habituales en estos procesos podrían ser *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus alimentarius* o *Lactobacillus versmoldensis*.

Como se ha comentado anteriormente muchas bacterias ácido lácticas, además, son productoras de bacteriocinas lo que ofrece potencial aplicación en la seguridad alimentaria y por tanto desde este punto de vista se podrían reducir las sales nitrificantes añadidas al producto, manteniendo los estándares de

seguridad alimentaria. Además, muchas de estas bacterias poseen un espectro de inhibición bastante amplio, lo que las convierte en excelentes candidatas en las estrategias de conservación.

En uno de los estudios evaluados se exploraron los efectos positivos de sustitución parcial del nitrito de sodio por la cepa *Lactobacillus plantarum* para la reducción del contenido de nitrito y de aminas biógenas, mejorando el color y la textura del producto. Así, las cepas seleccionadas deben poseer las enzimas nitrato y nitrito reductasa, que permiten reducir el nitrato a nitrito. Se ha comprobado que la combinación de *L. plantarum* con niveles bajos de nitrito de sódico podría ser una estrategia potencial para la producción de productos cárnicos más saludables y de alta calidad, manteniendo las características sensoriales vinculadas al color y la textura.

En otro estudio analizado se evalúa el efecto de cepas ácido lácticas seleccionadas sobre la calidad tecnológica y la estabilidad microbiológica en carne de ave separada mecánicamente y curada con una cantidad reducida de nitrito de sodio. Nuevamente se emplearon cepas de *L. plantarum* y/o *L. brevis*. Se demostró que la reducción de las sales nitrificantes no tuvo un efecto negativo en la calidad tecnológica del producto. En este caso la cepa empleada de *L. brevis* tuvo un efecto positivo en el nivel de pigmentos nitrosilo.

Las estrategias biotecnológicas pasan por el uso de cultivos iniciadores ya sean de carácter comercial o autóctonos y de diferentes fuentes u orígenes. En general, los requisitos de estos cultivos serían:

- Pertenecientes al grupo de las bacterias ácido lácticas y que se consoliden como microbiota dominante. Las especies más relevantes pertenecen al género *Lactobacillus*; *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus curvatus*.
- Buena adaptación a la matriz, ya sea su origen cárnico o procedente de otra fuente de recursos biológicos.
- Las cepas seleccionadas deben mostrar un perfil genético de baja virulencia, así como cumplir todos los requisitos tecnológicos y de seguridad para ser incorporados a las matrices alimentarias.
- Capaces de reducir los nitritos de forma efectiva. Deben tener actividad nitrato y nitrito reductasa.
- Efecto antimicrobiano para garantizar la seguridad alimentaria, que pudiera verse comprometida como consecuencia de la reducción de nitrificantes.

Por otro lado, algunas cepas de *Lactobacillus fermentum* son capaces de convertir la metamioglobina (pigmento resultante de la oxidación de la mioglobina) en nitrosilmioglobina. Presentan la enzima óxido nítrico sintasa, que genera NO mediante la oxidación de grupos guanidinio de la L-arginina, contribuyendo así a la formación del color característico de los productos cárnicos curados.

Más aún, determinadas cepas de *Staphylococcus xylosus* son capaces de formar nitrosilmioglobina. Se ha demostrado que este microorganismo puede transformar metamioglobina en nitrosilmioglobina en un sistema modelo.

La inoculación de algunas cepas de *Debaryomyces hansenii* en productos curados mejora su aroma por aumento en las notas frutales y dulces y disminución de las notas rancias, además de mejorar su color.

Estos efectos acrecientan la calidad global del embutido mejorando su apariencia y aumentando su aceptabilidad, por cambios en los compuestos volátiles producidos. Algunos de los cambios importantes son el aumento de la producción de ésteres por su alta capacidad de esterificación y la disminución de los aldehídos lineales por su capacidad antioxidante. Además, *D. hansenii* también tiene actividad proteolítica y lipolítica contribuyendo a la mejora sensorial del producto. Sin embargo, no todas las cepas de *D. hansenii* producen el mismo perfil aromático. También es importante destacar que la cantidad de nitrificantes afecta a la capacidad de formación de aromas de esta levadura. La reducción de nitrificantes modifica la cantidad de aldehídos ramificados y ésteres generados, aumentando en algunos casos su producción. Lo que indica la diferente habilidad de formar compuestos aromáticos por parte de distintas cepas de la levadura *D. hansenii* y el diferente efecto de la reducción de nitrificantes en la producción de aromas por las mismas. Por lo que es necesario una selección adecuada, con el fin de aportar sabores característicos. La inoculación de *D. hansenii* como cultivo iniciador en productos cárnicos curado puede utilizarse como estrategia para contrarrestar los posibles efectos en el aroma por la reducción de la cantidad máxima permitida de nitritos. Los estudios disponibles señalan que la inoculación de *D. hansenii* en productos cárnicos reducidos en nitrificantes aumenta la producción de ésteres y disminuye la de aldehídos, ácido acético y metional, de forma que modifica el perfil aromático mediante el aporte de notas aromáticas “dulces” y a “fruta” y por la disminución de notas “verdes”, “rancias” y “vinagre”.

Bibliografía

- Aymerich T., Jofre A., Garriga M., Hugas M. 2005. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and salmonella by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. *J. Food Prot.* 68:173-7.
- Bover-Cid, S., Hereu, A., Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, T. 2013. Effects of the physiological state of *Listeria monocytogenes* and high pressure processing on relative lag times during growth in chilled RTE cooked meat product. 8th International Conference on Predictive Modeling of Food, París.
- Bover-Cid, S., Hereu, A., Garriga, M., Aymerich, T. 2011. Pre-culture conditions and food characteristics influence the high pressure resistance of *Listeria monocytogenes* on RTE cured meat products. Summer Conference of the Society for Applied Microbiology, Dublin.
- C. Ortuño, R. Rocha, J. Bon, J.A. Cárcel, J. Benedito. (2011). Efecto de la temperatura de secado sobre la capacidad antimicrobiana de extractos de tomillo obtenido mediante fluidos supercríticos. En: “Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables” pág. 330. Ed: J.A. Ordóñez, Córdoba, y J. Ventanas, J., Universidad de Extremadura.
- Cabeza, M.C., Cambero, M.I., Núñez, M., Medina, M., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A. 2010. Lack of growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in temperature abuse of E-beam treated ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Food Microbiology* 27, 777-782.
- De Alba, M., Bravo, D., Medina, M. 2012. High pressure treatments on the inactivation of *Salmonella* Enteritidis and the characteristics of beef carpaccio. *Meat Science* 92, 823-828.

- De Alba, M., Bravo, D., Medina, M. 2013. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in dry-cured ham by high pressure treatments combined with biopreservatives. *Food Control* 31, 508-513.
- De Alba, M., Montiel, R., Bravo, D., Gaya, P., Medina, M. 2012. High pressure treatments on the inactivation of *Salmonella Enteritidis* and the physicochemical, rheological and color characteristics of sliced vacuum-packaged dry-cured ham. *Meat Science* 91, 173-178.
- De la Hoz, L.; Cambero, M.I. y Ordóñez, J.A. (2011). Subproyecto PROCARTE: Uso de tecnologías emergentes para garantizar la seguridad alimentaria de productos cárnicos listos para su consumo. En: "Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables" págs. 55-61. Eds.: J.A. Ordóñez, J.J. Córdoba, y J. Ventanas, J. Universidad de Extremadura.
- Fernández, M., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A. y Hierro, E. 2011. Utilización de pulsos de luz para la descontaminación de productos cárnicos listos para su consumo. En: "Productos cárnicos para el siglo XXI: seguros, nutritivos y saludables" págs. 179-183. Eds.: J.A. Ordóñez, J.J. Córdoba, y J. Ventanas, J. Universidad de Extremadura.
- Flores, M y Toldrá, F. (2020) Riesgos del empleo de extractos vegetales como fuente natural de nitrato/nitrato en productos cárnicos. *Eurocarne*, V 286, pp 51-58.
- Flores, M, Corral, S., Cano-García, L., Salvador, A., & Belloch, C. (2015). Yeast strains as potential aroma enhancers in dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 212, 16–24.
- Flores, M.; Moncunill, D.; Montero, R.; López-Díez, J. J.; Belloch, C. (2017). Screening of *Debaryomyces hansenii* strains for flavour production under reduced concentration of nitrifying preservatives used in meat products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 3900–3909. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00971>.
- Hierro, E., Barroso, E., de la Hoz, L., Ordóñez, J.A., Manzano, S., Fernández, M. 2011. Efficacy of pulsed light for shelf-life extension and inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat cooked meat products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, 275-281.
- Hierro, E., Ganán, M., Barroso, E., Fernández, M. 2012. Pulsed light treatment for the inactivation of selected pathogens and the shelf-life extension of beef and tuna carpaccio. *International Journal of Food Microbiology* 158, 42-48.
- Hoz, L., Cambero, M.I., Cabeza, M.C., Herrero, A.M., Ordóñez, J.A. 2008 Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packed dry-cured ham by E-beam irradiation. *Journal of Food Protection* 71, 2001-2006.
- Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. Trine Danø Klingberg 1, Lars Axelsson, Kristine Naterstad, Dieter Elsser, Birgitte Bjørn Budde.
- In vitro study of beneficial properties and safety of lactic acid bacteria isolated from Portuguese fermented meat products. S D Todorov 1, B D G M Franco 1, I J Wiid 2.
- Investigation of reduction and tolerance capability of lactic acid bacteria isolated from kimchi against nitrate and nitrite in fermented sausage condition. Hyun-Dong Paik 1, Joo-Yeon Lee 2

- Laura Perea Sanz, Carmela Belloch y Mónica Flores. Estrategias biológicas para contrarrestar el efecto de la reducción de nitrificantes en el aroma de embutidos curado-madurados. Eurocarne nº 292. 2020.
- M. Armenteros; S. Ventanas; D. Morcuende; M. Estévez y J. Ventanas. Empleo de antioxidantes naturales en productos cárnicos. Eurocarne, Nº 207. Junio 2012
- Morales, P., Calzada, J., Ávila, M., Nunez, M. 2008. Inactivation of Escherichia coli O157:H7 in ground beef by single-cycle and multiple-cycle high pressure treatments. Journal of Food Protection 71, 811-815.
- NORTON T., D.W. SUN (2008). Recent Advances in the Use of High Pressure as an Effective. Processing Technique in the Food Industry. Food and Bioprocess Technology 1(1): 2-34.
- Ordóñez, J.A., Cabeza, M., de la Hoz, L., Cambero, M.I. 2007. Uso de radiaciones beta para conseguir el objetivo de seguridad alimentaria (FSO) en carne de pollo con respecto a Salmonella spp. Revista del Comité Científico de la AESAN 6, 67-87.
- Partial replacement of nitrite with a novel probiotic Lactobacillus plantarum on nitrate, color, biogenic amines and gel properties of Chinese fermented sausages. Yinglian Zhu 1, Liping Guo 2, Qingli Yang.
- PATTERSON M.F. (2005). A Review Microbiology of pressure-treated foods. Journal of Applied Microbiology 98: 1400-1409.
- Rivas-Canedo, A., Juez-Ojeda, C., Nunez, M., Fernández-García, E. 2011a. Effects of high pressure processing on the volatile compounds of sliced cooked pork shoulder during refrigerated storage. Food Chemistry 124, 749-758.
- The effect of selected lactic acid bacterial strains on the technological and microbiological quality of mechanically separated poultry meat cured with a reduced amount of sodium nitrite. Beata Łaszkiwicz 1, Piotr Szymański 2, Danuta Kołożyn-Krajewska
- Toledo del Árbol, Mª T. (2016). Conservación de alimentos mediante tratamientos por alta presión hidrostática. Tesis. Jaén, Universidad de Jaén.
- Two efficient nitrite-reducing Lactobacillus strains isolated from traditional fermented pork (Nanx Wudl) as competitive starter cultures for Chinese fermented dry sausage. Xi Chen 1, Jiapeng Li 1, Tong Zhou 1, Jinchun Li 1, Junna Yang 1, Wenhua Chen 2, Youling L Xiong.
- Y. Isaza et al. Oxidación lipídica y antioxidantes naturales en derivados cárnicos. J. Eng. Technol. Vol.2, Nº2. (2013)

Hito 2. DESARROLLO DE ALTERNATIVAS AL USO/REDUCCIÓN DE NITRIFICANTES

Tarea 2.1 Evaluación de aplicabilidad de las diferentes alternativas

A partir de la información obtenida del desarrollo de la tarea 1.2, se procedió a evaluar las diferentes estrategias de reducción o sustitución de nitrificantes, en relación con las tres categorías en las que agrupan los 6 de los derivados cárnicos a estudiar en este proyecto.

Se ha obtenido modelos teóricos de estrategias de tratamiento o incorporación de ingredientes/aditivos con el objeto de reducir el contenido de nitrificantes en 6 derivados cárnicos:

Preparados cárnicos frescos: Lomo y costilla adobados.

Se trata de derivados cárnicos frescos para los que en el momento de la solicitud de este proyecto se había planteado la prohibición del uso de nitrito sódico. A lo largo de esta segunda anualidad del proyecto se ha trabajado en los diseños necesarios para la reducción de la dosis de nitrito sódico de 150ppm, como consecuencia de la propuesta de la Comisión Europea relativa a esta categoría de derivados cárnicos.

Tras la evaluación de las estrategias identificadas, y considerando el menor impacto a nivel organoléptico, desde el punto de vista teórico se consideran aplicables:

Estrategias químicas:

- Adición directa de lactato sódico: 2% --3% como antioxidante para mantener la estabilidad del color a dosis más bajas de nitrito sódico.
- Adición directa de acetato de sódico: 0,1 a 0,2% como conservante.
- Adición de antioxidantes: extractos de especias ricos en polifenoles: extracto de romero u orégano, para evitar la oxidación lipídica:

Extracto de romero: 2000 ppm

- Adición de un agente reductor sintético o natural, que favorece la reducción de nitrito a NO y evite la formación de nitrosaminas:

Ascorbato sódico: 0,5 g/kg

Extracto de acerola: 3 g/kg

Estrategias físicas:

- Modificación de los procesos de elaboración:
Supresión de la etapa de salmuerizado por la adición de los aditivos pesados de forma directa.
Adobado en pieza envasada al vacío en bolsa alta barrera
- Altas presiones hidrostáticas: 6000 bar durante 5/6 minutos en bolsa de poliamida resistente a la punción para el caso de la costilla por el riesgo de perforación.

Estrategias biológicas:

- Adición de cultivos iniciadores, a base de cepas seleccionadas por micrococos, con capacidad de reducir los nitratos naturalmente presentes en el pimentón a nitritos con capacidad conservadora y de formar complejo nitrosomioglobina.
- Adición de extractos de fermentación deshidratados obtenidos a partir de bacterias acidolácticas productoras de bacteriocinas.

Sistema de envasado comercial: envasado al vacío en bolsa alta barrera al oxígeno.

Aspectos teóricos evaluados para las estrategias de reducción en preparados de carne:

Prolongación de la vida comercial un 50-100%. Manteniendo las propiedades organolépticas: aspecto, olor y color a lo largo de la vida útil. Vida útil estimada de 30-40 días.

Evitar la degradación prematura del color por oxidación de la mioglobina.

Contrarrestar el deterioro causado por microorganismos alterantes y responsables de la aparición de olores indeseables que merman la vida útil.

Inhibir o controlar el crecimiento de enterobacterias y de patógenos a lo largo de la vida útil.

Productos cárnicos crudo curados: Chorizo asturiano y lacón curado.

Son productos cárnicos curados no sometidos a tratamiento térmico. La propuesta aprobada en 2021 es la reducción del contenido máximo de nitritos añadidos a 100 ppm (50 residuales) y de nitratos a 120ppm (añadidos y residuales). Los niveles residuales tanto de nitratos como de nitritos son de obligado cumplimiento.

Tras la evaluación de las estrategias identificadas asociadas a la reducción de los nitrificantes añadidos, y considerando el menor impacto a nivel organoléptico, desde el punto de vista teórico se consideran aplicables:

El **chorizo Asturiano** es un producto sometido a un proceso de fermentación y posterior maduración enzimática, que permite el desarrollo de las siguientes estrategias para la reducción de nitrificantes:

Estrategias químicas:

- Adición de un agente reductor sintético o natural, que favorece la reducción de nitrito a NO y evite la formación de nitrosaminas:
Ascorbato sódico: 0,5 g/kg
- Adición de antioxidantes: extractos de especias ricos en polifenoles: extracto de romero u orégano, para evitar la oxidación lipídica:
Extracto de romero: 2000 ppm

Estrategias físicas:

- Modificación de los procesos de elaboración:
Incorporación de fase de estufaje asociada al proceso de ahumado con seguimiento del pH y adición de dextrosa como sustrato.
- Altas presiones hidrostáticas: 4000 bar durante 5 minutos envasado al vacío. Se trata de un tratamiento de menor intensidad considerando el pH y la aw de este tipo de productos.

Estrategias biológicas:

- Adición de cultivos iniciadores, a base de cepas seleccionadas por micrococcos, con capacidad de reducir los nitratos naturalmente presentes en el pimentón a nitritos con capacidad conservadora, de formar complejo nitrosomioglobina, de reducir los niveles regulados de nitratos residuales.

- Adición de cultivos iniciadores de bacterias ácido lácticas homofermentativas, capaces de metabolizar azúcares simples presentes o añadidos produciendo un descenso del pH hasta valores inferiores a 5,2.

El **lacón curado**, es un producto sometido a desecación cuya conservación se ve condicionada por la cantidad de sal añadida y el descenso de la aw durante su elaboración. El efecto del nitrificante contribuye a la estabilidad del color y a la protección frente al crecimiento de *Clostridium* spp.

Estrategias químicas:

- Adición de un agente reductor sintético o natural, que favorece la reducción de nitrito a NO y evite la formación de nitrosaminas:
Ascorbato sódico: 0,5 g/kg

Estrategias físicas:

- Congelación y descongelación previo al proceso de salado.
- Salado en vacío para favorecer la penetración de sal y aditivos hasta el interior de la pieza.
- Altas presiones hidrostáticas: 4000 bar durante 5 minutos envasado al vacío. Se trata de un tratamiento de menor intensidad considerando el pH y la aw de este tipo de productos.

Estrategias biológicas:

- Adición de cultivos a base de micrococos con actividad reductasa, con capacidad de reducir los nitratos añadidos, para mantener los niveles regulados residuales.

Aspectos teóricos evaluados de las estrategias de reducción en crudo curados:

Inhibición del crecimiento de patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en el proceso de elaboración, sobre todo en la fase de estufaje de embutido, y a lo largo de la vida útil a temperatura ambiente.

Condiciones de pH y aw, alcanzadas en las primeras fases de elaboración, que permitan garantizar la estabilidad a temperatura ambiente.

Condiciones de vida útil similares a los mismos productos tratados con aditivos nitrificantes, controlando el crecimiento de microorganismos alterantes, durante un tiempo estimado de 6 meses.

Preservar la calidad organoléptica: estabilizar el color de los productos, evitar la oxidación prematura del color, controlar la oxidación lipídica que genera olores y sabores a rancio.

Productos cárnicos cocidos: criollo cocido y lacón cocido.

Son derivados cárnicos sometidos a tratamiento térmico para los que se ha planteado una reducción de la cantidad de nitritos añadidos de 150pp a 100ppm y unos niveles residuales de 50ppm obligatorios.

Al igual que en el caso anterior, se trata de dos productos con procesos de elaboración diferenciados en los que las estrategias de reducción se deben establecer de forma individualizada, aunque en ambos casos las estrategias de envasado se basen en sistema de vacío con bolsa de material polimérico alta barrera al oxígeno.

El **lacón cocido** es un producto elaborado con piezas enteras de la paleta, sin utilizar tecnologías de inyección, donde los aditivos deben penetrar por difusión en la carne magra:

Estrategias químicas:

- Adición de un agente reductor muy soluble, que favorezca la reducción de nitrito a NO, reduciendo el nitrito residual: Ascorbato sódico: 0,5 g/kg
- Adición directa de lactato sódico: 2% --3% como antioxidante para mantener la estabilidad del color a dosis bajas de nitrito sódico.
- Adición directa de acetato de sódico: 0,1 a 0,2% como conservante.

Estrategias físicas:

- Modificación de los procesos de elaboración:
Adición de los aditivos pesados de forma directa.
Curado de pieza envasada al vacío en bolsa alta barrera
- Tratamiento post cocción:
Pasteurización superficial post envasado en saturación de vapor.
Altas presiones hidrostáticas: 5000 bar durante 5/6 minutos en bolsa de vacío

Estrategias biológicas:

- Adición de cultivos microbianos con actividad bacteriostática, actuando a nivel superficial para contrarrestar la contaminación superficial generada en la manipulación post cocción.

El **chorizo criollo cocido** es embutido cocido elaborado a base de carne y grasa de cerdo picadas y mezcladas con sal, ingredientes y aditivos, que permite aplicar las siguientes alternativas:

Estrategias químicas:

- Adición de un agente reductor soluble, que favorezca la reducción de nitrito a NO, favoreciendo la formación del color y reduciendo el nitrito residual: Ascorbato sódico: 0,5 g/kg
- Adición directa de lactato sódico: 2% --3% como antioxidante para mantener la estabilidad del color a dosis bajas de nitrito sódico.
- Adición de acetato de sódico: 0,1 a 0,2% como conservante.
- Adición de ingredientes colorantes:
Naturales a base de hemopigmento de cerdo. 2 g/kg
Artificiales en forma de aditivos rojo carmín. 0,02 g/kg

Estrategias físicas:

- Modificación de los procesos de elaboración:
Reposo de la masa antes de su cocción para garantizar la nitrificación a temperatura controlada entre 4 y 8 °C.
- Tratamiento post cocción:

Pasteurización superficial post envasado en saturación de vapor.

Altas presiones hidrostáticas: 5000 bar durante 5/6 minutos en bolsa de vacío

Estrategias biológicas:

- Adición en el amasado de extractos de fermentación deshidratados obtenidos a partir de bacterias acidolácticas productoras de bacteriocinas.

Aspectos teóricos evaluados del desarrollo de estas estrategias:

Inhibir el crecimiento de alterantes como bacterias ácido lácticas y enterobacterias, evitando la pérdida de vida útil en los productos cocidos reformulados con menor dosificación de nitritos. Controlar el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Obtener una vida útil estimada de 3 meses.

Inhibir el crecimiento de patógenos alimentarios como *Clostridium spp.*, *Salmonella, spp* y *Listeria monocytogenes*.

Preservar la calidad organoléptica de los productos: formación de nitrosomiocromógeno y protegiéndolo de la oxidación.

En el lacón cocido evitar la aparición de halos de nitrificación. En el criollo cocido evitar la formación de olores o sabores a recalentado tras su regeneración culinaria.

En la tarea 1.2 se han identificado otras estrategias que finalmente no han sido seleccionadas para su implementación en los productos. En cuanto a los pulsos de luz y los electrones acelerados son tecnológicas de conservación que aún se encuentran en fase experimental, por lo que no se consideran en este proyecto de investigación de estrategias para superar la reducción de nitrificantes en derivados cárnicos típicamente asturianos.

En el caso de las altas presiones hidrostáticas, aunque se trata de una tecnología disponible y validada, al no tener equipo de estas características disponible en el ámbito territorial del Principado de Asturias, ni en las CCAA limítrofes donde aplicar el tratamiento con unos costes asumibles, no se ha considerado como una de las estrategias de elección en el desarrollo de este proyecto.

Indicadores de grado avance del proyecto: Para cada derivado cárnico seleccionado se ha trabajado en el diseño de al menos 3 diferentes estrategias para hacer frente a la reducción de aditivos nitrificantes.

Tarea T2.2.-Identificación de sinergias

A lo largo de esta tarea se han ido diseñado las combinaciones de estrategias para su implementación en la siguiente tarea 2.3.

El objetivo ha sido buscar efectos sinérgicos o, en su caso, complementarios, para tratar de cubrir las necesidades tecnológicas derivadas de la reducción del contenido dosificado de nitrito y/o nitrato.

Esta tarea se ha ido retroalimentando, en su caso, con los resultados obtenidos en la tarea de desarrollo de pruebas experimentales.

Lomo Adobado:

- Adición directa de lactato sódico: 2,5% como antioxidante.
- Adición directa de acetato de sódico: 0,15% como conservante.
- Adición de un agente reductor sintético: ascorbato sódico: 0,06%
- Salmuerizado en pieza envasada al vacío en bolsa alta barrera.
- Adición de cultivo bacteriano a base de microorganismos sulfito reductores.
- Adición de cultivo bacteriano a base de bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas con capacidad bioconservante.

Costilla Adobada:

- Adición directa de lactato sódico: 2% como antioxidante
- Adición directa de acetato de sódico: 0,1% como conservante.
- Adición de antioxidantes a base de extractos de especias: extracto de romero: 2000 ppm
- Adición de un agente reductor: Ascorbato sódico: 0,06%
- Maceración en pieza envasada al vacío en bolsa alta barrera resistente a la punción.

Chorizo Asturiano

- Adición de cultivos a base de bacterias ácido-lácticas homofermentativas.
- Adición de un agente reductor: Ascorbato sódico: 0,06%
- Incorporación de fase de estufaje asociada al proceso de ahumado con seguimiento del pH y adición de dextrosa como sustrato: $t^a=20^{\circ}\text{C}$ durante 24h.

Lacón Curado:

- Congelación y descongelación previo al proceso de salado.
- Salado en vacío para favorecer la penetración de sal y aditivos hasta el interior de la pieza.
- Adición de cultivos a base de micrococcos con actividad reductasa.
- Control de la temperatura de salado para favorecer el proceso de nitrificación: entre 4 y 8°C
- Control de la temperatura de secado para favorecer el proceso de nitrificación: 20/25°C.

Lacón cocido:

- Adición de un agente reductor soluble: Ascorbato sódico: 0,06%
- Adición de lactato sódico: 2,5% como antioxidante
- Nitrificación a temperatura controlada entre 4 y 8 °C.
- Pasteurización post envasado en saturación de vapor: 70°C.

Criollo cocido:

- Adición de un agente reductor soluble: Ascorbato sódico: 0,06%
- Adición de acetato de sódico: 0,1%
- Reposo de la masa a temperatura controlada entre 4 y 8 °C, 24 horas.

- Pasteurización post envasado en saturación de vapor: 70°C.

Tarea T2.3.- Implementación de pruebas experimentales

A lo largo de esta tarea se han desarrollado las pruebas experimentales que se detallan a continuación en base a las siguientes formulaciones, en las que se han ensayado de forma comparativa formulaciones y procesos tradicionales frente a nuevas formulaciones y procesos incorporando las estrategias para la reducción de nitrificantes de forma sinérgica citadas en la tarea anterior.

Las pruebas tradicionales, a modo de control, también han sido incluidas en las evaluaciones a desarrollar en el hito 3 para el análisis comparativo de los resultados obtenidos.

La ejecución de dichas pruebas ha tenido lugar en las instalaciones de ASINCAR, disponiendo para ello de los equipos necesarios para elaborar lotes de cada producto a escala experimental.

Además, todos los productos elaborados fueron envasados para evaluar su comportamiento a lo largo del tiempo de la vida útil tal. Para ello, se ha empleado una envasadora de campana de vacío propiedad de ASINCAR.

Para el desarrollo de los ensayos se han utilizado aditivos nitrificantes puros: nitrato potásico y nitrito sódico, que han permitido formular de forma específica cada uno de los ensayos.

LOMO ADOBADO:

Con relación al lomo adobado, producto cárnico fresco, se han desarrollado diferentes ensayos con el objeto de reducir la dosificación de nitrito y, en su caso, incrementar la seguridad alimentaria y vida útil.

Formulación tradicional a base de sal y nitrito sódico a 150ppm.

Formulación ensayo 1: 80ppm nitrito, ascorbato 0,06% y 2,5% lactato/acetato.

Formulación ensayo 2: 120ppm nitrito, ascorbato 0,06% y 2,5% lactato/acetato.

Formulación ensayo 3: 120ppm nitrito, extracto de acerola, cultivo bioconservante a base de *Lactobacillus sakei*

Formulación ensayo 4 (control) : 120ppm nitrito, ascorbato 0,06%.

Formulación ensayo 5: dextrosa y cultivo nitrato reductasa a base de *Pediococcus spp.* y *Staphylococcus spp.*

Para el adobo se diseñó la misma formulación para todos los ensayos.

	g/kg
Pimentón dulce Murcia	8,0
pimentón ahumado	4,0

pimentón picante	4,0
Ajo en polvo	6,0
orégano	0,5
perejil	0,3

A partir de los ensayos tradicional y ensayo 1 se obtuvieron muestras control y muestras de ensayo para desarrollar ensayos de desafío o *Challenge test*, con el objetivo de determinar el potencial de crecimiento de *Salmonella spp* durante la vida útil y establecer estudios comparativos entre ambas cantidades de nitrificantes.

COSTILLA ADOBADA

Formulación tradicional: 150ppm de nitrito, ascorbato sódico 0,06%

Formulación ensayo 1: ascorbato sódico 0,06%, 3% lactato/acetato (60%/5%).

Adobado:

	g/kg
pimentón dulce Murcia	8,0
pimentón ahumado	4,0
pimentón picante	4,0
Ajo en polvo	6,0
orégano	0,5
perejil	0,3

Tras la elaboración de los productos se obtuvieron muestras para desarrollar ensayos de desafío, con el objetivo de determinar el potencial de crecimiento de *Salmonella spp* durante la vida útil y establecer estudios comparativos.

CHORIZO ASTURIANO

En el caso del chorizo Asturiano se han desarrollado dos ensayos en comparación con la formulación tradicional con el objeto de evaluar el potencial de inhibición de dos patógenos alimentarios durante el proceso de elaboración, así como el estudio a lo largo de su vida útil.

Formulación tradicional, contenido habitual de nitrato y nitrito:

Formulación ensayo 1, modificación del contenido de nitrato y nitrito y adición de fermento o cultivo iniciador a base de bacterias ácido-lácticas.

Formulación ensayo 2, modificación del contenido de nitrato y nitrito y adición de fermento o cultivo iniciador a base de bacterias ácido-lácticas.

A partir de cada formulación (tradicional y ensayo 1 y 2) se obtuvieron muestras control muestras para realizar *Challenge test*, con el objetivo de determinar la inactivación de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* durante el proceso de elaboración del chorizo y establecer estudios comparativos entre ambas formulaciones de nitrificantes

LACÓN CURADO

En el caso del lacón curado se han realizado tres ensayos a partir de dos formulaciones de producto:

- Formulación tradicional en producto fresco: con 150ppm de nitrato y 150ppm de nitrito.
- Formulación ensayo 1 en producto fresco: con 120ppm de nitrato, 120ppm de nitrito y 0,06% de ascorbato.
- Formulación ensayo 2 en producto descongelado: con 120ppm de nitrato, 120ppm de nitrito y 0,06% de ascorbato.

Los tres lotes fueron sometidos a un proceso de salado cubiertos de sal, lavado posterior y secado en condiciones de aire forzado con control de humedad y temperatura.

CRIOLLO COCIDO:

Formulación Tradicional: 150ppm de nitrito sódico.

Formulación Ensayo 1: 100 ppm de nitrito sódico

Formulación ensayo 2: 120 ppm nitrito sódico.

Formulación ensayo 3: 120 ppm nitrito sódico.

En los lotes Tradicional, ensayo 1 y ensayo 2, el embutido fue sometido a un proceso de cocción a 75°C durante 45 minutos en horno de vapor. Posteriormente se enfrió y a las 24h se envasó en bolsas de vacío aptas para tratamiento térmico, obteniendo muestras control y muestras para test. Estas últimas, previo al envasado, se realizaron las inoculaciones correspondientes a los Challenge test para validar el proceso de inactivación por tratamiento térmico posterior al envasado a 70°C en horno con saturación de vapor durante un tiempo entre 20 y 35°C.

En el caso del ensayo 3, tras el proceso de cocción se aplicó un tratamiento superficie a base de un cultivo de acción bioconservadora de bacterias ácido lácticas, con el objeto de comparar los resultados obtenidos en cuanto al estudio de vida útil en comparación con el ensayo 2 que fue tratado térmicamente 70°C durante 35 minutos.

LACON COCIDO

Prueba experimental Tradicional:

NITRITO SODICO 0,15

Prueba experimental Ensayo:

NITRITO SODICO 0,1 0,69 g

Tras la adición de los ingredientes y su amasado en condiciones de vacío, los lacones fueron colocados en molde y, después de un periodo de reposo a $t^a = 5^{\circ}\text{C}$ durante 24h, fueron sometido a un proceso de cocción a 80°C durante 45 minutos.

Posteriormente, una vez enfriadas y tras su cortado, las piezas obtenidas se envasaron en bolsas de vacío aptas para tratamiento térmico. Previo al envasado, las muestras test de ambas formulaciones se inocularon, con los patógenos correspondientes a los Challenge test de listeria y salmonela. El objetivo en este caso fue validar el proceso de inactivación por pasteurización post-ensado, consistente en 70°C durante 35 minutos en horno con saturación de vapor.

Tarea T2.4.- Selección pruebas optimizadas

Esta tarea se realizó para todas las pruebas experimentales realizadas en la anterior tarea, tanto sobre las formulaciones tradicionales como sobre las formulaciones ensayadas, antes de comenzar las evaluaciones planteadas en el hito 3.

El objetivo de esta tarea ha sido la selección de las estrategias mejor valoradas desde un punto de vista sensorial, que serán evaluadas en el hito 3.

Las pruebas con el lomo adobado, al tratarse de un producto fresco, fueron evaluadas tras un tratamiento culinario realizado en plancha, en las instalaciones de cocina de la planta piloto de ASINCAR hasta conseguir el aspecto típico de un derivado cárnico fresco cocinado. Por el mismo motivo, la evaluación de la costilla adobada fue realizada tras su tratamiento culinario en horno Rational a 180°C .

En el caso del lacón curado, previo desalado en agua durante 12 horas, el producto fue sometido a cocción durante 1 hora.

El chorizo asturiano y el lacón cocido se evaluaron tal y como se comercializan, sin ningún tipo de tratamiento adicional. El criollo cocido se evaluó tras corte y calentamiento en horno microondas (30'' - 700w)

El panel de cata estaba formado por 5 catadores de ambos sexos, todo personal de ASINCAR con experiencia en la evaluación sensorial de derivados cárnicos,

Se utilizó una ficha de cata genérica para poder cuantificar cada atributo (aspecto, olor, textura y sabor), así como una valoración global, en una escala numérica de 1 a 7.

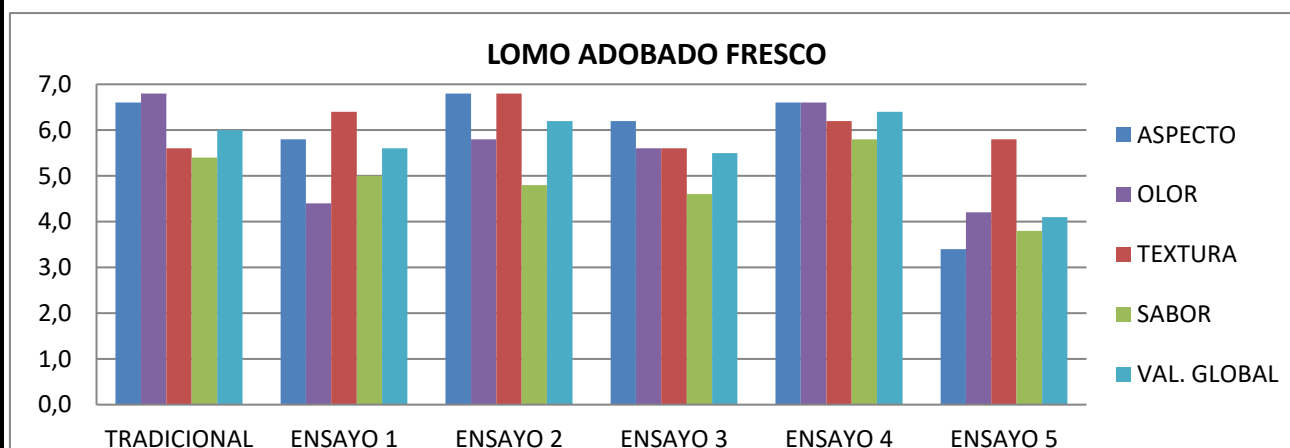
Los resultados se han obtenido del análisis estadístico a partir de las puntuaciones señaladas por los evaluadores. Se ha establecido el siguiente criterio de valoración: Los productos con una valoración global inferior a 4, o con una valoración en dos o más parámetros inferior a 4 se consideran fuera de aceptación sensorial preliminar.

Además, el desarrollo de estas pruebas preliminares sensoriales ha permitido desarrollar el entrenamiento del panel de catadores en este tipo de matrices alimentarias.

La valoración global se categoriza según la siguiente escala en base a las puntuaciones:

- Insatisfactorio: puntuación desde 1 hasta 4.
- Aceptable: puntuaciones desde 4 hasta 6
- Satisfactorio: Puntuación desde 6 hasta 7.

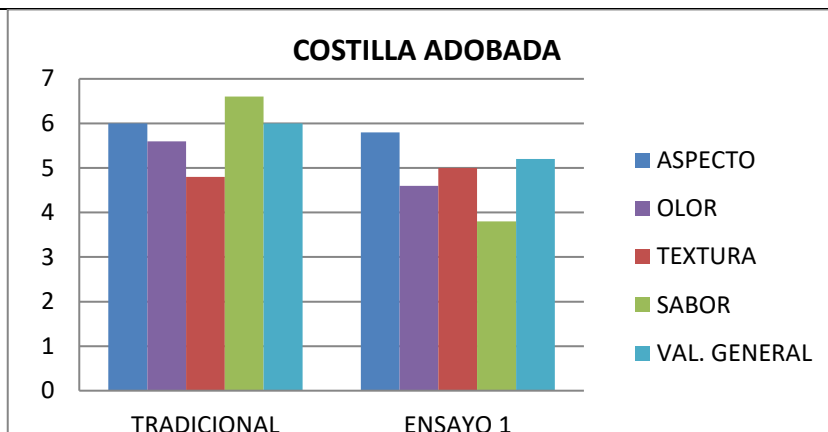
Evaluación sensorial en lomo adobado:



Como resultado de la evaluación sensorial realizada sobre las muestras de lomo adobado, la muestra correspondiente al ensayo 5 no superó el umbral establecido a nivel de aspecto y sabor.

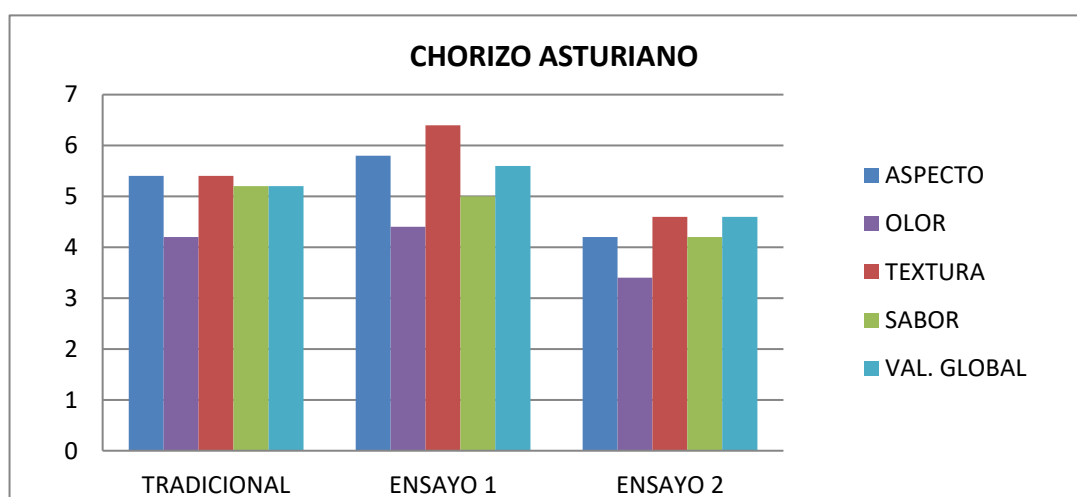
El ensayo 5 es el único desarrollado con la eliminación total de nitritos añadidos, basada en una estrategia de reducción microbiana del nitrato del pimentón mediante la acción de un cultivo específico de micrococos. A nivel de aspecto, la falta de nitrificación o formación de complejo nitroso-mioglobina, da como resultado un color menos estable en el producto final, mayor sensibilidad a la oxidación, y por tanto, al desarrollo más acelerado de olores y sabores alterados.

Evaluación sensorial en costilla adobada



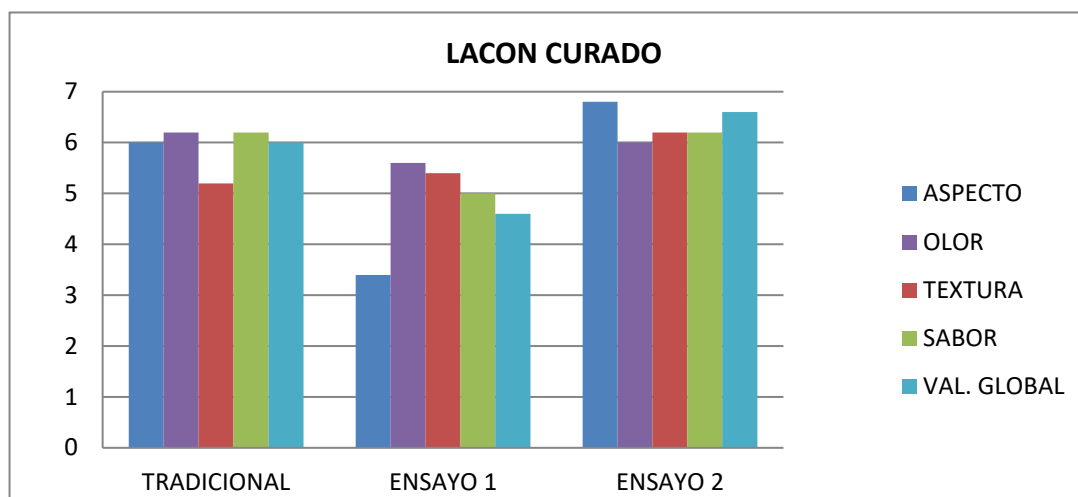
La evaluación de los dos lotes de costilla adobada obtuvo resultados satisfactorios a nivel general. A nivel de sabor, el ensayo 1 obtuvo un valor inferior al valor umbral, lo que es compatible con la modificación del sabor derivada de la adición de una combinación de lactato/acetato en concentraciones elevadas.

Evaluación sensorial en Chorizo Asturiano:



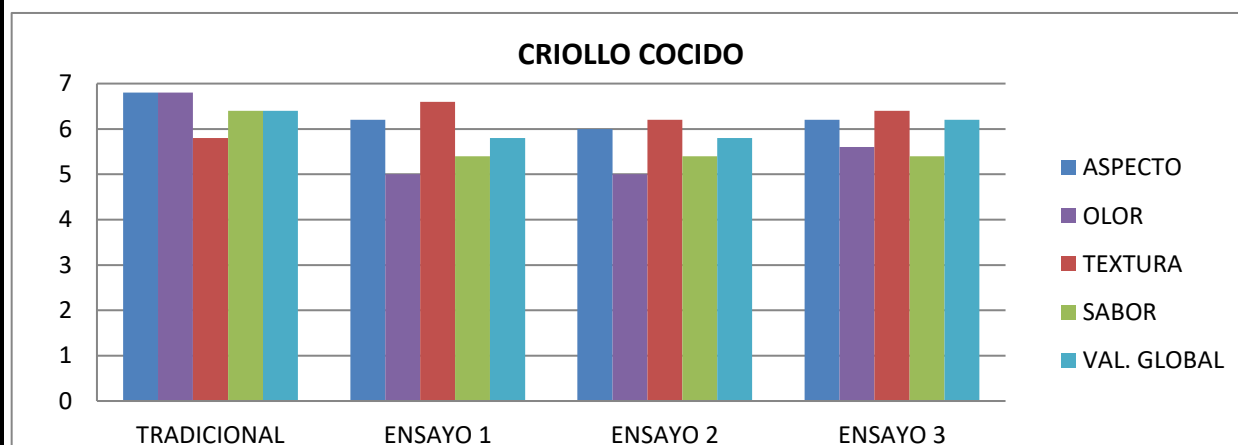
Los lotes desarrollados para chorizo asturiano han obtenidos resultados aceptables a nivel de la evaluación sensorial preliminar. El Ensayo 2 obtiene valoraciones más bajas con relación al ensayo 1, y a nivel de olor un resultado por debajo del umbral establecido. Ambos ensayos serán evaluados en el desarrollo del hito 3 frente a un control.

Evaluación sensorial en lacón curado



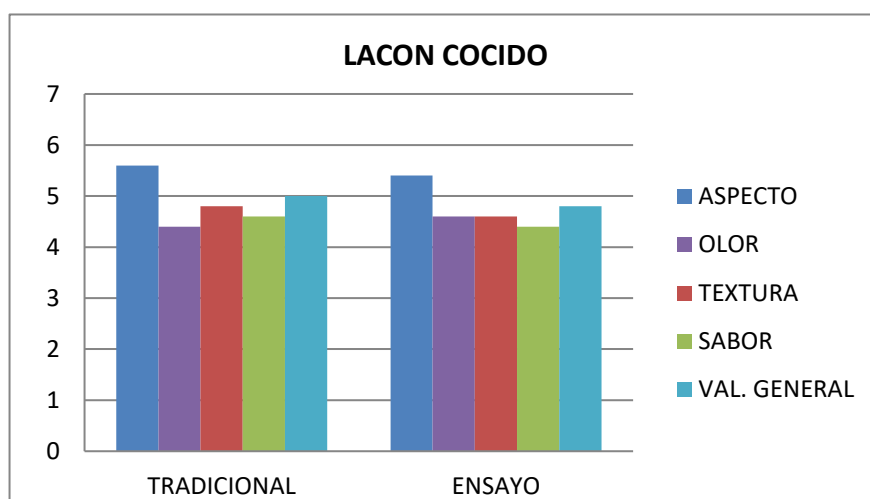
En el caso del lacón curado, además del control tradicional, se han desarrollado dos ensayos a partir de una formulación con dos variantes de proceso. A nivel de aspecto, el ensayo 1 obtiene una puntuación por debajo del umbral como consecuencia de la falta de nitrificación completa en el centro de la pieza, al inicio de la vida útil. Aunque es esperable que a lo largo de la vida útil el producto, con el producto cortado y envasado al vacío, esta zona con baja nitrificación se iguale en aspecto con relación al resto del producto. La evaluación preliminar desarrollada en esta tarea, realizada con el lacón curado cocido, minimiza la incidencia en el aspecto.

Evaluación sensorial en criollo cocido:



En el caso de criollo cocido se han evaluado 3 ensayos de forma preliminar con resultados satisfactorios a nivel sensorial en todos ellos. Los tres ensayos se han desarrollado a partir de una única formulación y tres estrategias de conservación para el incremento de la vida útil diferentes, tal y como se ha detallado en hito 2.

Evaluación sensorial en lacón cocido:



Ambas pruebas, tradicional y ensayo, han superado la evaluación sensorial preliminar y han pasado a ser evaluadas en el hito 3.

HITO 3: EVALUACIÓN DE PRODUCTOS DESARROLLADOS FRENTE A CONTROL

A lo largo de esta tapa descrita en el proyecto se fueron evaluando los resultados obtenidos desarrollo de productos con una reducción de aditivos nitrificantes en comparación con los ensayos control que fueron evaluados con las cantidades actualmente permitidas de aditivos nitrificantes y con los procesos de producción habituales. Se realizaron en cada caso evaluaciones de tipo organoléptico, microbiológico y fisicoquímico.

Tarea T3.1.- Evaluación a nivel de Seguridad alimentaria

Uno de los aspectos que puede verse comprometido por la adición de aditivos nitrificantes es la seguridad alimentaria. En el desarrollo del proyecto se planteó la validación de las nuevas formulaciones en términos higiénico-sanitarios, para evaluar el efecto de la reducción de aditivos nitrificantes para los patógenos alimentarios estudiados, según el caso.

Para esta validación, se empleará como herramienta de análisis, los estudios de desafío de *Challenge test*. Este tipo de ensayos consisten en contaminar de manera deliberada matrices alimentarias y evaluar el efecto que los cambios en la formulación, procesos tecnológicos, etc. tienen sobre los microorganismos inoculados. Así, se calcula el potencial de crecimiento, es decir, si el microorganismo diana es capaz de proliferar o no en las condiciones del estudio.

Los ensayos de desafío fueron realizados según lo descrito en la Norma “ISO20976-1 Microbiology of the food chain – Requirements and guidelines for conducting challenge test of food and feed products – Part 1: Challenge tests to study the growth potential, lag time and maximum growth rate” y la guía “EURL Lm Technical Guidance Document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat-foods. Version 3 – 2014, amendment 2019”, documentos empleados como referencia.

Los estudios se realizaron con la inoculación de diferentes patógenos, según la evaluación del riesgo de cada producto en particular y teniendo en cuenta, por tanto, la relevancia de los distintos microorganismos en cada caso.

Antes de la realización de los ensayos de Challenge test se prepararon suspensiones de cada uno de los microorganismos diana en cada caso y a una concentración conocida, de manera que se pudo estimar la concentración final de cada uno de los patógenos en el producto a evaluar.

En todos los casos los productos fueron analizados previamente frente a la ausencia de cada uno de los patógenos a ensayar, obteniéndose en todos los casos evaluados resultados satisfactorios, es decir no detección del patógenos diana.

La forma de inoculación, como será descrita más adelante, fue adaptada para cada tipo de matriz. Se realizó bien en masa o bien en superficie, aplicando diferentes técnicas de contaminación artificial y en ningún caso superando el 1 % sobre peso de matriz alimentaria para no modificar de forma significativa las características intrínsecas del producto.

En todos los casos las cepas estaban perfectamente caracterizadas, empleando tanto cepas de colección, como pertenecientes al cepario interno de ASINCAR, en cuyo caso procedían en origen de una matriz cárnica. En el desarrollo del proyecto se realizaron varias pruebas en torno al microorganismo *Clostridium spp.* detectándose dificultades en su manejo. Derivado de que se trata de un microorganismo anaerobio estricto y con capacidad de esporular, en los primeros ensayos se comprobó por estas características fisiológicas que no era posible tener recuentos microbianos que siguieran la dinámica habitual. Por ello se descartó el empleo de este microorganismo debido a que no se podían resultados cuantitativos robustos.

Es por esta circunstancia que se intensificaron los esfuerzos en los trabajos con los patógenos *Salmonella* entérica y *Listeria monocytogenes*, debido además que estos son los referidos en la legislación aplicable para los productos cárnicos.

El nivel de inoculación de los microorganismos fue previamente definido en cada caso y acorde al límite de detección de las técnicas de cultivo empleadas.

En todo momento fue garantizada la trazabilidad de las producciones con un objetivo doble:

- No perder en ningún momento información del producto, para poder hacer un adecuado seguimiento de las muestras y su monitorización físico-química y microbiológica.
- Por motivos de seguridad alimentaria las muestras incluidas en el proyecto deben quedar perfectamente diferenciadas e identificadas.

Ensayo de Challenge test en preparados frescos: Lomo adobado

Como ya se comentó con anterioridad, una de las matrices seleccionadas para ensayar dentro del grupo de preparados cárnicos frescos, es el lomo adobado fresco. En este caso, la cantidad de aditivos nitrificantes añadidos al producto desarrollado con la formulación tradicional y de acuerdo con la legislación vigente, se corresponden con 150 ppm de nitrito sódico. En el caso de la nueva formulación Ensayo 1, la cantidad añadida al producto fue de 80 ppm de nitrito sódico.

La contaminación del producto se realizó tras verse sometido a todos los procesos tecnológicos de elaboración y con el objetivo de determinar el potencial de crecimiento a lo largo de la vida útil.

En ambos casos se inoculó *Salmonella entérica* en una concentración establecida en aproximadamente 4,0 log ufc/g sobre la superficie del producto en un 1% sobre peso. Posteriormente fue envasado en vacío convencional y conservado a 5 °C durante el periodo de vida útil, establecido en 60 días.

Las muestras fueron analizadas a distintos tiempos a lo largo de los 60 días de conservación determinando el recuento de *Salmonella entérica*, recuento de bacterias ácido-lácticas, determinación de pH y determinación de a_w .

Los resultados obtenidos en el producto elaborado según la formulación tradicional se muestran a continuación:

UNIDADES CONTROL							
Producto	Lomo adobado	<i>Salmonella</i>		Microbiota BAL		pH	a_w
Muestra	Tiempo	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
A22005375001	0	<10	-	1,2E+06	6,08	5,6	0,97
A22005376001	60	<10	-	1,40E+08	8,15	5,3	0,95

UNIDADES ANÁLISIS							
Producto	Lomo adobado	<i>Salmonella</i>		Microbiota BAL		pH	a_w
Muestra	Tiempo	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
A22005377001	0	1,1E+04	4,04	1,10E+06	6,04	6,1	0,95
A22005378001	25	5,3E+03	3,72	1,10E+09	9,04	5,8	0,96
A22005379001	39	4,4E+03	3,64	1,00E+08	8,00	5,6	0,94
A22005380001	48	3,0E+03	3,48	5,50E+08	8,74	5,7	0,94
A22005381001	60	6,3E+03	3,80	2,80E+07	7,45	5,4	0,95

Tiempo	Horas	0	600	936	1152	
log ufc/g	h	h	h	h	h	δ
Lote A	4,04	3,72	3,64	3,48	3,80	-0,24

Atendiendo a los resultados obtenidos el producto no permite la proliferación de *Salmonella entérica*.

Los resultados obtenidos en el producto elaborado según la formulación de ensayo 1 se muestran a continuación:

UNIDADES CONTROL							
Producto	Lomo adobado	<i>Salmonella</i>		Microbiota BAL		pH	a_w
Muestra	Tiempo	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
A22005383001	0	<10	-	>4,9+06	-	5,6	0,96
A22005384001	60	<10	-	>4,9+07	-	5,5	0,95

UNIDADES ANÁLISIS							
Producto	Lomo adobado	<i>Salmonella</i>		Microbiota BAL		pH	a_w
Muestra	Tiempo	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
A22005385001	0	1,0E+04	4,00	>4,9+06	-	5,5	0,97
A22005386001	25	3,8E+03	3,58	4,1E+08	8,61	5,8	0,95
A22005387001	39	1,0E+04	4,00	7,3E+07	7,86	5,5	0,95
A22005388001	48	4,5E+03	3,65	4,9E+08	8,69	5,6	0,96
A22005389001	60	2,6E+03	3,41	2,2E+08	8,34	5,3	0,95

Tiempo	Horas	0	600	936	1152	
log ufc/g	h	h	h	h	h	δ
Lote A	4,00	3,58	4,00	3,65	3,41	-0,59

Atendiendo a los resultados obtenidos el producto no permite la proliferación de *Salmonella entérica*. La inhibición de *Salmonella entérica* es más evidente en la formulación ensayo 1, frente a la tradicional.

Ensayo de Challenge test en preparados frescos: costilla adobada

En el caso de la costilla adobada, la cantidad de aditivos nitrificantes añadidos al producto desarrollado con la formulación tradicional y de acuerdo con la legislación vigente, se corresponden con 150 ppm de nitrito sódico. En el caso de la formulación Ensayo 1, la cantidad añadida al producto fue de 80 ppm de nitrito sódico, ascorbato sódico y lactato sódico.

La contaminación del producto se realizó tras verse sometido a todos los procesos tecnológicos de elaboración y con el objetivo de determinar el potencial de crecimiento a lo largo de la vida útil.

En ambos casos se inoculó *Salmonella entérica* en una concentración establecida entre 3,0 y 4,0 log ufc/g sobre la superficie del producto loncheado. Posteriormente fue envasado en vacío convencional y conservado a 5°C durante el periodo de vida útil, establecido en unos 45 días aproximadamente.

Las muestras fueron analizadas a distintos tiempos a lo largo de los 45 días de conservación determinando el recuento de *Salmonella entérica*, recuento de bacterias ácido-lácticas, determinación de pH y determinación de a_w .

Los resultados obtenidos en la costilla adobada con formulación tradicional se muestran a continuación:

UNIDADES CONTROL								
Producto	COSTILLA ADOBADA		<i>Salmonella</i>		Microbiota BAL		pH	a_w
Muestra	Tiempo	Horas	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
0360P	0	0	<10	-	2,5E+05	-	5,9	0,95
0361P	45	1080	<10	-	>4,9E+07	-	5,3	0,94

UNIDADES ANÁLISIS								
Producto	COSTILLA ADOBADA		<i>Salmonella</i>		Microbiota BAL		pH	a_w
Muestra	Tiempo	Horas	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
0362P	0	0	4,2E+03	3,62	7,8E+04	4,89	6,1	0,95
0363P	13	312	5,0E+02	2,70	>4,9E+07	-	5,6	0,96
0364P	23	552	2,2E+03	3,34	1,1E+08	8,04	5,6	0,94
0365P	37	888	2,1E+02	2,32	>4,9E+05	-	5,3	0,96
0363P	45	1080	5,5E+01	1,74	2,0E+08	8,30	5,1	0,97

Tiempo	Horas	0	312	552	888	
log ufc/g	h	h	h	h	h	δ
Lote A	3,62	2,70	3,34	2,32	1,74	-1,88

Los resultados obtenidos indican que el producto no permite la proliferación de *Salmonella entérica*.

Los resultados obtenidos en la costilla adobada con formulación de ensayo se muestran a continuación:

UNIDADES CONTROL								
Producto	COSTILLA ADOBADA		Salmonella		Microbiota BAL		pH	a _w
Muestra	Tiempo	Horas	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
0367P	0	0	<10	-	2,3E+04	4,36	5,6	0,95
0368P	45	1080	<10	-	>4,9E+07	-	5,6	0,97

UNIDADES ANÁLISIS								
Producto	COSTILLA ADOBADA		Salmonella		Microbiota BAL		pH	a _w
Muestra	Tiempo	Horas	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
0369P	0	0	4,7E+03	3,67	2,50E+06	6,40	5,8	0,94
0370P	13	312	4,0E+02	2,60	>4,9E+07	-	5,5	0,95
0371P	23	552	6,4E+02	2,81	1,20E+07	7,08	5,5	0,95
0372P	37	888	2,3E+02	2,36	>4,9E+05	-	5,6	0,97
0373P	45	1080	9,1E+01	1,96	4,50E+07	7,65	5,7	0,98

Tiempo	Horas	0	312	552	888	
log ufc/g	h	h	h	h	h	δ
Lote A	3,67	2,60	2,81	2,36	1,96	-1,71

Los resultados obtenidos indican que la costilla adobada Ensayo 1 no permite la proliferación de *Salmonella entérica*.

Ensayo de Challenge test en producto crudo curado: chorizo asturiano.

Dentro de este grupo se decidió emplear como matriz de referencia para este tipo de ensayos el chorizo asturiano. Se trata de un producto crudo curado, fermentado, con gran tradición gastronómica dentro de nuestra región.

Inicialmente se realizaron dos pruebas en paralelo: En la formulación tradicional y acorde a la legislación vigente, se añadieron 150 ppm de nitrito sódico y 150 ppm de nitrato sódico. Se prepararon además las muestras de ensayo 1, reduciendo a 100 ppm la cantidad de nitrito sódico y a 120 ppm el nitrato sódico.

En el caso que nos ocupa las masas cárnicas a ensayar fueron contaminadas con dos de los patógenos que pueden suponer un riesgo potencial en este tipo de productos, *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes*. El nivel de contaminación establecido fue de entre 5,0 log ufc/g y 6,0 log de ufc/g para poder determinar la posible inactivación durante el proceso productivo de ambos patógenos.

Una vez las masas fueron contaminadas deliberadamente con los microorganismos (por un lado, se realizó el ensayo de *Salmonella entérica* y por otro el ensayo de *Listeria monocytogenes*), éstas fueron embutidas y sometidas posteriormente al proceso de fermentación y posterior secado y maduración.

Las muestras fueron analizadas a distintos tiempos a lo largo de los 12 días de elaboración determinando bien el recuento de *Salmonella entérica* o de *Listeria monocytogenes* (según cada caso), recuento de bacterias ácido-lácticas, determinación de pH y determinación de a_w.

Los resultados obtenidos en los ensayos de desafío para *Salmonella entérica*, en la formulación tradicional de chorizo asturiano se muestran a continuación:

UNIDAD CONTROL							
Producto	Chorizo Asturiano Trad.	Salmonella		BAL		pH	a _w
Muestra	Tiempo	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
A22004936001	0	<10	-	9,0E+05	5,95	5,9	0,97
A22004937001	12	<10	-	2,5E+08	8,40	5,2	0,87

UNIDAD TEST							
Producto	Chorizo Asturiano Trad.	Salmonella		BAL		pH	a _w
Muestra	Tiempo	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
A22004938001	0	1,4E+06	6,15	7,7E+05	5,89	5,9	0,96
A22004939001	2	8,4E+04	4,92	7,7E+08	8,89	5,2	0,97
A22004940001	5	2,1E+04	4,32	6,9E+08	8,84	5,2	0,93
A22004941001	8	2,8E+03	3,45	4,1E+08	8,61	5,2	0,90
A22004942001	12	2,2E+02	2,34	2,3E+08	8,36	5,3	0,87

Tiempo	0	48	120	192	288	
log ufc/g	h	h	h	h	h	δ
Lote A	6,15	4,92	4,32	3,45	2,34	-3,80

En este caso, el proceso productivo es capaz de inhibir la proliferación de *Salmonella entérica*.

Los resultados obtenidos en los ensayos de desafío para *Salmonella entérica*, en la formulación de ensayo 1 del chorizo asturiano fueron:

UNIDAD CONTROL							
Producto	Chorizo Asturiano Ensayo	Salmonella		BAL		pH	a _w
Muestra	Tiempo	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
A22004944001	0	<10	-	9,3E+05	5,97	5,9	0,97
A22004945001	12	<10	-	2,9E+08	8,46	5,2	0,90

UNIDAD TEST							
Producto	Chorizo Asturiano Ensayo	Salmonella		BAL		pH	a _w
Muestra	Tiempo	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
A22004946001	0	2,7E+05	5,43	1,2E+06	6,08	5,9	0,97
A22004947001	2	1,5E+06	6,18	5,6E+08	8,75	5,2	0,96
A22004948001	5	2,2E+06	6,34	2,9E+08	8,46	5,2	0,92
A22004949001	8	2,0E+04	4,30	4,3E+08	8,63	5,2	0,90
A22004950001	12	1,0E+02	2,00	1,2E+08	8,08	5,3	0,87

Tiempo	0	0	48	120	192	
log ufc/g	h	h	h	h	h	δ
Lote A	5,43	6,18	6,34	4,30	2,00	-3,43

El proceso productivo es capaz de inhibir la proliferación de *Salmonella entérica*.

Los resultados obtenidos (por triplicado) en los ensayos de desafío para *Listeria monocytogenes*, en la formulación tradicional de chorizo asturiano se muestran a continuación:

UNIDADES CONTROL									
Producto	Chorizo asturiano tradicional			<i>L. monocytogenes</i>		Microbiota BAL		pH	a _w
Muestra	Fecha	Tiempo	Horas	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
A22004887001	19/10/2022	0	0	<10	-	7,1E+05	5,85	5,9	0,96
A22004888001	31/10/2022	12	288	<10	-	2,4E+08	8,38	5,2	0,88
Muestra	Fecha	Tiempo	Horas	Lote B	log ufc/g	Lote B	log ufc/g	Lote B	Lote B
A22004891001	19/10/2022	0	0	<10	-	9,0E+05	5,95	5,8	0,96
A22004892001	31/10/2022	12	288	<10	-	2,7E+08	8,43	5,2	0,89
Muestra	Fecha	Tiempo	Horas	Lote C	log ufc/g	Lote C	log ufc/g	Lote C	Lote C
A22004893001	19/10/2022	0	0	<10	-	1,0E+06	6,00	5,9	0,96
A22004894001	31/10/2022	12	288	<10	-	3,5E+08	8,54	5,2	0,88
UNIDADES ANÁLISIS									
Producto	Chorizo asturiano tradicional			<i>L. monocytogenes</i>		Microbiota BAL		pH	a _w
Muestra	Fecha	Tiempo	Horas	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
A22004895001	19/10/2022	0	0	2,2E+05	5,34	9,0E+05	5,95	5,8	0,96
A22004896001	21/10/2022	2	48	1,8E+05	5,26	4,5E+08	8,65	5,1	0,96
A22004897001	24/10/2022	5	120	2,5E+04	4,40	7,5E+08	8,88	5,1	0,93
A22004898001	27/10/2022	8	192	3,3E+04	4,52	3,8E+08	8,58	5,2	0,92
A22004899001	31/10/2022	12	288	3,5E+03	3,54	2,4E+08	8,38	5,2	0,91
Muestra	Fecha	Tiempo	Horas	Lote B	log ufc/g	Lote B	log ufc/g	Lote B	Lote B
A2200490001	19/10/2022	0	0	3,3E+05	5,52	1,5E+06	6,18	5,8	0,97
A22004901001	21/10/2022	2	48	4,3E+04	4,63	8,3E+08	8,92	5,1	0,94
A22004902001	24/10/2022	5	120	2,6E+04	4,41	6,3E+08	8,80	5,1	0,93
A22004903001	27/10/2022	8	192	6,5E+03	3,81	3,6E+08	8,56	5,2	0,92
A22004904001	31/10/2022	12	288	1,3E+02	2,11	1,5E+08	8,18	5,2	0,89
Muestra	Fecha	Tiempo	Horas	Lote C	log ufc/g	Lote C	log ufc/g	Lote C	Lote C
A22004905001	19/10/2022	0	0	3,3E+05	5,52	4,3E+05	5,63	5,9	0,96
A22004906001	21/10/2022	2	48	3,4E+04	4,53	7,6E+08	8,88	5,2	0,96
A22004907001	24/10/2022	5	120	3,4E+04	4,53	6,7E+08	8,83	5,1	0,93
A22004908001	27/10/2022	8	192	1,8E+04	4,26	9,9E+08	9,00	5,2	0,92
A22004909001	31/10/2022	12	288	4,1E+03	3,61	3,4E+08	8,53	5,2	0,89

Tiempo	Horas	0	48	120	192	
log ufc/g	h	h	h	h	h	δ
Lote A	5,34	5,26	4,40	4,52	3,54	-1,80
Lote B	5,52	4,63	4,41	3,81	2,11	-3,40
Lote C	5,52	4,53	4,53	4,26	3,61	-1,91
SD	0,10					

El proceso productivo no permite la proliferación de *Listeria monocytogenes*. Se observa diferencia significativa de potencial de inhibición entre lotes

Los resultados obtenidos en los ensayos de desafío para *Listeria monocytogenes*, en la formulación de ensayo 1 se muestran a continuación:

UNIDADES CONTROL									
Producto	Chorizo asturiano formulación ensayo			<i>L. monocytogenes</i>		Microbiota BAL		pH	a_w
Muestra	Fecha	Tiempo	Horas	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
A22004912001	19/10/2022	0	0	<10	-	8,1E+05	5,91	5,8	0,96
A22004913001	31/10/2022	12	288	<10	-	4,2E+08	8,62	5,2	0,90
Muestra	Fecha	Tiempo	Horas	Lote B	log ufc/g	Lote B	log ufc/g	Lote B	Lote B
A22004914001	19/10/2022	0	0	<10	-	8,1E+05	5,91	5,9	0,97
A22004915001	31/10/2022	12	288	<10	-	4,8E+08	8,68	5,2	0,89
Muestra	Fecha	Tiempo	Horas	Lote C	log ufc/g	Lote C	log ufc/g	Lote C	Lote C
A22004916001	19/10/2022	0	0	<10	-	7,8E+05	5,89	5,9	0,96
A22004917001	31/10/2022	12	288	<10	-	2,4E+08	8,38	5,2	0,89

UNIDADES ANÁLISIS									
Producto	Chorizo asturiano formulación ensayo			<i>L. monocytogenes</i>		Microbiota BAL		pH	a_w
Muestra	Fecha	Tiempo	Horas	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
A22004918001	19/10/2022	0	0	2,5E+05	5,40	8,8E+05	5,94	5,9	0,95
A22004919001	21/10/2022	2	48	4,3E+04	4,63	5,3E+08	8,72	5,2	0,96
A22004920001	24/10/2022	5	120	6,9E+04	4,84	3,0E+08	8,48	5,2	0,92
A22004921001	27/10/2022	8	192	3,5E+03	3,54	3,9E+08	8,59	5,2	0,93
A22004922001	31/10/2022	12	288	7,3E+02	2,86	1,3E+08	8,11	5,3	0,88
Muestra	Fecha	Tiempo	Horas	Lote B	log ufc/g	Lote B	log ufc/g	Lote B	Lote B
A22004923001	19/10/2022	0	0	3,7E+05	5,57	8,5E+06	6,93	5,9	0,97
A22004924001	21/10/2022	2	48	3,3E+04	4,52	5,6E+08	8,75	5,2	0,96
A22004925001	24/10/2022	5	120	6,3E+03	3,80	5,6E+08	8,75	5,1	0,93
A22004926001	27/10/2022	8	192	5,0E+03	3,70	4,0E+08	8,60	5,2	0,93
A22004927001	31/10/2022	12	288	3,0E+03	3,48	1,9E+08	8,28	5,2	0,88
Muestra	Fecha	Tiempo	Horas	Lote C	log ufc/g	Lote C	log ufc/g	Lote C	Lote C
A22004928001	19/10/2022	0	0	2,8E+05	5,45	6,1E+05	5,79	5,9	0,96
A22004929001	21/10/2022	2	48	3,5E+04	4,54	6,4E+08	8,81	5,2	0,96
A22004930001	24/10/2022	5	120	3,1E+04	4,49	4,4E+08	8,64	5,2	0,93
A22004931001	27/10/2022	8	192	5,3E+03	3,72	3,9E+08	8,59	5,2	0,92
A22004932001	31/10/2022	12	288	2,5E+03	3,40	1,4E+08	8,15	5,2	0,88

Tiempo	Horas	0	48	120	192	
log ufc/g	h	h	h	h	h	δ
Lote A	5,40	4,63	4,84	3,54	2,86	-2,53
Lote B	5,57	4,52	3,80	3,70	3,48	-2,09
Lote C	5,45	4,54	4,49	3,72	3,40	-2,05
SD	0,09					

El proceso productivo no permite la proliferación de *Listeria monocytogenes*.

Los resultados son muy similares si comparamos la formulación tradicional frente a la nueva formulación ensayada. Aunque se han obtenido resultados más homogéneos (menos desviación estándar) en la formulación Ensayo 1, con reducción de sales nitrificantes.

Posteriormente se realizó otra prueba de formulación de criollo cocido Ensayo 2, reduciendo a 120 ppm la cantidad de nitrito sódico y a 120 ppm el nitrato sódico.

Esta masa cárnica Ensayo 2 fue contaminada con los dos patógenos que pueden suponer un riesgo potencial en este tipo de productos, *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes*.

El nivel de contaminación establecido fue de entre 5,0 log ufc/g y 6,0 log de ufc/g para poder determinar la posible inactivación durante el proceso productivo de ambos patógenos.

Una vez fue contaminada deliberadamente con los microorganismos (por un lado, se realizó el ensayo de *Salmonella* entérica y por otro el ensayo de *Listeria monocytogenes*), la masa fue embutida y sometida al proceso de fermentación, secado y maduración.

Las muestras fueron analizadas a distintos tiempos a lo largo de los 12 días de elaboración determinando bien el recuento de *Salmonella* entérica o de *Listeria monocytogenes* (según cada caso), recuento de bacterias ácido-lácticas, determinación de pH y determinación de a_w .

Los resultados obtenidos en los ensayos de desafío para *Salmonella* entérica, en la formulación de ensayo 2 del chorizo asturiano fueron:

UNIDAD CONTROL								
Producto	Chorizo Asturiano Ensayo 2		<i>Salmonella</i>		BAL		pH	a_w
Muestra	Tiempo	Horas	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
P230133	0	0	<10	-	6,0E+06	6,78	5,7	0,97
P230134	15	360	<10	-	5,7E+08	8,76	5,4	0,93
UNIDAD TEST								
Producto	Chorizo Asturiano Ensayo 2		<i>Salmonella</i>		BAL		pH	a_w
Muestra	Tiempo	Horas	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
P230135	0	0	1,4E+05	5,15	7,8E+06	6,89	5,7	0,97
P230136	2	48	1,8E+05	5,26	1,2E+09	9,08	5,4	0,97
P230137	5	120	1,9E+05	5,28	2,2E+09	9,34	5,5	0,95
P230138	8	192	1,5E+05	5,18	5,2E+08	8,72	5,4	0,95
P230139	15	360	9,5E+04	4,98	5,7E+08	8,76	5,4	0,92

Tiempo	0	0	48	120	192	
log ufc/g	h	h	h	h	h	δ
Lote A	5,15	5,26	5,28	5,18	4,98	-0,17

El proceso productivo en el caso del Ensayo 2 es capaz de inhibir de forma muy ligera la proliferación de *Salmonella* entérica.

Los resultados obtenidos en los ensayos de desafío para *Listeria monocytogenes*, en la formulación de ensayo 2 se muestran a continuación:

UNIDADES CONTROL								
Producto	Chorizo asturiano ensayo 2		<i>L. monocytogenes</i>		Microbiota BAL		pH	a _w
Muestra	Tiempo	Horas	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
P230143	0	0	<10	-	1,2E+07	7,08	5,7	0,97
P230144	12	288	<10	-	8,3E+08	8,92	5,4	0,92
Muestra	Tiempo	Horas	Lote B	log ufc/g	Lote B	log ufc/g	Lote B	Lote B
P230145	0	0	<10	-	1,7E+07	7,23	5,7	0,96
P230146	12	288	<10	-	8,3E+08	8,92	5,4	0,92
Muestra	Tiempo	Horas	Lote C	log ufc/g	Lote C	log ufc/g	Lote C	Lote C
P230147	0	0	<10	-	1,2E+07	7,08	5,7	0,95
P230148	12	288	<10	-	4,8E+08	8,68	5,4	0,92
UNIDADES ANÁLISIS								
Producto	Chorizo asturiano ensayo 2		<i>L. monocytogenes</i>		Microbiota BAL		pH	a _w
Muestra	Tiempo	Horas	Lote A	log ufc/g	Lote A	log ufc/g	Lote A	Lote A
P230149	0	0	1,4E+05	5,15	2,7E+06	6,43	5,7	0,96
P230150	2	48	3,1E+05	5,49	9,5E+08	8,98	5,4	0,94
P230151	5	120	2,0E+05	5,30	6,3E+08	8,80	5,4	0,94
P230152	8	192	1,0E+05	5,00	6,4E+08	8,81	5,4	0,94
P230153	12	288	7,5E+04	4,88	8,3E+08	8,92	5,4	0,92
Muestra	Tiempo	Horas	Lote B	log ufc/g	Lote B	log ufc/g	Lote B	Lote B
P230154	0	0	1,4E+05	5,15	5,5E+06	6,74	5,7	0,96
P230155	2	48	2,5E+05	5,40	1,7E+09	9,23	5,4	0,94
P230156	5	120	1,9E+05	5,28	9,3E+08	8,97	5,4	0,94
P230157	8	192	1,4E+05	5,15	1,2E+09	9,08	5,4	0,94
P230158	12	288	9,6E+04	4,98	1,1E+09	9,04	5,4	0,92
Muestra	Tiempo	Horas	Lote C	log ufc/g	Lote C	log ufc/g	Lote C	Lote C
P230159	0	0	1,4E+05	5,15	4,0E+06	6,60	5,7	0,95
P230160	2	48	2,2E+05	5,34	7,1E+08	8,85	5,4	0,94
P230161	5	120	1,9E+05	5,28	8,1E+08	8,91	5,5	0,94
P230162	8	192	1,3E+05	5,11	3,6E+08	8,56	5,4	0,94
P230163	12	288	8,9E+04	4,95	6,4E+08	8,81	5,5	0,91

Tiempo	Horas	0	48	120	192	
log ufc/g	h	h	h	h	h	δ
Lote A	5,15	5,49	5,30	5,00	4,88	-0,27
Lote B	5,15	5,40	5,28	5,15	4,98	-0,16
Lote C	5,15	5,34	5,28	5,11	4,95	-0,20

El proceso productivo en el caso del Ensayo 2 es capaz de inhibir de forma muy ligera la proliferación de *Listeria monocytogenes*.

El potencial de inhibición obtenido tanto para *Salmonella entérica* como para *Listeria monocytogenes* es muy bajo.

Ensayo de Challenge test en producto cocido: criollo cocido.

Dentro de esta categoría se seleccionó la matriz chorizo criollo cocido como representante de este grupo para las primeras pruebas de reducción de sales nitrificantes.

Al igual que en el resto de los alimentos, se preparó la formulación tradicional a la que se adicionaron 150 ppm de nitrito sodio, concentración acorde con la legislación vigente. Paralelamente se preparó una nueva formulación a ensayar con la reducción nitrito sódico a 100 ppm.

Se seleccionaron dos microorganismos para la contaminación, *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes* y los ensayos de Challenge test se plantearon como estudios de inactivación.

Las muestras de chorizo criollo fueron contaminadas en superficie, simulando el posible proceso de contaminación al que podría estar sometido el producto tras la cocción y previo a su envasado. El nivel de contaminación esperado quedó establecido entre 3,0 log ufc/g y 4,0 log ufc/g. Una vez contaminado el producto con cada uno de los patógenos, éste es sometido a un tratamiento térmico post-ensado definido en 70 °C en cámara de horno, durante 20 minutos.

Los resultados del Challenge test de inactivación en el criollo cocido tradicional para *Salmonella entérica* se muestran a continuación:

Inoculación	Recuento de <i>Salmonella enterica</i> CECT 4594					
Muestra	Antes del tratamiento térmico		Muestra	Tratamiento	Después del tratamiento térmico	
	ufc/g	log ufc/g			ufc/g	log ufc/g
A22005747001	7,30E+03	3,86	A22005750001	70 °C, 20'	2,30E+03	3,36
A22005748001	4,10E+03	3,61	A22005751001	70 °C, 20'	4,30E+02	2,63
A22005749001	1,00E+04	4,00	A22005752001	70 °C, 20'	5,50E+02	2,74
	Promedio	3,83			Promedio	2,91
	SD	0,20			SD	0,39

Recuento de <i>S. enterica</i>		
N ₀	Nf	Potencial inactivación
3,83	2,91	0,91

El potencial de inactivación resultante fue de 0,91 log ufc/g.

Los resultados del Challenge test de inactivación en el criollo cocido tradicional para *Listeria monocytogenes* se muestran a continuación:

Inoculación	Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935					
Muestra	Antes del tratamiento térmico		Muestra	Tratamiento	Después del tratamiento térmico	
	ufc/g	log ufc/g			ufc/g	log ufc/g
A22057541001	4,70E+03	3,67	A22005744001	70 °C, 20'	3,00E+01	1,48
A22005742001	2,90E+03	3,46	A22005745001	70 °C, 20'	2,30E+02	2,36
A22005743001	1,90E+03	3,28	A22005746001	70 °C, 20'	7,00E+01	1,85
	Promedio	3,47			Promedio	1,89
	SD	0,20			SD	0,44

Recuento de <i>L. monocytogenes</i>		
N ₀	Nf	Potencial inactivación
3,47	1,89	1,58

En este caso, el potencial de inactivación resultante fue de 1,58 log ufc/g.

Los resultados del Challenge test de inactivación en el criollo cocido Ensayo 1, para *Salmonella entérica* se muestran a continuación:

Inoculación	Recuento de <i>Salmonella enterica</i> CECT 4594					
Muestra	Antes del tratamiento térmico		Muestra	Tratamiento	Después del tratamiento térmico	
	ufc/g	log ufc/g			ufc/g	log ufc/g
A22005784001	8,50E+03	3,93	A22005787001	70 °C, 20'	5,20E+01	1,72
A22005785001	1,10E+04	4,04	A220052788001	70 °C, 20'	1,00E+00	0,00
A22005786001	7,80E+03	3,89	A22005789001	70 °C, 20'	1,00E+00	0,00
	Promedio	3,95			Promedio	0,57
	SD	0,08			SD	0,99

Recuento de <i>S. enterica</i>		
N ₀	Nf	Potencial inactivación
3,95	0,57	3,38

El potencial de inactivación fue de 3,38 log ufc/g.

Los resultados del Challenge test de inactivación en el criollo cocido Ensayo 1, para *Listeria monocytogenes* se muestran a continuación:

Inoculación	Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935					
Muestra	Antes del tratamiento térmico		Muestra	Tratamiento	Después del tratamiento térmico	
	ufc/g	log ufc/g			ufc/g	log ufc/g
A22005790001	3,10E+03	3,49	A22005793001	70 °C, 20'	4,00E+00	0,60
A22005791001	2,90E+03	3,46	A22005794001	70 °C, 20'	1,20E+01	1,08
A22005792001	2,50E+03	3,40	A22005795001	70 °C, 20'	1,50E+01	1,18
	Promedio	3,45			Promedio	0,95
	SD	0,05			SD	0,31

Recuento de <i>L. monocytogenes</i>		
N ₀	Nf	Potencial inactivación
3,45	0,95	2,50

El potencial de inactivación fue de 2,50 log ufc/g.

Posteriormente se preparó una nueva formulación con reducción de nitrito sódico a 120 ppm.

Se seleccionaron los mismos microorganismos para la contaminación, *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes* y los ensayos de Challenge test se plantearon como estudios de inactivación.

Las muestras de chorizo criollo fueron contaminadas en superficie, simulando el posible proceso de contaminación al que podría estar sometido el producto previo al envasado. El nivel de contaminación esperado quedó establecido entre 3,0 log ufc/g y 4,0 log ufc/g.

Una vez contaminado el producto con cada uno de los patógenos, éste fue sometido a un tratamiento térmico post-ensado, en este caso definido en 70 °C en el interior del producto, durante 35 minutos.

Los resultados del Challenge test de inactivación en el criollo cocido Ensayo 2, para *Salmonella entérica* se muestran a continuación:

Inoculación	Recuento de <i>Salmonella enterica</i> CECT 4594					
Muestra	Antes del tratamiento térmico		Muestra	Tratamiento	Después del tratamiento térmico	
	ufc/g	log ufc/g			ufc/g	log ufc/g
P230306	7,30E+03	3,86	P230309	70 °C 35'	<10	-
P230307	8,00E+03	3,90	P230310	70 °C 35'	<10	-
P230308	7,50E+03	3,88	P230311	70 °C 35'	<10	-
	Promedio	3,88			Promedio	-
	SD	0,02			SD	-

Recuento de <i>S. enterica</i>		
	Nf	Potencial inactivación
3,88	0,00	3,88

El potencial de inactivación fue de 3,88 log ufc/g.

Los resultados del Challenge test de inactivación en el criollo cocido Ensayo 2, para *Listeria monocytogenes* se muestran a continuación:

Inoculación	Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935					
Muestra	Antes del tratamiento térmico		Muestra	Tratamiento	Después del tratamiento térmico	
	ufc/g	log ufc/g			ufc/g	log ufc/g
P230312	8,90E+03	3,95	P230315	70 °C 35'	<10	-
P230313	4,70E+03	3,67	P230316	70 °C 35'	<10	-
P230314	7,80E+03	3,89	P230317	70 °C 35'	<10	-
	Promedio	3,84			Promedio	-
	SD	0,15			SD	-

Recuento de <i>L. monocytogenes</i>		
	Nf	Potencial inactivación
3,84	0,00	3,84

El potencial de inactivación fue de 3,84 log ufc/g.

Ensayo de Challenge test en producto cocido: lacón cocido.

Dentro de esta categoría se seleccionó también la matriz lacón cocido. Nuevamente se trabajó con una formulación tradicional con una adición teórica de 150 ppm de nitrito sódico y una formulación de ensayo a la que se adicionaron 100 ppm de nitrito sódico.

Se seleccionaron dos microorganismos para la contaminación, *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes* para la realización de los ensayos de Challenge test de inactivación.

Las muestras de lacón cocido fueron contaminadas en superficie, previamente al envasado. El nivel de contaminación esperado quedó establecido entre 2,0 log ufc/g y 3,0 log ufc/g.

El producto fue sometido a un tratamiento térmico de 70 °C en el interior del producto, durante 30 minutos. Los resultados del Challenge test de inactivación en el producto tradicional para *Salmonella entérica* se muestran a continuación:

Inoculación	Recuento de <i>Salmonella enterica</i> CECT 4594					
Muestra	Antes del tratamiento térmico		Muestra	Tratamiento	Después del tratamiento térmico	
	ufc/g	log ufc/g			ufc/g	log ufc/g
A23000154001	1,90E+02	2,28	A23000157001	35' 70°C	<10	-
A23000155001	3,00E+02	2,48	A23000158001	35' 70°C	<10	-
A23000156001	2,50E+02	2,40	A23000159001	35' 70°C	<10	-
	Promedio	2,38			Promedio	-
	SD	0,10			SD	-

Recuento de <i>S. enterica</i>		
N ₀	Nf	Potencial inactivación
2,38	0,00	2,38

El potencial de inactivación fue de 2,38 log ufc/g.

Los resultados del Challenge test de inactivación en el producto tradicional para *Listeria monocytogenes* se muestran a continuación:

Inoculación	Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935					
Muestra	Antes del tratamiento térmico		Muestra	Tratamiento	Después del tratamiento térmico	
	ufc/g	log ufc/g			ufc/g	log ufc/g
A23000137001	1,20E+03	3,08	A23000140001	35' 70°C	<10	-
A23000138001	1,40E+03	3,15	A23000141001	35' 70°C	<10	-
A23000139001	1,10E+03	3,04	A23000142001	35' 70°C	<10	-
	Promedio	3,09			Promedio	-
	SD	0,05			SD	-

Recuento de <i>L. monocytogenes</i>		
N ₀	Nf	Potencial inactivación
3,09	0,00	3,09

El potencial de inactivación fue de 3,09 log ufc/g.

Los resultados del Challenge test de inactivación en el producto ensayo para *Salmonella entérica* se muestran a continuación:

Inoculación	Recuento de <i>Salmonella enterica</i> CECT 4594					
Muestra	Antes del tratamiento térmico		Muestra	Tratamiento	Después del tratamiento térmico	
	ufc/g	log ufc/g			ufc/g	log ufc/g
A23000160001	2,20E+02	2,34	A23000163001	35' 70°C	<10	-
A23000161001	2,90E+02	2,46	A23000164001	35' 70°C	<10	-
A23000162001	3,10E+02	2,49	A23000165001	35' 70°C	<10	-
	Promedio	2,43			Promedio	-
	SD	0,08			SD	-

Recuento de <i>S. enterica</i>		
N ₀	Nf	Potencial inactivación
2,43	0,00	2,43

El potencial de inactivación fue de 2,43 log ufc/g.

Los resultados del Challenge test de inactivación en el producto ensayo para *Listeria monocytogenes* se muestran a continuación:

Inoculación	Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 935					
Muestra	Antes del tratamiento térmico		Muestra	Tratamiento	Después del tratamiento térmico	
	ufc/g	log ufc/g			ufc/g	log ufc/g
A23000143001	1,20E+03	3,08	A23000146001	35' 70°C	<10	-
A23000144001	7,50E+02	2,88	A23000147001	35' 70°C	<10	-
A23000145001	8,10E+02	2,91	A23000148001	35' 70°C	<10	-
	Promedio	2,95			Promedio	-
	SD	0,11			SD	-

Recuento de <i>L. monocytogenes</i>		
N ₀	Nf	Potencial inactivación
2,95	0,00	2,95

El potencial de inactivación fue de 2,95 log ufc/g.

Indicadores de grado avance del proyecto: Se han desarrollado ensayos de desafío con los patógenos listeria y/o salmonella en costilla adobada, lomo adobado, chorizo asturiano, criollo cocido y lacón cocido.

Tarea T3.2.- Evaluación a nivel de Conservación (antioxidante y vida útil)

- Estudios de Vida útil:

La vida útil es habitualmente definida como el periodo de tiempo, bajo unas condiciones definidas de conservación, durante el cual un alimento es apto para su consumo. En otras palabras, es el periodo durante

en el que el producto mantiene sus características sensoriales, físico-químicas, funcionales o microbiológicas y se mantiene acorde con la información nutricional declarada. La vida útil es una característica fundamental durante la fabricación y comercialización de alimentos.

Para evaluar la conservación de los productos ensayados a lo largo del proyecto se plantearon estudios de vida útil en los que se evaluó la estabilidad oxidativa, evaluación microbiológica y evolución del pH y aw a lo largo del tiempo de conservación.

En relación con la evaluación microbiológica se seleccionaron en cada caso los microorganismos o grupos de microorganismos que pueden ser relacionados con reacciones de deterioro en función de cada tipo de producto.

Los ensayos de vida útil fueron planteados como estudios de durabilidad, tomando varias unidades de cada una de las producciones experimentales que fueron conservadas en refrigeración a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez elaborado el producto (tiempo cero) se realizaron los análisis de caracterización inicial del producto y posteriormente se fueron analizado muestras a lo largo del tiempo estimado de conservación. Este método sirve para determinar en qué momento se produce una pérdida de calidad del producto que determine la vida útil o bien que la seguridad alimentaria pudiera llegar a estar comprometida.

Vida útil de preparado fresco: Lomo adobado fresco

En este caso se estimó una vida útil esperada del producto de 60 días, en las condiciones de refrigeración anteriormente mencionadas y en producto envasado al vacío (vacío convencional). Se tomaron varias unidades a tiempo inicial, tanto de producto con formulación tradicional, como de formulaciones de ensayo y se determinaron a lo largo del tiempo de conservación el recuento de Enterobacterias, recuento de bacterias ácido-lácticas (BAL), determinación de pH y determinación de aw.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas a continuación:

Formulación tradicional

Producto		Lomo adobado formulación tradicional			
Muestra	Tiempo	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL	pH	aw
		ufc/g	ufc/g		
1264P	0	15000	>490000	5,6	0,96
1265P	11	>490000	>490000000	5,8	0,96
1266P	20	>4900000	170000000	6,0	0,96
1267P	29	1,00E+06	1,70E+08	6,0	0,96
1268P	39	1,00E+05	6,90E+07	5,2	0,95
1269P	48	1,00E+04	2,50E+08	5,5	0,94
1270P	60	1,40E+04	1,70E+08	5,5	0,94

Formulación Ensayo 1

Producto		Lomo adobado formulación ensayo			
Muestra	Tiempo	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL	pH	aw
		ufc/g	ufc/g		
1271P	0	81	>490000	5,3	0,95
1272P	11	21	>49000000	5,3	0,95
1273P	20	21	7,00E+07	5,3	0,95
1274P	29	21	1,00E+08	5,2	0,94
1275P	39	4,90E+04	1,00E+07	5,8	0,93
1276P	48	1,00E+04	4,90E+07	5,3	0,95
1277P	60	<1000	1,40E+08	5,5	0,94

Formulación Ensayo 2

Producto		Lomo adobado formulación ensayo E2			
Muestra	Tiempo	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL	pH	aw
		ufc/g	ufc/g		
P230282	0	1,0E+01	3,6E+03	5,7	0,97
P230283	13	1,0E+00	>4,9E6	5,5	0,96
P230284	20	1,0E+00	1,2E+07	5,3	0,96
P230285	29	1,0E+00	9,0E+07	5,3	0,95
P230286	40	1,0E+00	2,9E+08	5,4	0,95
P230287	48	1,0E+00	2,1E+07	5,4	0,94
P230288	61	1,0E+00	5,8E+07	5,5	0,95

Formulación Ensayo 3

Producto		Lomo adobado formulación ensayo E3			
Muestra	Tiempo	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL	pH	aw
		ufc/g	ufc/g		
P230290	0	2,1E+01	>4,9E5	5,6	0,97
P230291	13	1,0E+00	>4,9E7	5,3	0,97
P230292	20	1,0E+00	4,1E+08	5,1	0,95
P230293	29	1,0E+00	2,3E+08	5,1	0,97
P230294	40	1,0E+00	4,0E+08	5,0	0,94
P230295	48	1,0E+00	4,4E+07	4,9	0,96
P230296	61	1,0E+00	2,7E+08	4,9	0,94

Formulación Ensayo 4

Producto		Lomo adobado formulación ensayo E4			
Muestra	Tiempo	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL	pH	aw
		ufc/g	ufc/g		
P230511	0	8,3E+02	>4,9E5	5,7	0,97

P230512	12	1,0E+01	9,1E+06	5,4	0,96
P230513	20	8,3E+02	7,4E+06	5,0	0,95
P230514	29	<10	3,0E+07	-	-
P230515	41	3,2E+01	8,3E+06	5,1	0,95
P230516	48	1,4E+02	3,3E+06	5,1	0,95

Formulación Ensayo 5

Producto		Lomo adobado formulación ensayo E5			
Muestra	Tiempo	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL	pH	aw
		ufc/g	ufc/g		
P230519	0	<10	1,8E+03	5,6	0,97
P230520	12	<10	>4,9E5	5,4	0,96
P230521	20	<10	1,4E+06	5,2	0,95
P230522	29	<10	1,1E+07	-	-
P230523	41	<10	1,0E+06	5,2	0,93
P230524	48	<10	3,3E+06	5,3	0,96

Vida útil de preparado fresco: Costilla Adobada

Se estimó una vida útil esperada del producto de unos 50 días, en las condiciones de refrigeración y envasado al vacío (vacío convencional). Se tomaron varias unidades a tiempo inicial, tanto de producto con formulación tradicional, como de formulación de ensayo y se determinaron a lo largo del tiempo de conservación el recuento de Enterobacterias, recuento de bacterias ácido-lácticas (BAL), determinación de pH y determinación de aw.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas a continuación:

Costilla Adobada Tradicional

Producto		Costilla Adobada Tradicional			
Muestra	Tiempo	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL	pH	aw
		ufc/g	ufc/g		
230012P	0	2,5E+03	1,2E+05	6,18	0,96
230013P	13	2,1E+04	3,0E+08	5,32	0,96
230014P	20	2,1E+04	3,0E+08	5,1	0,95
230015P	29	1,7E+06	4,9E+07	5,34	0,95
230016P	40	1,0E+05	1,1E+09	5,8	0,94
230017P	47	1,0E+01	4,5E+08	5,39	0,94

Costilla Adoba Ensayo 1

Producto		Costilla Adobada Ensayo 1			
Muestra	Tiempo	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL	pH	aw
		ufc/g	ufc/g		
230021P	0	3,3E+02	3,4E+04	4,71	0,94
230022P	13	8,1E+01	4,4E+04	6,08	0,94
230023P	20	5,9E+01	4,9E+06	5,94	0,95
230024P	29	8,1E+02	2,5E+08	5,53	0,96
230025P	40	7,3E+02	6,8E+07	5,32	0,95
230026P	47	4,5E+01	1,5E+08	5,61	0,95

Vida útil de producto curado: chorizo asturiano.

El producto seleccionado fue chorizo asturiano con una vida útil esperada de 90 días. El estudio de vida útil se llevó a cabo tanto en el producto tradicional como en las nuevas formulaciones desarrolladas en la ejecución del proyecto.

Los parámetros de vida útil evaluados fueron el recuento de *E. coli*, detección de *Salmonella* spp., recuento de *Listeria monocytogenes* y determinación de pH y aw.

Formulación tradicional

Producto		Chorizo asturiano formulación tradicional				
Muestra	Tiempo	Recuento de <i>E. coli</i>	Detección <i>Salmonella</i> spp.	Recuento de <i>L. monocytogenes</i>	pH	aw
		ufc/g	en 25 g	ufc/g		
1206P	0	10	No detectado	<10	5,3	0,86
1207P	15	<10	No detectado	<10	5,1	0,87
1208P	30	<10	No detectado	<10	5,2	0,87
1209P	45	<10	No detectado	<10	5,3	0,86
1210P	58	<10	No detectado	<10	5,2	0,83
1211P	75	<10	No detectado	<10	5,2	0,86
1212P	90	<10	No detectado	<10	5,2	0,82

Formulación ensayo 1

Producto		Chorizo asturiano formulación ensayo				
Muestra	Tiempo	Recuento de <i>E. coli</i>	Detección <i>Salmonella</i> spp.	Recuento de <i>L. monocytogenes</i>	pH	aw
		ufc/g	en 25 g	ufc/g		
1213P	0	32	No detectado	<10	5,3	0,87
1214P	15	<10	No detectado	<10	5,2	0,9
1215P	30	<10	No detectado	<10	5,3	0,87
1216P	45	<10	No detectado	<10	5,2	0,87
1217P	58	<10	No detectado	<10	5,2	0,88
1218P	75	<10	No detectado	<10	5,2	0,87
1219P	90	<10	No detectado	<10	5,2	0,86

Formulación ensayo 2

Producto		Chorizo asturiano formulación ensayo 2				
Muestra	Tiempo	Recuento de <i>E. coli</i>	Detección <i>Salmonella</i> spp.	Recuento de <i>L. monocytogenes</i>	pH	aw
		ufc/g	en 25 g	ufc/g		
P230173	0	2,0E+03	No Detectado	<10	5,4	0,90
P230174	16	<10	No Detectado	<10	5	0,90
P230175	30	<10	No Detectado	<10	5,1	0,90
P230176	45	<10	No Detectado	<10	5,1	0,89
P230177	59	<10	No Detectado	<10	5,1	0,89
P230178	77	<10	No Detectado	<10	5,2	0,89
P230179	91	<10	No Detectado	<10	5,1	0,89

Vida útil de producto curado: lacón curado

Se ha realizado un estudio de vida útil a 90 días, en producto conservado en refrigeración y envasado en bolsa de vacío.

Se ensayó una formulación tradicional con la adición de sales nitrificantes según legislación vigente y una formulación de ensayo con reducción de nitrificantes, tanto en fresco como descongelada. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Formulación tradicional

Producto		Lacón curado formulación tradicional				
Muestra	Tiempo	Recuento de Aerobios Mesófilos	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL	pH	aw
		ufc/g	ufc/g	ufc/g		
P230576	3	3,4E+05	<10	<100	-	-
P230577	10	1,4E+05	<10	1,0E+02	6,1	0,90
P230578	20	5,3E+04	<10	1,3E+02	6,0	0,90
P230579	32	1,9E+05	<10	<100	5,9	0,91
P230580	40	2,3E+05	<10	<100	5,8	0,91
P230581	53	2,4E+06	<10	<100	5,7	0,92
P230582	61	3,9E+06	<10	<100	5,9	0,92
P230583	75	3,6E+06	<10	<100	5,9	0,9
P230584	90	1,0E+07	<10	4,9E+05	5,9	0,88

Formulación ensayo 1

Producto		Lacón curado formulación ensayo E1				
Muestra	Tiempo	Recuento de Aerobios Mesófilos	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL	pH	aw
		ufc/g	ufc/g	ufc/g		
P230585	3	2,1E+06	<10	1,4E+04	-	-
P230586	10	<1,0E5	<10	<1,0E3	6,1	0,92
P230587	20	1,1E+07	<10	<100	5,9	0,90
P230588	32	1,0E+06	3,2E+01	5,7E+02	5,7	0,89
P230589	40	2,1E+05	<10	1,7E+04	5,6	0,89
P230590	53	4,9E+07	<10	2,1E+06	5,9	0,94
P230591	61	5,3E+07	<10	<100	6,3	0,93
P230592	75	3,0E+07	<10	6,0E+04	6	0,91
P230593	90	5,5E+06	<10	9,0E+05	5,9	0,92

Formulación ensayo 2

Producto		Lacón curado formulación ensayo E2				
Muestra	Tiempo	Recuento de Aerobios Mesófilos	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL	pH	aw
		ufc/g	ufc/g	ufc/g		
P230594	3	2,5E+06	7,0E+02	1,0E+02	-	-
P230595	10	1,0E+05	<100	<100	6,1	0,92
P230596	20	4,5E+06	<10	2,0E+02	5,8	0,88
P230597	32	2,6E+06	<10	1,9E+03	5,9	0,89
P230598	40	5,7E+06	<10	<1,0E3	5,8	0,89
P230599	53	1,8E+06	<10	<100	5,8	0,89
P230600	61	1,6E+06	<10	2,8E+03	5,7	0,88
P230601	75	2,1E+07	<10	2,0E+02	5,9	0,9
P230602	90	5,9E+06	<10	1,0E+02	5,9	0,89

Vida útil de criollo cocido

En este caso una vez elaborado el producto, fue sometido a un tratamiento térmico de pasteurización en los ensayos 1 y 2, tratamiento tecnológico que mejora significativamente la vida útil del producto. En el caso del ensayo 3 el producto fue inoculado con un cultivo BAL de propiedades bioconservadoras, previamente a su envasado.

La vida útil del producto esperada inicialmente fue de 90 días, en producto conservado en refrigeración y en envasado en bolsa de vacío.

Nuevamente se ensayó una formulación tradicional con la adición de sales nitrificantes establecidas en la legislación vigente y formulaciones de ensayo con reducción de éstos.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas a continuación.

Formulación tradicional:

Producto		Chorizo criollo cocido formulación tradicional				
Muestra	Tiempo	Recuento de Aerobios mesófilos	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL	Recuento de Clostridium sr	pH
		ufc/g	ufc/g	ufc/g	ufc/g	
1288P	0	<1,0E+03	<10	<100	<10	-
1289P	13	<1,0E+03	<10	<100	<10	6,4
1290P	30	<1,0E+03	<10	<100	<10	5,6
1291P	45	3,6E+04	<10	<100	<10	5,6
1292P	60	2,0E+03	<10	<100	<10	-
1293P	75	>4,9E+06	<10	>4,9E+06	<10	6,2
1294P	90	2,1E+07	<10	<1,0E+04	<10	6,3

Formulación ensayo 1

Producto		Chorizo criollo cocido formulación ensayo				
Muestra	Tiempo	Recuento de Aerobios mesófilos	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL	Recuento de Clostridium sr	pH
		ufc/g	ufc/g	ufc/g	ufc/g	
1296P	0	<1,0E+03	<10	<100	<10	-
1297P	13	<1,0E+03	<10	<100	<10	6,3
1298P	30	3,7E+06	<10	<100	<10	5,7
1299P	45	2,8E+06	<10	<100	<10	6,4
1300P	60	3,9E+06	<10	<100	<10	-
1301P	75	2,1E+05	<10	<100	<10	6,4
1302P	90	<1,0E+04	<10	<100	<10	6,3

Formulación ensayo 2

Producto		Chorizo criollo cocido formulación ensayo E2				
Muestra	Tiempo	Recuento de Aerobios mesófilos	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL	Recuento de Clostridium sr	pH
		ufc/g	ufc/g	ufc/g	ufc/g	
P230319	0	1,0E+03	<10	<100	<10	6,2
P230320	16	<1,0E3	<10	<100	<10	6,3
P230321	30	<1,0E3	<10	<100	<10	6,3
P230322	44	1,0E+03	<10	<100	<10	-
P230323	62	1,6E+04	<10	1,0E+02	<10	6,3
P230324	77	>4,9E6	<10	>4,9E4	<10	6,3

Formulación ensayo 3

Producto		Chorizo criollo cocido formulación ensayo E3				
Muestra	Tiempo	Recuento de Aerobios mesófilos	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL	Recuento de Clostridium sr	pH
		ufc/g	ufc/g	ufc/g	ufc/g	
P230327	0	1,7E+06	<10	2,3E+06	<10	6,2
P230328	16	5,7E+06	1,0E+01	2,8E+06	<10	6,2
P230329	30	3,9E+07	<10	1,7E+08	<10	6,1
P230330	44	>4,9E7	<10	>4,9E5	<10	-
P230331	62	2,4E+08	<10	1,5E+08	<10	5,7
P230332	77	1,3E+09	<10	4,1E+08	<10	5,3

Estudio microbiológico de pasteurización en lacón cocido

En ambos casos, se realizaron estudios de vida útil a 90 días, evaluando en cada punto de muestreo el recuento de aerobios mesófilos, recuento de enterobacterias y recuento de bacterias ácido lácticas. En ambas pruebas los valores analizados se han mantenido por debajo de los límites establecidos hasta los 90 días, en el caso de las enterobacterias no ha crecido en ningún punto de los estudios de vida útil.

En los siguientes cuadros se representan los resultados obtenidos antes y después del tratamiento de conservación para cada una de las formulaciones tradicional y ensayo.

Formulación tradicional:

Producto		Lacón cocido formulación tradicional		
Muestra	Tiempo	Recuento de Aerobios mesófilos	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL
		ufc/g	ufc/g	ufc/g
0057P	0	<1000	<10	<100
0058P	0	<100	<10	<10

Formulación ensayo 1:

Producto		Lacón cocido formulación ensayo		
Muestra	Tiempo	Recuento de Aerobios mesófilos	Recuento de Enterobacterias	Recuento de BAL
		ufc/g	ufc/g	ufc/g
0065P	0	<1000	<10	<100
0066P	0	<100	<10	<10

- **Cantidades residuales de nitrito/nitrato en las pruebas experimentales:**

Entre las actividades de evaluación de los productos ensayados para cada formulación, se procedió a determinar el contenido a nivel de nitratos y nitritos residuales. El objetivo de estas determinaciones está encaminado a validar el cumplimiento de límites máximos residuales, que pudiesen ser regulados a través de cambios en la normativa vigente.

En la tarea 4.2, se analizan los resultados obtenidos de niveles residuales de nitrito y nitrato para cada una de las 6 referencias objeto de estudio.

Los niveles residuales de nitrito (en forma de ion nitrito y nitrito sódico) obtenidos en cada ensayo se muestran a continuación en la siguiente tabla:

		NITRITO			
		Límite		Límite	
PRODUCTO	MUESTRA	NO ₂	Residual	NaNO ₂	Residual2
CHORIZO ASTURIANO	ENSAYO 2	<3,4	45	<5	67
CHORIZO ASTURIANO	ENSAYO 1	<6,0	45	<9,0	67
CHORIZO ASTURIANO	TRADICIONAL	<6,0	45	<9,0	67
LACON COCIDO	ENSAYO	36,4	45	54,5	67
LACON COCIDO	TRADICIONAL	24,3	45	36,3	67
CRIOLLO COCIDO	ENSAYO 1	<6,0	45	<9,0	67
CRIOLLO COCIDO	ENSAYO 2	<3,4	45	<5	67
CRIOLLO COCIDO	ENSAYO 3	<3,4	45	<5	67
CRIOLLO COCIDO	TRADICIONAL	<6,0	45	<9,0	67
LOMO ADOBADO	ENSAYO 1	<6,0	45	<9,0	67
LOMO ADOBADO	ENSAYO 2	<3,4	45	<5	67
LOMO ADOBADO	ENSAYO 3	<3,4	45	<5	67
LOMO ADOBADO	ENSAYO 4	<3,4	45	<5	67
LOMO ADOBADO	ENSAYO 5	<3,4	45	<5	67
LOMO ADOBADO	TRADICIONAL	<6,0	45	<9,0	67
LACON CURADO	TRADICIONAL	<3,4	45	<5	67
LACON CURADO	ENSAYO 1	<3,4	45	<5	67
LACON CURADO	ENSAYO2	<3,4	45	<5	67
COSTILLA ADOBADA	TRADICIONAL	3,6	45	5,4	67
COSTILLA ADOBADA	ENSAYO 1	<3,4	45	<5	67

Los niveles residuales de nitrato (en forma de ion nitrato y nitrato sódico) obtenidos en cada ensayo se muestran en el siguiente cuadro:

		NITRATO			
PRODUCTO	MUESTRA	Límite		Límite	
		NO ₃	Residual	NaNO ₃	Residual2
LOMO ADOBADO	ENSAYO 1	16,8	n.a.	23	n.a.
LOMO ADOBADO	ENSAYO 2	49,8	n.a.	68,3	n.a.
LOMO ADOBADO	ENSAYO 3	67,8	n.a.	92,8	n.a.
LOMO ADOBADO	ENSAYO 4	14,1	n.a.	19,3	n.a.
LOMO ADOBADO	ENSAYO 5	16,7	n.a.	22,9	n.a.
LOMO ADOBADO	TRADICIONAL	21,9	n.a.	30	n.a.
LACON CURADO	TRADICIONAL	50,3	90	68,9	120
LACON CURADO	ENSAYO 1	34,3	90	47,0	120
LACON CURADO	ENSAYO2	70,8	90	96,9	120
LACON COCIDO	ENSAYO	18,0	n.a.	24,7	n.a.
LACON COCIDO	TRADICIONAL	17,6	n.a.	24,1	n.a.
CRIOLLO COCIDO	ENSAYO 1	68,6	n.a.	94	n.a.
CRIOLLO COCIDO	ENSAYO 2	111,0	n.a.	152	n.a.
CRIOLLO COCIDO	ENSAYO 3	106,6	n.a.	146	n.a.
CRIOLLO COCIDO	TRADICIONAL 2	114,6	n.a.	157	n.a.
CRIOLLO COCIDO	TRADICIONAL 1	95,3	n.a.	130,5	n.a.
COSTILLA ADOBADA	TRADICIONAL	58,4	90	80	120
COSTILLA ADOBADA	ENSAYO 1	42,34	90	58	120
CHORIZO	ENSAYO 2	279,6	90	383	120
CHORIZO	ENSAYO 1	94,3	90	129,2	120
CHORIZO	TRADICIONAL	214,5	90	293,9	120

- **Estabilidad Oxidativa:**

El índice de peróxidos es una medida de la concentración de los productos primarios de la oxidación de la grasa o hidroperóxidos, que se expresa como miliequivalentes de los peróxidos por kilogramo de grasa extraída. Indica el estado de enranciamiento de la grasa.

El índice de peróxidos aumenta hasta un punto máximo, después del cual empieza a disminuir por la formación de otros compuestos, como son aldehídos y cetonas. Pero la generación de compuestos que dan olor a rancio continúa aumentando a lo largo del tiempo. Por esta razón el método está limitado a las primeras etapas de la oxidación: que un alimento demasiado oxidado tenga un índice bajo de peróxidos (con sus propiedades organolépticas alteradas) es propio de reacciones avanzadas. Por este motivo, se debe tener cuidado al interpretar los resultados. Se trata de una determinación sencilla y de fácil aplicación. Sin embargo, los resultados presentan rangos de variabilidad amplios y son métodos extremadamente sensibles a los cambios de temperatura.

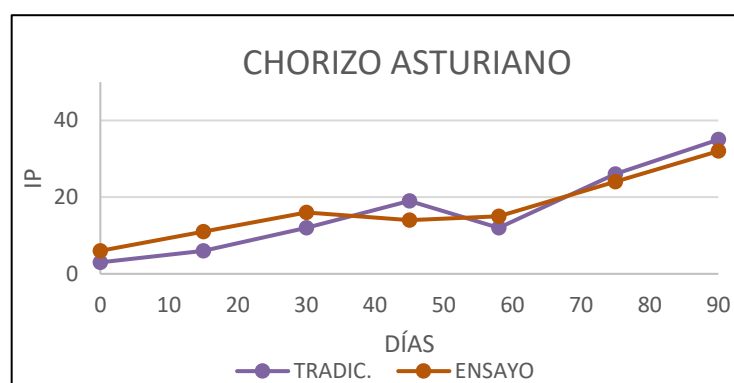
La determinación del índice de peróxidos indica el grado de oxidación en el momento del análisis, es decir, en un momento determinado en el tiempo, permitiendo así evaluar en un periodo de tiempo cómo evoluciona.

En el marco del proyecto NitraOut, la valoración del índice de peróxidos como indicador de la oxidación lipídica y su estado de enranciamiento (estabilidad oxidativa) se ha orientado hacia tres de las referencias ensayadas: los dos productos crudo-curados, chorizo y lacón curado, y el criollo cocido por su destacado contenido en grasa. En el caso de los derivados adobados, por su contenido en pimentón, y en el caso del lacón cocido, por el bajo nivel de grasa que presenta, no se ha considerado de elección el índice de peróxidos como metodología para evaluar su estabilidad oxidativa.

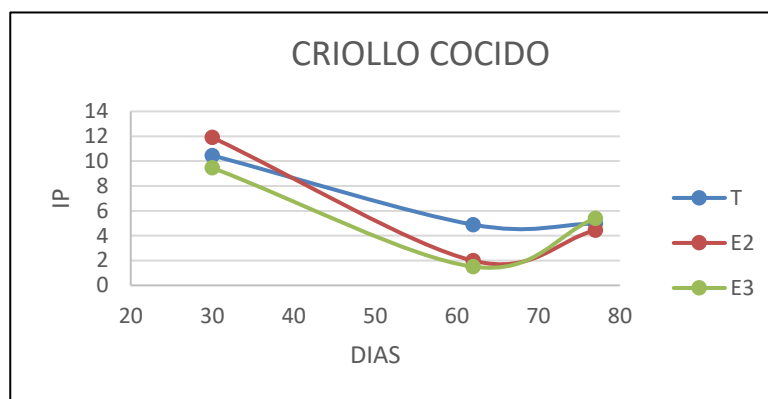
De forma general, cuanto menor es el índice de peróxidos en un tiempo determinado mejor se va a conservar el producto porque menos probabilidades tendrán de oxidarse. Pero el índice de peróxidos en una grasa a lo largo del tiempo tiene un comportamiento «gaussiano», va aumentando hasta un determinado nivel y a partir de ahí comienza a bajar, aunque se siga oxidando, ya que los peróxidos se transforman en radicales o grupos funcionales más oxidados como cetonas o aldehídos, por ello cuando se mide en un momento dado el índice de peróxido no sabemos si estamos en la zona de subida o de bajada.

Este parámetro depende mucho de la composición de ácidos grasos del producto, así como de las condiciones conservación posterior. El empleo de envases no adecuados, grasas no protegidas de la luz /calor y la presencia de aditivos antioxidantes en el producto van a influir en la evolución del enranciamiento.

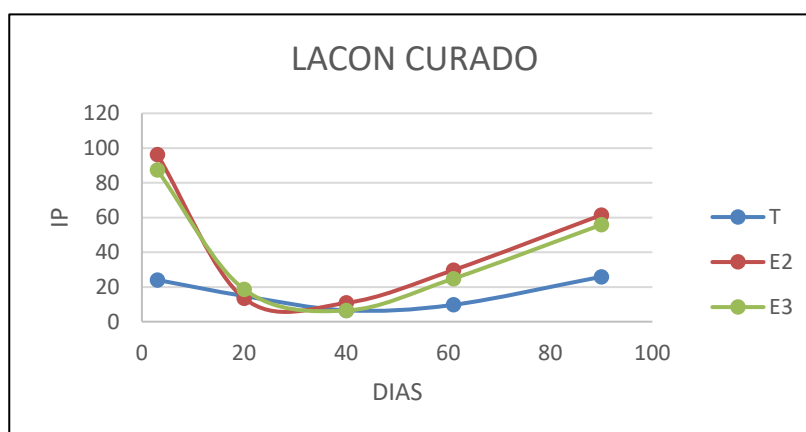
A continuación, se señalan los valores determinados de índice de peróxidos en las pruebas experimentales de chorizo asturiano a lo largo de su vida útil en formulación tradicional y en ensayo 1. En ambos casos los resultados obtenidos son satisfactorios, y están alineados con los resultados obtenidos a nivel sensorial por el panel de cata, donde no se han detectado sabores o aromas a rancio en el producto.



En el siguiente gráfico se representa la evolución de los peróxidos en criollo cocido en tres puntos a lo largo de su vida útil a 90 días. Los datos obtenidos en general son bajos y, por tanto, en línea con los resultados obtenidos en el análisis sensorial realizado por el panel de cata.



En el caso del lacón curado, la valoración del índice de peróxidos ha ofrecido datos poco concluyentes, especialmente a tiempo inicial de la vida útil con valores anormalmente elevados en los dos ensayos, sin correspondencia con los resultados para la evaluación del parámetro de sabor rancio por el panel de cata.



Indicadores de grado avance del proyecto: Se han realizado y finalizado estudios de vida útil en base a características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales en las pruebas experimentales en cada uno de los productos objeto de estudio del proyecto. Se ha finalizado un estudio de estabilidad oxidativa en chorizo asturiano, criollo cocido y lacón curado.

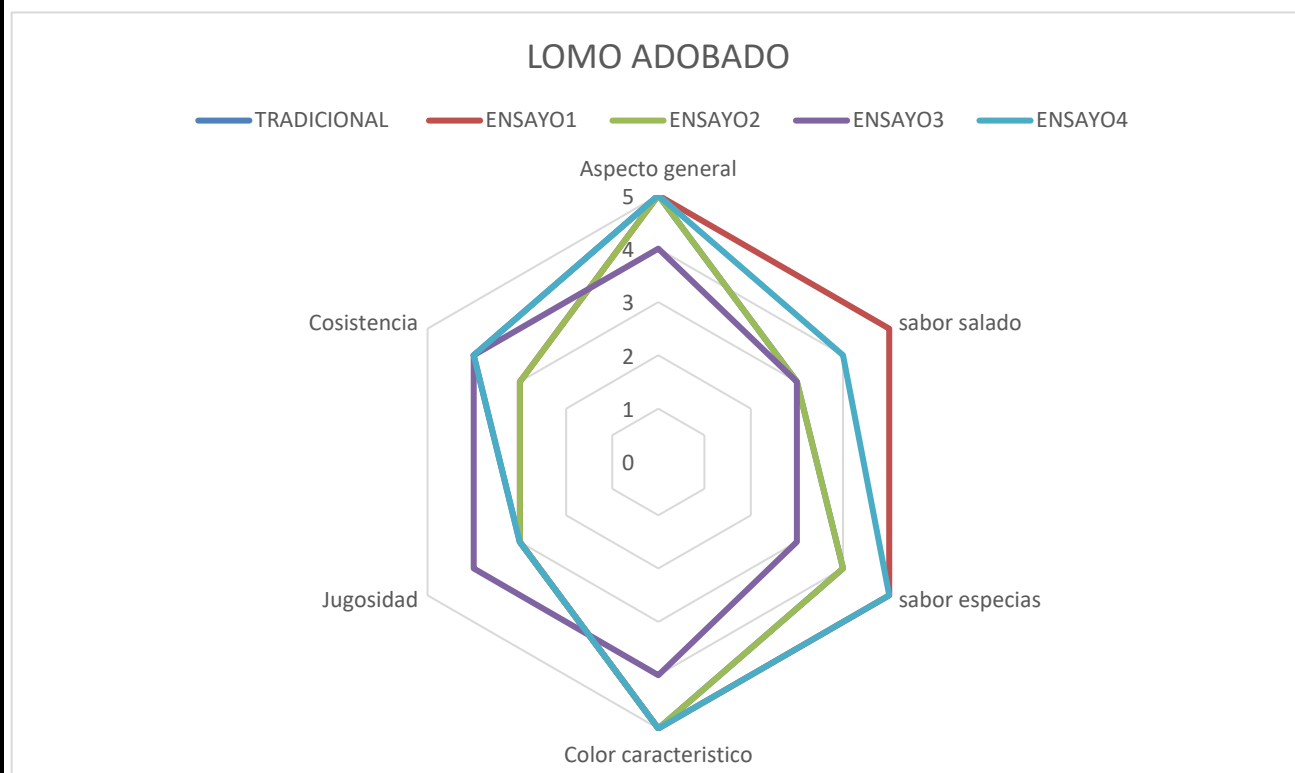
Tarea T3.3.- Evaluación a nivel Organoléptico

- Estudio por panel de cata.

Este trabajo ha sido realizado por el panel de cata experto de ASINCAR, entrenado en los principios del análisis sensorial para la evaluación de derivados cárnicos. La cata diseñada fue descriptiva, en condiciones ciegas y bajo las buenas prácticas de realización de una cata alimentaria, desarrollada por al menos 4 catadores expertos y formados.

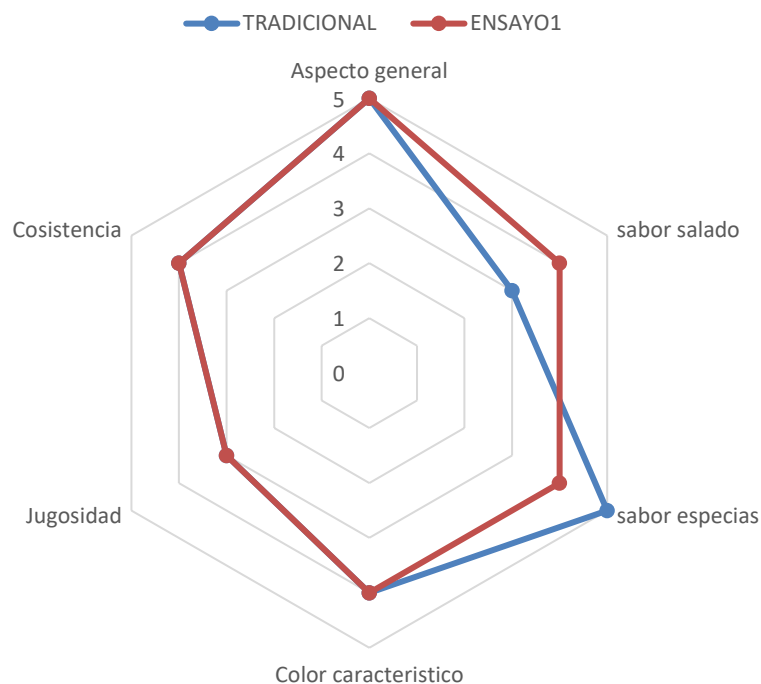
Se han desarrollado fichas de cata específicas para cada tipo de derivado cárnico con el objeto de desarrollar los análisis descriptivos al inicio de la vida útil de cada producto para su caracterización.

El análisis descriptivo desarrollado se basa en la medición de cada uno de los atributos considerados en las fichas diseñadas, mediante una escala numérica 1 a 5. El análisis de los resultados de las catas se realizó calculando la moda de cada parámetro evaluado en referencia a todos los catadores, con los siguientes resultados mostrados en los gráficos radiales correspondientes.

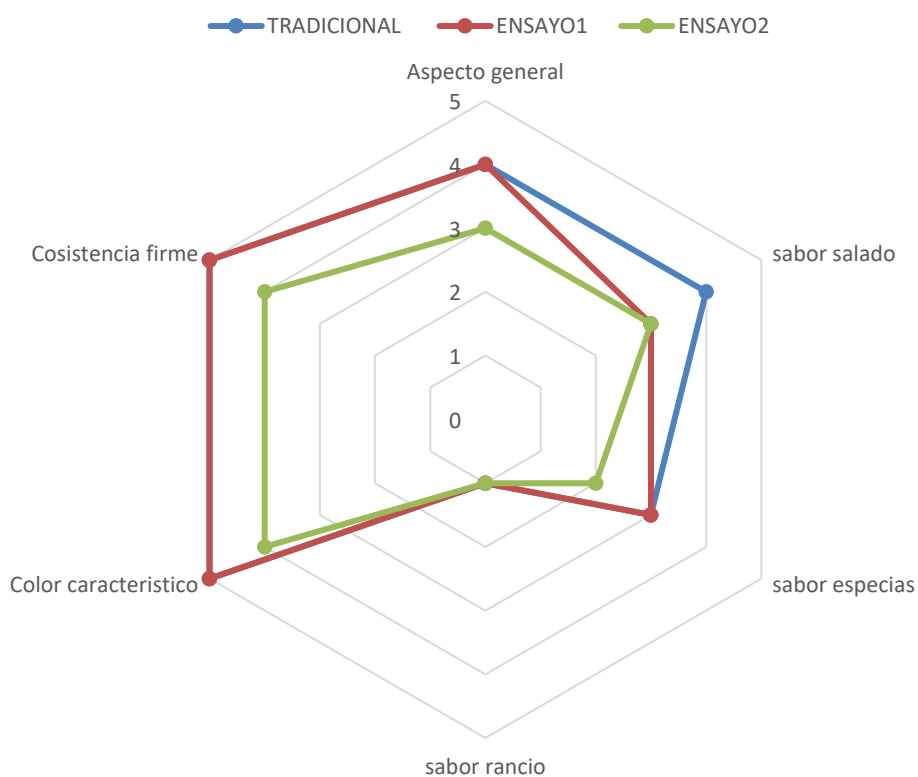


En el caso del lomo adobado, el ensayo 5 no ha sido evaluado a nivel organoléptico descriptivo por panel experto, al no haber superado la evaluación sensorial preliminar tal y como se ha señalado en la tarea 2.4

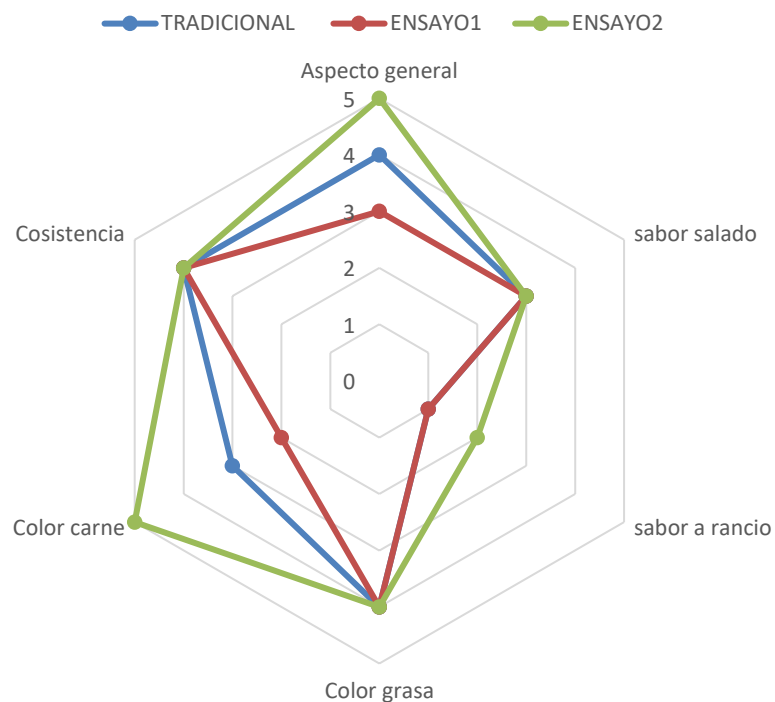
COSTILLA ADOBADA



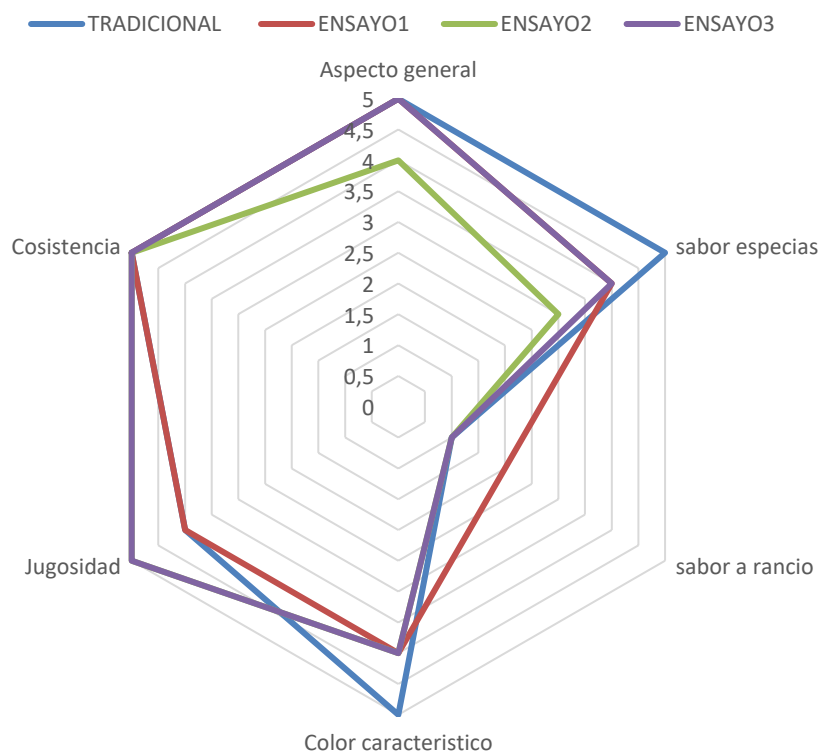
CHORIZO ASTURIANO

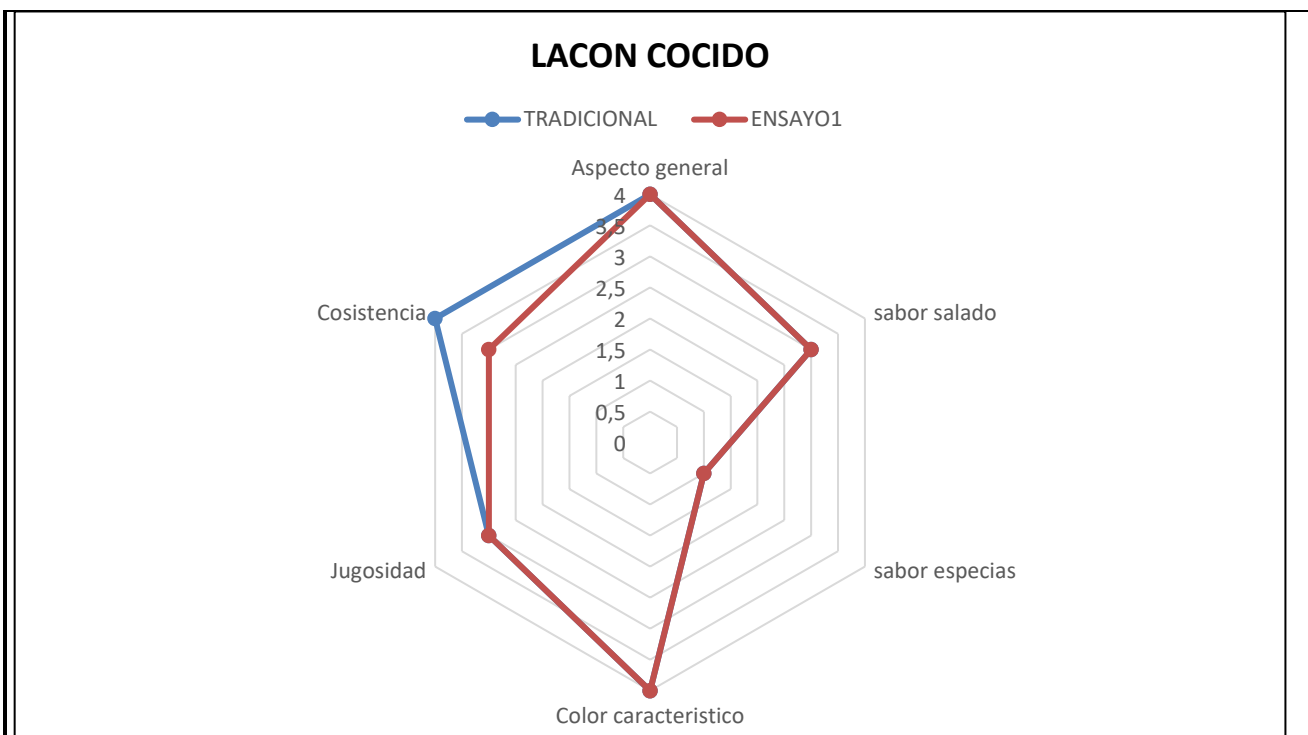


LAICON CURADO



CRIOLLO COCIDO





- Estudio colorimétrico instrumental

Uno de los atributos que con mayor frecuencia determina la aceptabilidad y en consecuencia la vida útil comercial de los derivados cárnicos son las características organolépticas evaluables a través de la vista, como es el color.

Las alteraciones del color en los derivados cárnicos se asocian a varios factores, destacando sobre todo la falta de formación del color por la acción del nitrito sobre la hemoglobina, el deterioro causado por la presencia de bacterias alterantes en el producto y la oxidación lipídica.

Con el fin de evaluar la evolución del color en las muestras con nueva formulación, frente a las muestras control o tradicional, se realizaron estudios colorimétricos a lo largo de la vida útil mediante un colorímetro KONICA-MINOLTA Modelo CM-2300d a lo largo de la vida útil.

Estudio colorimétrico realizado en lomo adobado:

Formulación tradicional:

Producto		Lomo adobado formulación tradicional		
Muestra	Tiempo	Color	Color	Color
		a	b	L
1264P	0	23,88	27,00	19,66
1265P	11	24,31	26,95	18,20
1266P	20	39,76	17,32	14,56
1267P	29	38,94	23,36	15,58
1268P	39	44,34	12,14	17,16
1269P	48	30,40	31,52	41,43
1270P	60	30,31	37,64	58,49

Formulación de ensayo 1:

Producto		Lomo adobado formulación ensayo		
Muestra	Tiempo	Color	Color	Color
		a	b	L
1271P	0	27,96	23,55	16,97
1272P	11	26,25	24,01	17,12
1273P	20	43,70	15,94	19,48
1274P	29	41,60	16,30	18,29
1275P	39	35,10	18,95	26,01
1276P	48	26,04	34,15	44,65
1277P	60	34,06	40,13	52,00

Formulación de ensayo 2:

Producto		Lomo adobado formulación ensayo E2		
Muestra	Tiempo	Color	Color	Color
		a	b	L
P230282	0	6,34	13,38	51,58
P230283	13	6,76	14,22	55,87
P230284	20	7,86	12,93	49,08
P230285	29	6,87	11,92	48,07
P230286	40	5,48	13,88	47,24
P230287	48	-	-	-
P230288	61	5,42	10,20	48,39

Formulación de ensayo 3:

Producto		Lomo adobado formulación ensayo 3		
Muestra	Tiempo	Color	Color	Color
		a	b	L
P230290	0	8,49	15,38	55,12
P230291	13	3,14	10,72	50,26
P230292	20	9,43	18,80	56,02
P230293	29	11,04	16,98	54,02
P230294	40	4,76	13,42	50,65
P230295	48	-	-	-
P230296	61	11,14	17,52	57,89

Formulación de ensayo 4:

Producto		Lomo adobado formulación ensayo E4		
Muestra	Tiempo	Color	Color	Color
		a	b	L
P230511	0	1,67	12,08	55,01
P230512	12	-	-	-
P230513	20	2,37	11,34	55,52
P230514	29	3,05	14,33	55,76
P230515	41	5,13	11,62	55,09
P230516	48	2,90	13,59	58,99

Formulación de ensayo 5:

Producto		Lomo adobado formulación ensayo E5		
Muestra	Tiempo	Color	Color	Color
		a	b	L
P230519	0	1,67	12,08	55,01
P230520	12	-	-	-
P230521	20	5,40	9,94	52,26
P230522	29	3,33	8,55	46,58
P230523	41	9,30	14,55	52,23
P230524	48	9,84	14,55	52,57

Estudio colorimétrico realizado en costilla adobada:

Formulación tradicional:

Producto		Costilla adobada Tradicional		
Muestra	Tiempo	L	a	b
230012P	0	42,26	14,17	13,03
230013P	13	34,76	30,11	24,39
230014P	20	44,52	32,6	36,06
230015P	29	35,61	30,4	22,32
230016P	40	35,01	25,04	18,12
230017P	47	32,7	19,07	12,12

Formula de ensayo 1:

Producto		Costilla adobada ensayo 1		
Muestra	Tiempo	L	a	b
230021P	0	35,8	6,58	6,15
230022P	13	35,08	28,74	28,94
230023P	20	45,88	30	32,05
230024P	29	40,83	28,9	26,38
230025P	40	39,13	29,12	26,14
230026P	47	36,46	30,15	27,84

Estudio colorimétrico realizado en chorizo asturiano:

Formulación tradicional:

Producto		Chorizo asturiano formulación tradicional		
Muestra	Tiempo	Color	Color	Color
		a	b	L
1206P	0	14,97	6,79	30,1
1207P	15	18,07	14,13	21,44
1208P	30	13,71	2,71	37,97
1209P	45	19,53	15,44	30,64
1210P	58	16,72	9,07	32,24
1211P	75	19,07	16,23	27,85
1212P	90	20,11	16,31	33,31

Formulación ensayo 1:

Producto		Chorizo asturiano formulación ensayo		
Muestra	Tiempo	Color	Color	Color
		a	b	L
1213P	0	11,15	9,19	28,75
1214P	15	16,7	10,64	30,93
1215P	30	18,48	3,08	32,37
1216P	45	24,11	12,84	31,4
1217P	58	28,65	25,54	24,8
1218P	75	13,81	16,63	32,16
1219P	90	21,47	16,68	33,42

Formulación ensayo 2:

Producto		Chorizo asturiano formulación ensayo 2		
Muestra	Tiempo	Color	Color	Color
		a	b	L
P230173	0	19,16	13,26	30,75
P230174	16	20,04	22,08	31,58
P230175	30	22,41	24,03	33,08
P230176	45	25,55	24,45	37,77
P230177	59	24,67	26,88	41,1
P230178	77	23,72	24,02	40,1
P230179	91	23,12	22,15	38,07

Estudio colorimétrico realizado en Lacón Curado

Formulación tradicional:

Producto		Lacón curado formulación tradicional		
Muestra	Tiempo	Color	Color	Color
		a	b	L
P230576	3	12,42	10,54	42,89
P230577	10	7,73	9,09	37,39
P230578	20	8,41	9,47	49,93
P230579	32	8,40	7,84	43,96
P230580	40	9,98	10,10	42,04
P230581	53	7,92	10,07	44,68
P230582	61	14,53	9,61	39,48
P230583	75	9,8	8,4	36,95
P230584	90	4,34	6,81	41,63

Formulación ensayo 1:

Producto		Lacón curado formulación ensayo E1		
Muestra	Tiempo	Color	Color	Color
		a	b	L
P230585	3	0,72	10,06	44,85
P230586	10	9,51	5,63	35,61
P230587	20	4,73	7,94	35,93
P230588	32	4,73	7,94	35,93
P230589	40	5,79	8,21	35,60
P230590	53	11,10	9,44	40,93
P230591	61	13,07	11,03	41,89
P230592	75	7,53	7,73	38,01
P230593	90	7,92	8,65	43,57

Formulación ensayo 2:

Producto		Lacón curado formulación ensayo E2		
Muestra	Tiempo	Color	Color	Color
		a	b	L
P230594	3	5,86	13,56	53,90
P230595	10	10,34	7,15	38,29
P230596	20	9,43	8,71	42,34
P230597	32	8,99	6,51	39,72
P230598	40	9,78	8,13	39,18
P230599	53	8,16	7,74	41,98
P230600	61	10,27	8,58	44,88
P230601	75	8,19	11,34	49,8
P230602	90	9,97	9,38	37,85

Estudio colorimétrico realizado en criollo cocido

Formulación tradicional:

Producto				
Muestra	Tiempo	Color	Color	Color
		a	b	L
P230335	0	7,00	13,18	57,51
P230336	16	7,67	14,54	59,29
P230337	30	7,33	18,74	63,33
P230338	44	6,71	15,16	68,98
P230339	62	6,13	14,30	65,33
P230340	77	8,91	13,36	62,38

Formulación Ensayo 2:

Producto		Chorizo criollo cocido formulación ensayo		
Muestra	Tiempo	Color	Color	Color
		a	b	L
P230327	0	7,64	15,57	65,40
P230328	16	10,26	13,27	62,09
P230329	30	9,34	16,55	64,24
P230330	44	7,04	16,72	67,46
P230331	62	6,84	15,70	65,89
P230332	77	8,06	15,16	68,04

Formulación Ensayo 3:

Producto		Chorizo criollo cocido formulación ensayo E3		
Muestra	Tiempo	Color	Color	Color
		a	b	L
P230319	0	8,16	13,49	59,67
P230320	16	6,66	14,45	67,37
P230321	30	6,68	14,15	64,00
P230322	44	7,53	15,42	64,30
P230323	62	9,22	19,53	62,11
P230324	77	8,33	15,89	68,58

Estudio colorimétrico en lacón cocido.

Formulación tradicional: tras el tratamiento térmico de conservación.

Producto		Lacón cocido formulación tradicional		
Muestra	Tiempo	L	a	b
0057P	0	-	-	-
0058P	0	55,09	11,77	10,42

Formulación de ensayo

Producto		Lacón cocido formulación ensayo		
Muestra	Tiempo	L	a	b
0065P	0	-	-	-
0066P	0	61,28	12,1	11,73

Indicadores de grado avance del proyecto:

Se ha realizado evaluación a nivel organoléptico por panel de cata experto en los ensayos seleccionados para cada una de las 6 referencias. Se han realizado estudios colorimétricos instrumentales a lo largo de la vida útil en lomo adobado, costilla adobada, chorizo asturiano, lacón curado y criollo cocido.

Entregable Hito 3:

- **Informe de resultados de ensayos de desafío, características sensoriales y vida útil de los ensayos experimentales.**

HITO 4: VALIDACIÓN DE RESULTADOS OBTENIDOS.

Tarea T4.1.- Validación escala preindustrial

El objetivo de esta tarea es la demostración y validación a nivel del proceso de elaboración, de las estrategias ensayadas y evaluadas con resultado satisfactorio en cuanto al proceso de nitrificación y estabilidad, en un entorno relevante a escala preindustrial, como es la planta piloto de ASINCAR Centro Tecnológico.

Para cada una de las referencias objeto de estudio en el proyecto y evaluadas en el hito 3, se ha elaborado la correspondiente formulación tradicional y al menos una formulación de las ensayadas, seleccionando aquella que más se ajusta a los niveles de nitrificantes establecidos.

Los modelos de proceso productivo seguidos se han tratado de ajustar a los procesos tradicionales en la industria cárnica asturiana, con el objeto de obtener una validación lo más cercana posible a la escala industrial.

Para el desarrollo de estos ensayos de validación se ha utilizado carne de porcino en todas las pruebas, suministrada por un matadero regional, en forma de cortes específicos o en forma de canales de cerdo. En este último caso, las canales fueron despiezadas para a continuación clasificar y, en su caso, almacenar los diferentes cortes obtenidos y ser empleados en los diferentes ensayos descritos a continuación:

Lomo Adobado:

En el caso del lomo adobado fresco la validación a escala preindustrial se ha realizado a través de la elaboración en la planta piloto de ASINCAR de ensayos correspondientes a las formulaciones tradicional y Ensayo 2.

- Tradicional: 150ppm de nitrito + ascorbato sódico.
- Ensayo 2: 120 ppm de nitrito sódico + ascorbato sódico + 2,5% de lactato sódico/acetato sódico.

El proceso productivo desarrollado se describe a en los siguientes pasos:

- Recepción de materia prima cárnica y acondicionamiento: eliminación del cordón del lomo y corte de los lomos por la mitad.
- Pesado de cada lote de lomo adobado. Debido al uso de equipos a escala industrial, como es el bombo de masaje, en el que es necesario emplear una cantidad o volumen mínimo de producto, se estableció la necesidad de trabajar con una cantidad mínima de entre 4 y 6 lomos por cada lote.
- Pesado de sal y aditivos según cada una de las dos formulaciones ensayadas, en función del peso de los lomos.
- Salado de las piezas de lomo en bombo de masaje marca MIMASA modelo LM100, durante 30 minutos. Velocidad 6 rpm.
- Envasado de las piezas en bolsas al vacío mediante campana de vacío y reposo 5 días en refrigeración entre 3 y 5°C
- Preparación y pesado de ingredientes para adobo.
- Adobado de los lomos en bombo de masaje marca MIMASA modelo LM100
- Envoltura en film plástico y reposo 48 en refrigeración entre 2 y 4°C
- Loncheado de piezas y envasado de muestras en bolsas al vacío.
- Conservación en cámara en refrigeración entre 2 y 4°C.

Se ha validado el proceso de elaboración del lomo adobado con reducción de nitrito ensayo 2, tanto a nivel tecnológico de proceso de elaboración como a nivel organoléptico a lo largo del periodo de conservación.

Costilla Adobada

La validación a escala preindustrial de la costilla adobada se ha realizado a través de la elaboración en la planta piloto de ASINCAR de los ensayos correspondientes a las formulaciones tradicional y Ensayo, diseñadas en el hito 2.

- Tradicional: 150ppm de nitrito + ascorbato sódico
- Ensayo 1: 80 ppm de nitrito sódico + ascorbato sódico + 3% de lactato sódico/acetato sódico.

El proceso productivo desarrollado para la costilla adobada y que ha sido validado a nivel tecnológico y sensorial, se describe a en los siguientes pasos:

- Recepción de materia prima cárnica y acondicionamiento de los paños de costilla en tiras. Cada paño de costilla se divide en dos tiras longitudinales
- Pesado de sal, aditivos e ingredientes del adobo según cada una de las dos formulaciones, en función del peso de cada lote de costilla a adobar.
- Adobar con todos los ingredientes en bombo de masaje marca MIMASA modelo LM100, durante 10 minutos a velocidad baja de 6 rpm. Para cada amasada fueron utilizadas 6 tiras
- Después del masaje, colocar en bandejas y dejar en reposo 3 - 4 días en refrigeración entre 2 y 4°C
- Ligero secado en horno Maurer-Atmos modelo Titan en calor seco a 50°C durante 45 minutos.

- Conservación en cámara en refrigeración inferior a 5°C envasadas al vacío en bolsa de material polimérico.

La validación del ensayo con reducción de nitrito en su formulación para el ensayo E1 ha sido satisfactoria en términos tecnológicos y sensoriales.

Chorizo Asturiano

La validación a escala preindustrial del chorizo asturiano se ha realizado a través de la elaboración en la planta piloto de ASINCAR de los ensayos correspondientes a las formulaciones Tradicional y Ensayo 1, diseñadas en el hito 2.

- Tradicional: 150ppm de nitrito + 150 ppm de nitrato + ascorbato sódico.
- Ensayo 1: 100 ppm de nitrito sódico + 120ppm de nitrato + ascorbato sódico.

En ambos casos se han utilizado cultivos iniciadores a base de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus spp*) no productoras de bacteriocinas en las cantidades adecuadas al volumen de masa de picadillo.

El proceso de elaboración del chorizo ha consistido en la elaboración del picadillo y posterior embutición, ahumado y secado, siguiendo los siguientes pasos:

- Acondicionamiento de la carne y la grasa de cerdo, eliminación de tejidos no aptos para el producto como es el tejido conjuntivo.
- Preparación y pesado de ingredientes y aditivos.
- Picado de la carne en picadora industrial Mainca modelo PC-114, en placa de 6 mm, en una sola pasada.
- Amasado en vacío en amasadora marca Cato modelo AV50 durante 4 minutos. Con el objeto de lograr un amasado y mezclado homogéneo de los ingredientes, en cada lote se emplearon entre 8 y 10 kg de masa de picadillo.
- Reposos de la masa 24h en cámara de maceración, $t^a=4^{\circ}\text{C}$.
- Embutido en embutidora en continuo con tolva y sistema de vacío, marca SIA modelo Junior, en tripa de cerdo calibre 34/36., atado y grapado de ristras de 6 ud.
- A continuación, se sometieron a un proceso de ahumado/estufaje durante 24 horas en horno Maurer Atmos modelo Titán. Por último, fueron secados en secadero artificial, durante 8 días en unas condiciones entre 10 y 15°C y humedad entre 80% y 60%.
- Una vez que hubieran alcanzado el grado de deshidratación deseado, se envasaron al vacío y se conservaron a temperatura ambiente hasta su valoración.

Se validó el proceso tecnológico de elaboración a través de la determinación del pH (<5.2) y la A_w (<0.92) al final del proceso de elaboración, como medida para garantizar la estabilidad del producto a lo largo de su vida útil. A nivel sensorial, el ensayo a escala piloto en esta tarea ha sido validado de forma satisfactoria.

Lacón Curado:

Se trata un producto crudo curado elaborado con la parte más distal de la extremidad anterior del cerdo., sin el hueso de la escápula y estructuras musculares asociadas. Tras los ensayos desarrollados en el hito 3, se tomó la decisión de realizar una prueba comparativa entre la formulación tradicional y el ensayo 1, con el objeto de la validación con materia prima fresca.

Los lotes elaborados fueron:

- Tradicional fresco: 150ppm de nitrito + 150 ppm de nitrato + ascorbato sódico.
- Ensayo 1 fresco : 120 ppm de nitrito sódico + 120ppm de nitrato + ascorbato sódico
- Ensayo 2 descongelado: 120 ppm de nitrito sódico + 120ppm de nitrato + ascorbato sódico

El proceso de elaboración seguido se describe a continuación:

- Acondicionamiento de los lacones en fresco, recorte e igualación en peso de las piezas.
- Pesado de los aditivos, junto con una cantidad de sal mínima.
- Salado de cada lote de lacones en bombo de masaje marca MIMASA, modelo LM100, durante 20 minutos sin vacío, velocidad 8 rpm.
- A continuación, se sacaron los lacones del bombo y se colocaron en bandejas cubiertos de sal, de forma que la totalidad de cada lacón quedó cubierta por una cantidad mínima de 2-3cm de sal.
- Reposo de las piezas cubiertas de sal, durante 3 días por cada kg de peso de lacón en fresco, para los lacones objeto del ensayo, con una media de 3,5kg/lacón, el tiempo de reposo en sal fue de 11 días. Este reposo se realizó en cámara de refrigeración a temperatura entre 3-5°C.
- Una vez finalizado el periodo de reposo en sal, los lacones se ducharon y permanecieron en inmersión en agua fría durante 3 horas, para desalado superficial.
- Tras el escurrido, fueron llevados a secadero en condiciones de 25°C y 50% de humedad, durante 5 a 7 días, para su estabilización.
- Previamente a su envasado fueron cortados en porciones transversales mediante sierra de cinta y envasadas en bolsas de vacío. Permaneciendo conservadas a temperatura de refrigeración durante el periodo de validación.

El resultado de la validación del ensayo 1, en comparación con el lote tradicional, no ha sido satisfactorio. Aunque a nivel tecnológico el producto demuestra estabilidad, a nivel sensorial la presencia de halo de color interno (al igual que se evidenció en los ensayos experimentales del hito 2) parece indicar que la reducción de los nitrificantes en el marco del proceso de elaboración implementado afectaría a sus propiedades sensoriales y puede generar el rechazo del consumidor

Criollo cocido.

El criollo cocido se trata de un producto cárnico embutido y tratado térmicamente mediante cocción. Se elabora a partir de carne y grasa de cerdo (papada, tocino, panceta, etc.) junto con los ingredientes y aditivos señalados en las formulaciones del hito 2.

A partir de las pruebas iniciales desarrolladas en la ejecución del hito 2, se ha realizado la validación industrial de los ensayos tradicional y ensayo 3, que ha superado de forma satisfactoria las evaluaciones del hito 3.

Estos dos lotes elaborados ha sido sometidos a validación en esta tarea:

- Tradicional: 150ppm nitrito + ascorbato
- Ensayo 2: 120ppm nitrito + ascorbato

En ambos casos, cada lote fue sometido a un tratamiento térmico post envasado de 70°C/35min.

En el caso del criollo cocido, el proceso de elaboración seguido se resume en los siguientes pasos:

- Acondicionamiento de la materia prima cárnica previa al picado.
- Pesado y premezclado de ingredientes y aditivos.
- Picado de la carne y grasa de cerdo en picadora industrial Mainca modelo PC-114, en placa de 6 mm, en una sola pasada.
- Amasado en vacío en amasadora marca Cato modelo AV50, durante 5 minutos. Con el objeto de lograr un amasado y mezclado homogéneo de los ingredientes, en cada lote se emplearon entre 8 y 10 kg de masa.
- Embutido en embutidora en continuo con tolva y sistema de vacío, marca SIA modelo Junior, en tripa de cerdo calibre 34/36.
- Cocción en horno Maurer Atmos modelo Titan, en condiciones de saturación de vapor a 80°C, hasta alcanzar 72 en el centro de la pieza.
- Enfriamiento rápido en cámara de refrigeración.
- Envasado en bolsa de vacío
- Tratamiento térmico post envasado durante 35minutos a 70°C en horno Maurer Atmos modelo Titan, en saturación de vapor. El objetivo de este tratamiento es alargar la vida útil del producto.

El procesado del criollo cocido a escala preindustrial desarrollado en esta tarea ha sido validado de forma satisfactoria. A nivel sensorial no se han detectado diferencias entre ambos lotes elaborados. A nivel tecnológico no se han encontrado alteraciones asociadas a la reducción de nitrito sódico en el ensayo formulado y elaborado.

Lacón Cocido.

A escala preindustrial se han elaborado dos lotes de producción de lacón cocido correspondientes a las siguientes formulaciones:

- Tradicional: 150ppm nitrito + ascorbato
- Ensayo: 100ppm nitrito + ascorbato

El proceso de elaboración seguido se resume en las siguientes etapas:

- Despiece y deshuese de los lacones de cerdo, a partir de paleta de cerdo.
- Pesado y premezclado de la sal y los aditivos necesarios formulados.
- Masaje de piezas cárnicas, ingredientes y aditivos en bombo de masaje marca MIMASA modelo LM100, a 12 rpm durante un mínimo de 6 horas en condiciones de vacío (800mbar)
- Colocación en molde de cocción
- Cocción en horno Maurer Atmos modelo Titan, en condiciones de saturación de vapor a 75°C, hasta alcanzar 68 en el centro de cada molde.
- Enfriamiento rápido en cámara de refrigeración
- Desmoldado, corte y envasado en bolsa de vacío
- Tratamiento térmico post envasado durante 35 minutos a 70°C en horno Maurer Atmos modelo Titan, en saturación de vapor. El objetivo de este tratamiento es alargar la vida útil del producto.

A nivel sensorial no se han detectado diferencias entre las dos pruebas elaboradas: formulación tradicional y formulación ensayo. A nivel tecnológico no se han encontrado alteraciones asociadas a la reducción de nitrito sódico en el ensayo.

Indicadores de grado avance del proyecto: se ha realizado validación a escala preindustrial en los siguientes derivados ensayados:

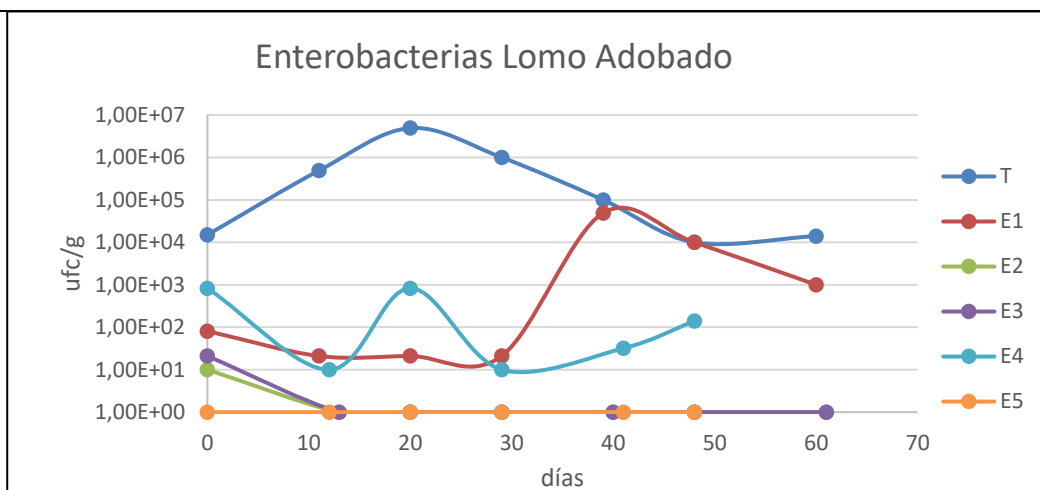
- Lomo adobado: formulación tradicional y ensayo 2.
- Costilla Adobada: formulación tradicional y ensayo 1.
- Chorizo asturiano: formulación tradicional, ensayos 1 y 2.
- Lacón Curado: formulación tradicional y ensayos 1.
- Criollo cocido: formulación tradicional y ensayo 3.
- Lacón Cocido: formulación tradicional y ensayo 1.

Tarea T4.2.- Análisis de resultados

A partir de los resultados obtenidos del desarrollo del hito 3 y de la validación a escala preindustrial propuesta en la tarea anterior, se procedió al análisis comparativo de los diferentes ensayos y a su interpretación, enfrentando los datos obtenidos de las muestras control tradicional y los ensayos formulados para cada derivado cárnico estudiado.

LOMO ADOBADO

A nivel del estudio de vida útil desarrollados en el hito 3; en cuanto al recuento de enterobacterias los resultados se representan en el siguiente gráfico:

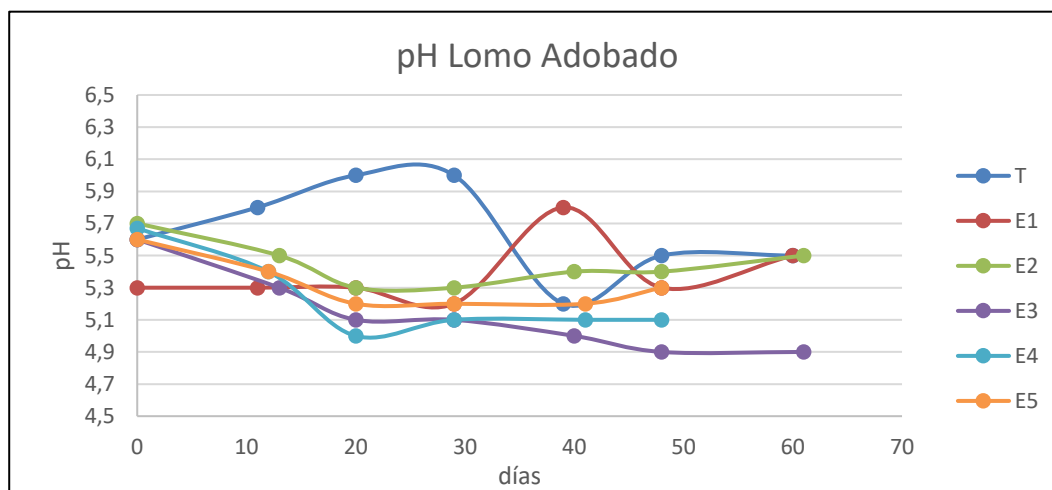


Todos los ensayos desarrollados mejoran los recuentos de enterobacterias con relación a la formulación tradicional. El análisis del recuento de enterobacterias indica que los ensayos 2, 3 y 5 inhiben el crecimiento de enterobacterias desde el inicio. De estos, los ensayos 3 y 5, en los que se emplean cultivos microbianos podrían ayudar a dar estabilidad microbiológica compitiendo frente a este grupo de alterantes.

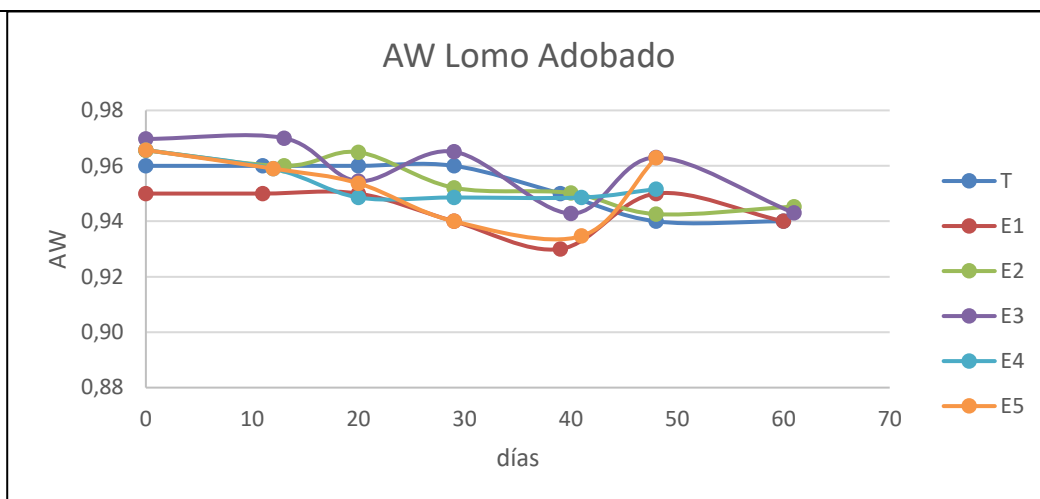
Los ensayos 1 y 4 muestran un efecto bacteriostático frente a este grupo de alterantes, aunque el E1 a los 39 días de conservación supera los límites establecidos para las enterobacterias.

Se evidencia un efecto sinérgico con el lactato/acetato en el recuento de enterobacterias como microorganismo indicador para el estudio de vida útil desarrollado.

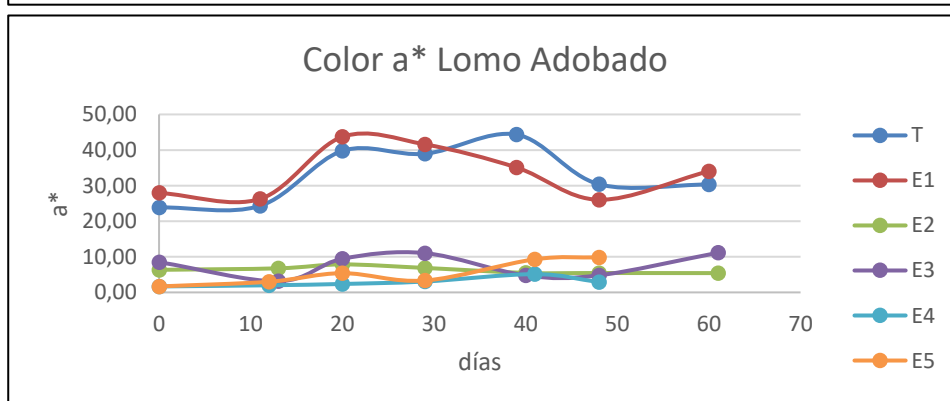
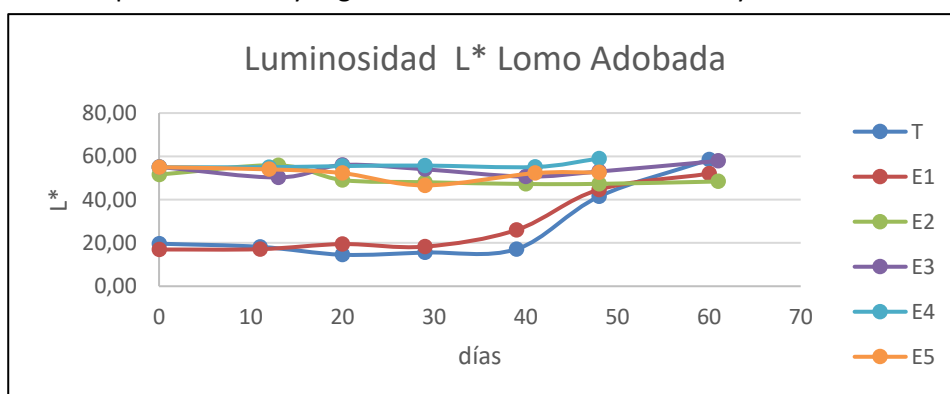
A nivel de pH, salvo la muestra tradicional todos los ensayos muestran una evolución similar, al menos hasta los 30 días del estudio, con una tendencia estable a lo largo de todo el periodo de estudio.



El estudio de a_w no permite establecer conclusiones en cuanto a su estabilidad microbiológica para ninguna de las muestras estudiadas. A tiempo inicial todas las muestras presentan un valor de a_w superior a 0,95, incluso las que contienen en su formulación lactato sódico, en las que serían esperables valores inferiores para este parámetro.

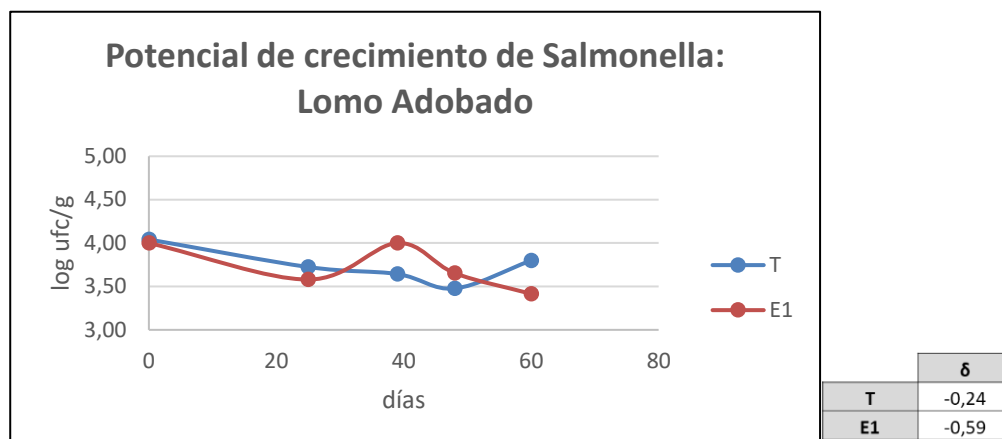


A nivel del estudio con colorímetro instrumental, los ensayos T y E1, muestran valores similares en comparación con el resto de los ensayos, a nivel de color rojo (a^*), presenta resultados significativamente mejores, lo que es compatible con mayor grado de nitrificación de la carne y estabilidad del color formado.



El estudio sensorial por panel de cata para el lomo adobado no establece diferencias significativas entre los lotes evaluados, aunque las formulaciones adicionadas con lactato/acetato presentan mayor intensidad en el sabor salado, respecto al resto de los ensayos, destacando en este sentido la muestra E1. La reducción de la cantidad de nitrito no condiciona el color del lomo, pero si la ausencia de nitrito en la formulación, tal y como se evidencia en el ensayo E5 de lomo adobado.

Las pruebas seleccionadas para el estudio de Challenge test con *Salmonella* entérica han sido la formulación tradicional y ensayo 1, ya que presentan los mejores resultados en cuanto al desarrollo del color a tiempo inicial. Los resultados obtenidos muestran que ambos procesos inhiben de forma muy ligera el crecimiento de *Salmonella* entérica.



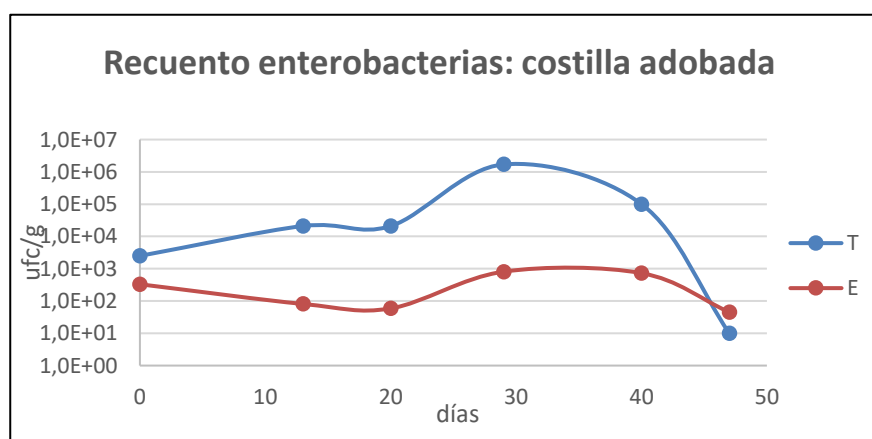
No se ha detectado residual de nitrito en las formulaciones ensayadas de lomo, mientras que el nivel de residual de nitrato es inferior a 70ppm, justificada por el contenido natural de nitrato en el pimentón, la sal, etc. y la falta de una etapa que favorezca la reducción de los mismo por acción de micrococos nitrato reductores.

En el desarrollo del proyecto NitraOut, se ha validado la estrategia del uso de ascorbato sódico con el objeto de evitar la presencia de cantidades residuales significativas de nitrito y constituyendo una herramienta para el control de la formación de nitrosaminas exógenas en productos cárnicos.

COSTILLA ADOBADA

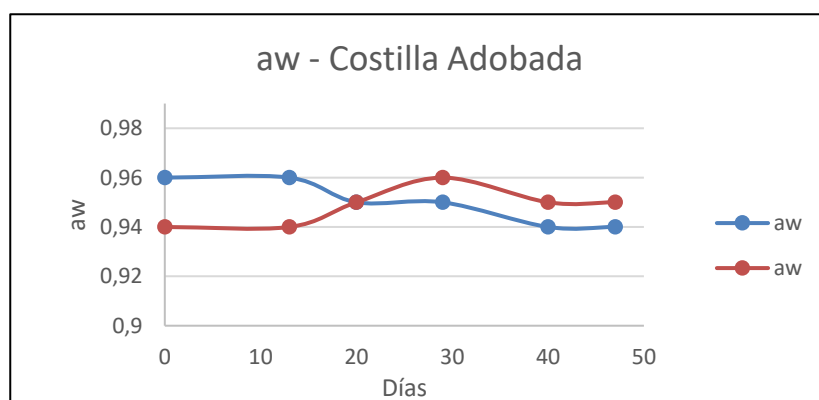
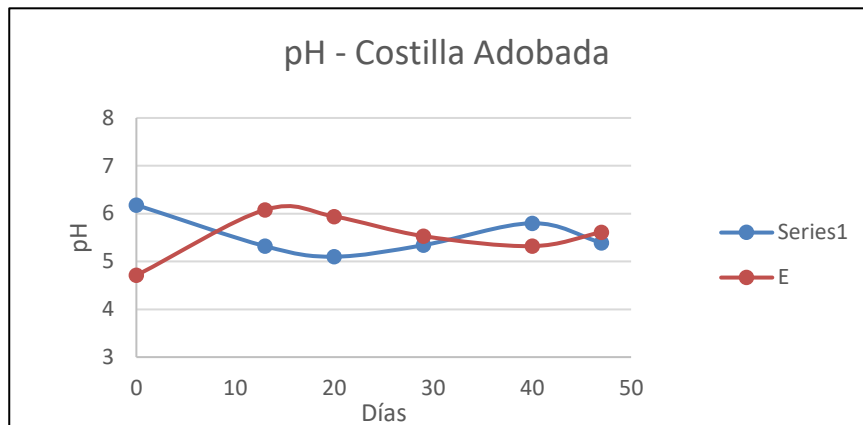
Las dos formulaciones de costilla adobada fueron evaluadas en el hito 3 con resultados satisfactorios para el ensayo 1.

A nivel de vida útil, en el siguiente cuadro se representan los resultados obtenidos en el recuento de enterobacterias:

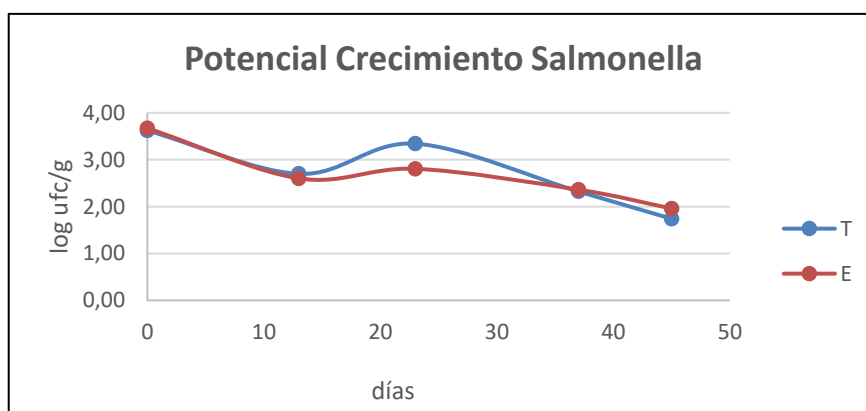


El ensayo 1 reformulado con lactato acetato, mejora de forma significativa los recuentos de enterobacterias, que se mantienen por debajo de los límites establecidos (10^4 ufc/g) hasta casi los 50 días de conservación en refrigeración.

La evolución del pH y aw se mantiene estable en el ensayo 1 frente a la formulación tradicional.

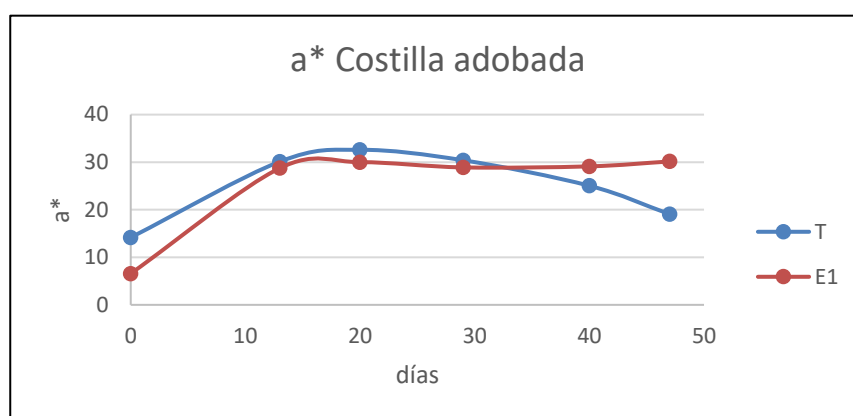
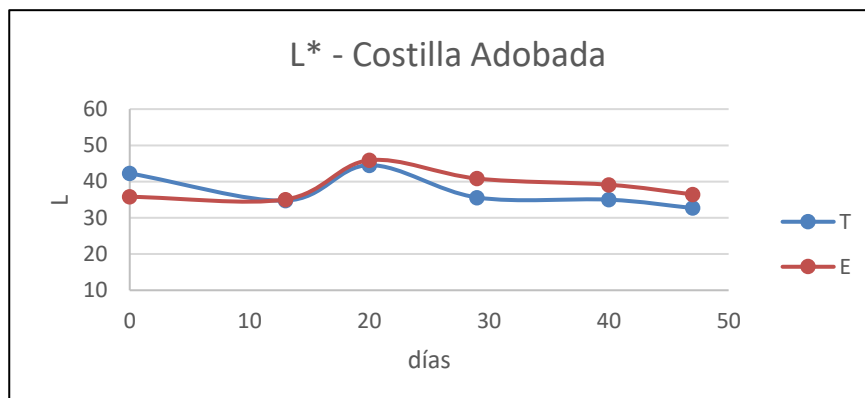


El estudio Challenge test en costilla adobada no muestra diferencias entre ambas formulaciones, ambas inhiben el crecimiento de *Salmonella* entérica a lo largo de la vida útil.



	δ
T	-1,88
E1	-1,71

La reducción de la dosis de nitrito a 80ppm en la formulación E1, no condiciona el color en el producto final, tal y como se refleja tanto en el estudio colorimétrico instrumental, como a nivel del estudio por panel de cata.

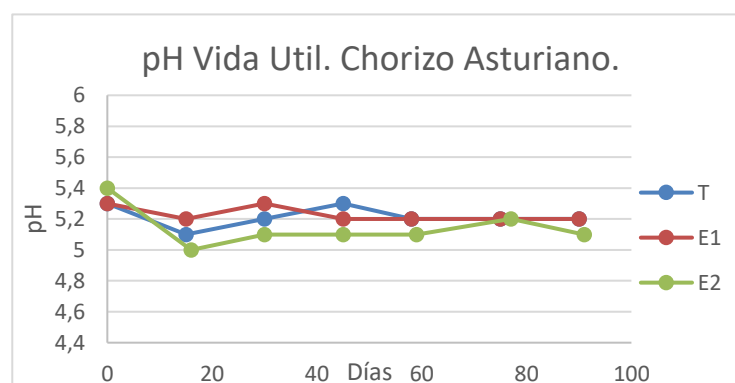
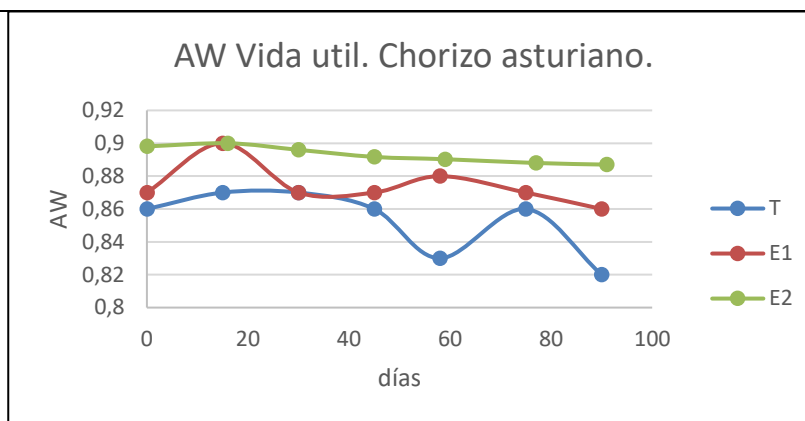


A nivel sensorial, el ensayo 1 muestra mayor percepción del sabor salado y menor del sabor a especias propias del adobo, lo que estaría justificado por el uso del complejo lactato acetato.

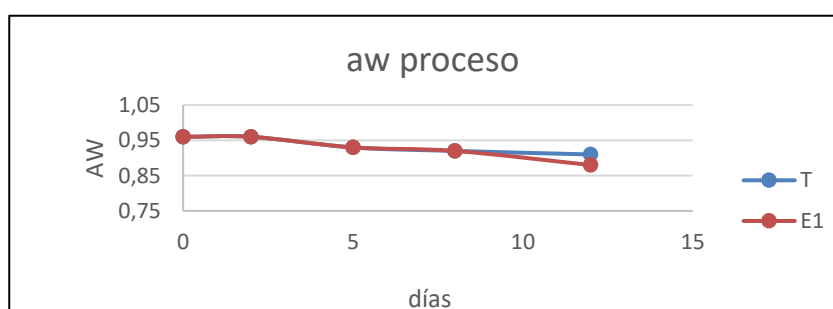
Al igual que el lomo adobado, no se ha detectado residual de nitrito en las formulaciones ensayadas, mientras que el nivel de residual de nitrato es bajo y justificado (sin que sea añadido) por el contenido natural de nitrato en el pimentón, la sal, etc. y la falta de una etapa que favorezca la reducción de los mismo por acción de micrococcos nitrato reductores.

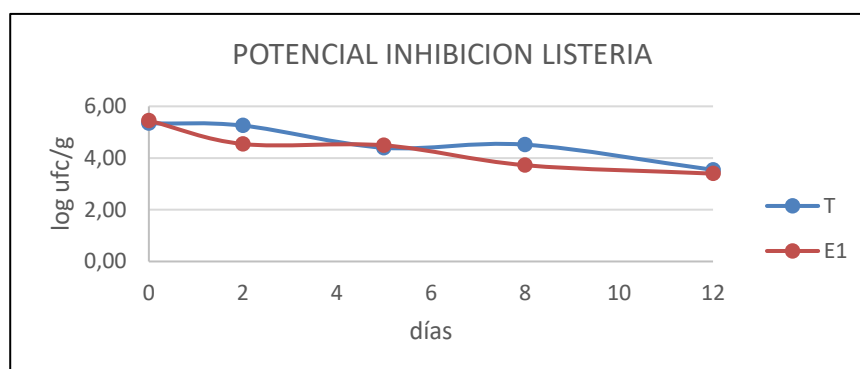
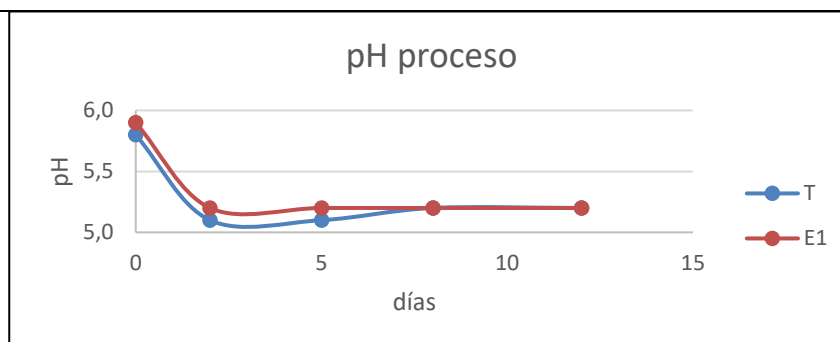
CHORIZO ASTURIANO

En el caso del chorizo asturiano se procedió a analizar los resultados obtenidos en el estudio de vida útil, a nivel de la formulación tradicional y ensayo 1. La formulación ensayo 2, no ha alcanzado los niveles de estabilidad físico químicos adecuados en cuanto a aw, para obtener conclusiones sobre las estrategias de reducción de nitrificantes empleadas.

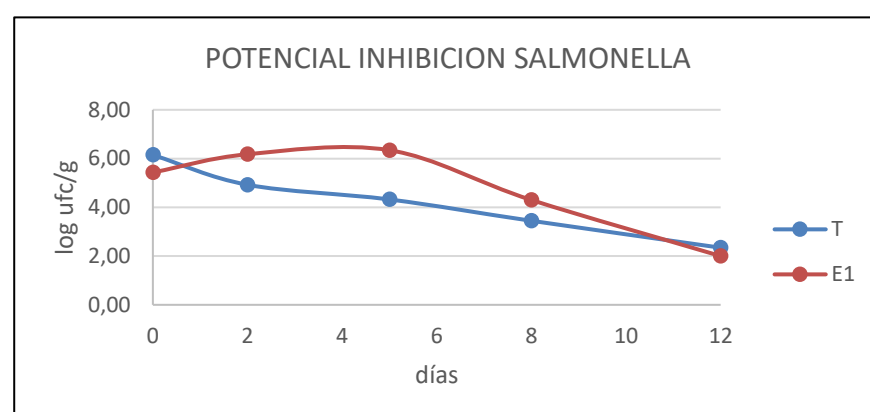


Así, para los ensayos T y E1 evaluados, la evolución de aw y pH, durante el proceso productivo es muy similar, favorecida por la incorporación en ambos ensayos de BAL homofermentativas que dirigen el proceso fermentativo. Los resultados de los ensayos tipo Challenge test durante el proceso de elaboración de ambos lotes, con *Listeria monocytogenes* y *Salmonella entérica*, en las muestras T y E1, indica que dichos procesos productivos inhiben el crecimiento de ambos patógenos.



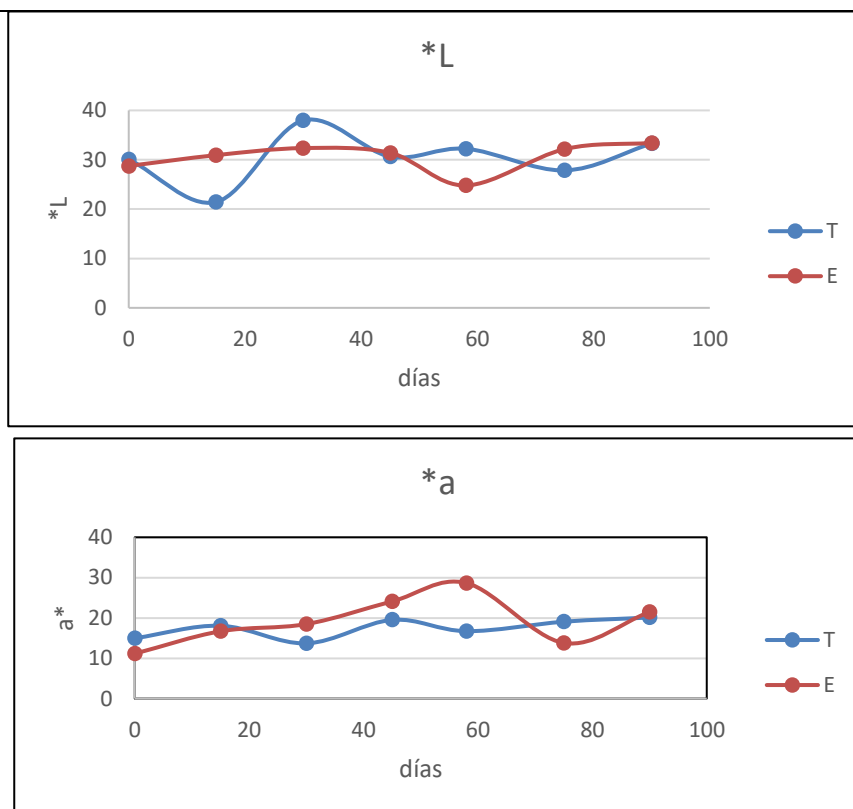


	δ
T	-1,8
E1	-2,05



	δ
T	-3,08
E1	-3,43

A nivel sensorial, no hay diferencias significativas entre los lotes objeto de estudio: Ty E1., a lo largo de la vida útil, ni a nivel de panel de cata, ni a nivel del estudio colorimétrico. El ensayo E2, a nivel sensorial si muestra diferencias significativas con T y E1, por lo que no supera esta evaluación en el hito 3.

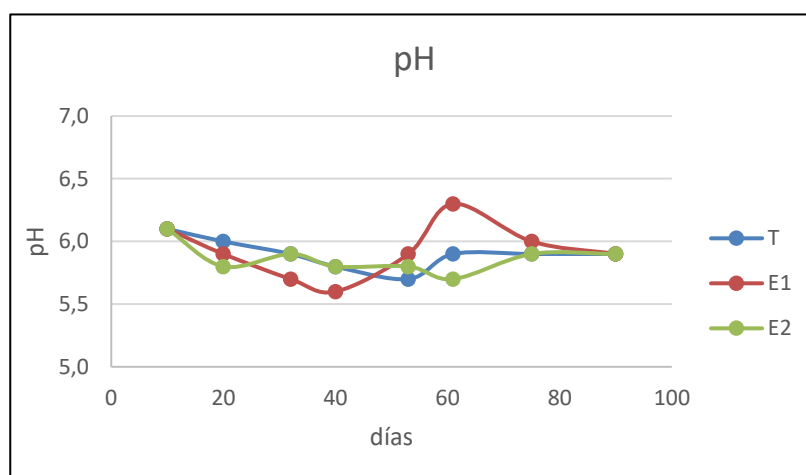
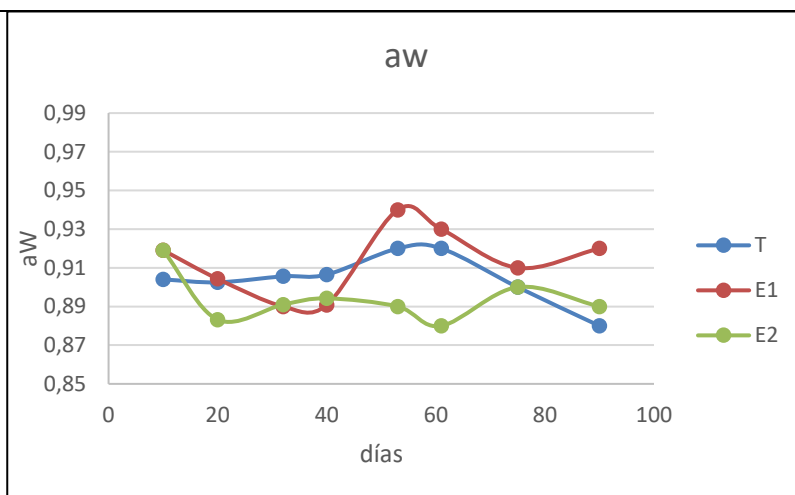


Por último, aunque no se detectan niveles residuales de nitrito, los tres ensayos (T, E1 y E2) presentan nitrato residual por encima de la cantidad máxima residual establecida. Como causas más probables cabe destacar la falta de actividad nitrato reductasa por micrococos reductores, ya que se ven inhibidos por el rápido descenso del pH durante el ahumado/fermentación, habitual en el chorizo asturiano. En este sentido, con el objeto de cumplir con los valores de referencia, es necesario la modificación de los procesos productivos con el objeto de favorecer la reducción del nitrato a nitrito, o bien, reducir la cantidad de nitrato adicionada en el amasado del picadillo.

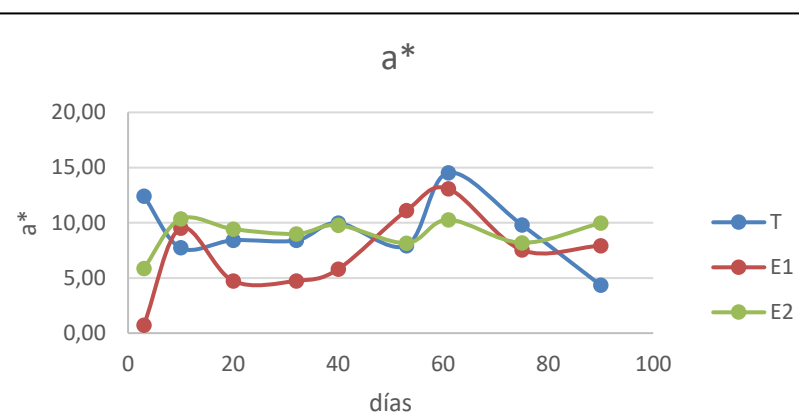
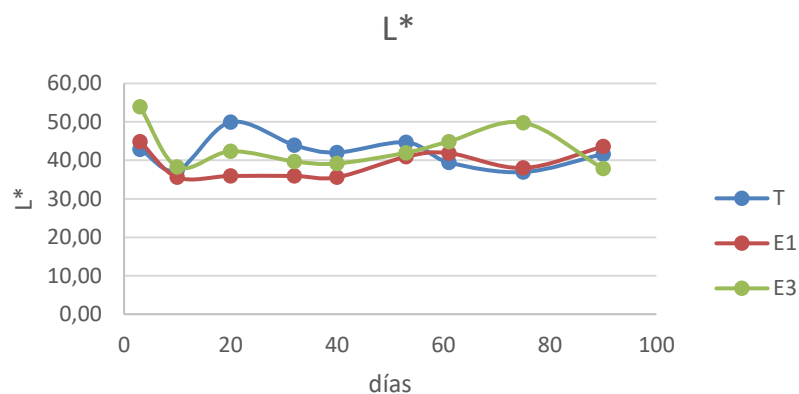
LACÓN CURADO

El análisis de los resultados obtenidos en los ensayos con lacón curado: pruebas T, E1 y E2, en el contexto de proceso productivo desarrollado en el proyecto, indica que la reducción de la dosificación de nitrificantes tendría un impacto significativo en las características sensoriales del producto final, salvo que la materia prima se someta a un proceso previo de congelación descongelación que favorezca la penetración de los aditivos hacia el interior de las piezas.

Los tres ensayos presentan estabilidad fisicoquímica a lo largo de su vida útil en refrigeración, a nivel de pH y a_w , de forma que no hay crecimiento de enterobacterias alterantes.



A nivel sensorial es donde se han encontrado mayores diferencias entre los diferentes ensayos, aunque los valores de luminosidad no evidencian las diferencias detectadas por el panel de cata, el valor rojo (a^*) del espacio de color CIELAB si muestra las diferencias sensoriales de color detectadas por los catadores en el ensayo E1 en comparación con los ensayos T y E2, sobre todo a tiempo inicial.



Así, a tiempo inicial, la muestra E1 presenta el valor más bajo para el rojo (a^*), seguida de la muestra E2 y del tradicional, que a tiempo cero presenta el mejor desarrollo del color. En cualquier caso, a lo largo de la vida útil el color de los productos tiende a igualarse y evolucionar de forma satisfactoria.

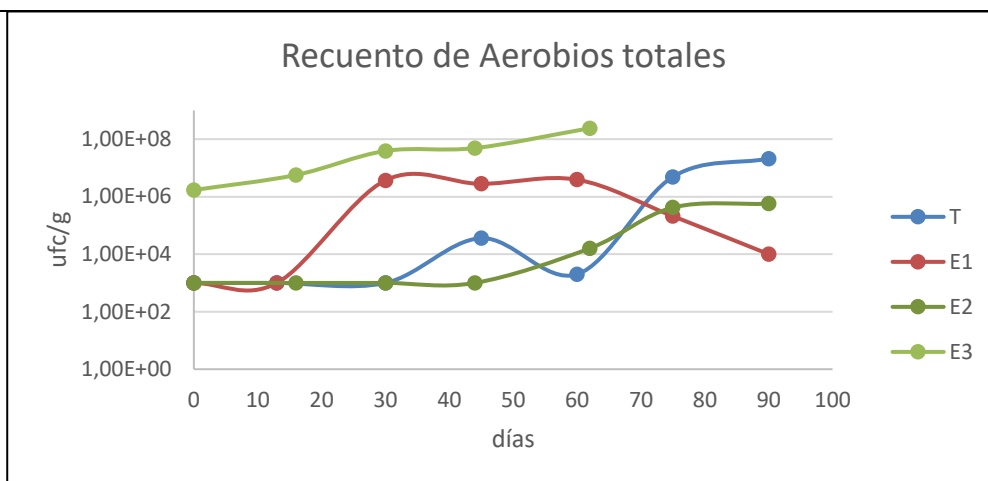
Por último, en cuanto a los residuales de nitrato y de nitrito en los ensayos con lacón curado, no se han detectado residuales de nitrito, y los residuales de ion nitrito determinados se encuentran por debajo de la cantidad máxima residual establecida como recomendada.

CRIOLLO COCIDO

El análisis del estudio de vida útil del criollo cocido, para los ensayos evaluados en el hito 3, indican que no hay crecimiento de enterobacterias, por lo que la vida útil se puede establecer desde el punto de vista organoléptico, llegando hasta los 90 días en el ensayo 2.

A nivel de recuento de aerobios totales, tal y como se observa en la gráfica, los ensayos tratados térmicamente presentan unos niveles muy bajos a tiempo inicial, aunque en el ensayo E1 el tratamiento aplicado es insuficiente para lograr una vida útil aceptable en términos comerciales, ya que antes de los 30 días el recuento de aerobios totales supera los límites establecidos.

El ensayo E3 presenta niveles muy elevados de aerobios, procedentes de la adición de un cultivo bioprotector de bacterias ácido lácticas.



A nivel del estudio sensorial, no se observan diferencias destacables en el espacio de color a^* , b^* y L^* , para los ensayos desarrollados. Este resultado esta en línea con los obtenidos en el análisis sensorial por el panel de cata experto.

Se han realizado ensayos de Challenge test para evaluar el potencial de inactivación de los tratamientos post-ensado aplicados al criollo cocido, el ensayo E2 con un tratamiento post-ensado de 70°C y 35 minutos, se alcanzó el mayor potencial de inactivación (3,8) para listeria y salmonella. Por el contrario, el tratamiento aplicado a los ensayos T y E1 es insuficiente para inactivar totalmente los patógenos inoculados.

A nivel de residuales de nitrato y nitrito, no hay detección de ion nitrito, y la presencia de nitratos en productos cocidos se justifica por la conversión natural de nitritos a nitratos durante el tratamiento térmico, si bien los niveles detectados en las muestras de criollo son elevados, por lo que podría proceder de una fuente oculta de nitrato en el criollo: sal, especias, etc.

LACON COCIDO

Los resultados obtenidos en los ensayos con lacón cocido desarrollados en el hito 3, han sido analizados de nivel microbiológico, físico químicos y sensorial.

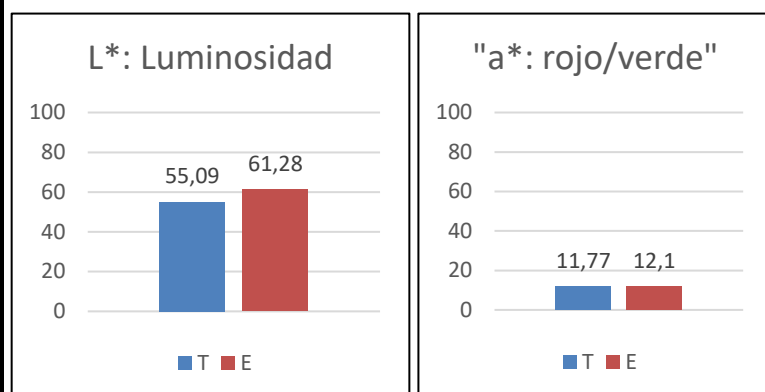
A nivel microbiológico, los tratamientos post envasados aplicados a ambos productos permiten alargar su vida útil por encima de los 75 días, si alteraciones sensoriales detectadas por el panel de cata. Además, se realizó validación de dicho tratamiento térmico mediante ensayos Challenge test de inactivación, mediante la inoculación de patógenos alimentarios.

Así, los estudios con Salmonella entérica han arrojados unos resultados de potencial de inactivación de 2,38 y de 2.43 para las formulaciones tradicional y ensayo 1 respectivamente. Mientras que los estudios tras la inoculación con Listeria monocytogenes han dado como resultado un potencial de inactivación de 3.09 y 2.95 de forma respectiva para la formula tradicional y para la formula ensayo 1.

Así, a la luz de los resultados obtenidos en los Challenge test analizados, se puede concluir que la aplicación de tratamientos térmicos post envasado, son mas eficaces en la inactivación de estos dos patógenos alimentarios y en la mejora de la vida útil, que el contenido en nitrito sódico dosificados en el producto.

Por otro lado, a nivel físico químico, los niveles residuales de nitrito analizados en el lacón cocido no superan las cantidades máximas residuales establecidas, pero debe optimizarse la formulación con el objeto de minimizar dicho residual ,por ejemplo, incrementando la proporción de agentes reductores como ascorbato sódico o eritorbato sódico.

Por último, desde un punto de vista sensoria, al igual que se ha señalado para el criollo, no se han detectado diferencias significativas en color a nivel instrumental ni a nivel sensorial por el panel de carta. En los siguientes cuadros se indican los valores obtenidos en el estudio del espacio CEILAB para L* y a*, comparando formula tradicional y ensayo 1.



La reducción de nitrito sódico en la formulación del ensayo 1, de 150ppm a 100ppm, no modifica el color del producto final de forma significativa, logrando un correcto grado de nitrificación y estabilidad del color desarrollado.

Indicadores de grado avance del proyecto:

Se ha realizado el análisis y seguimiento de los resultados de los análisis previstos en el hito 3 para la evaluación de los ensayos experimentales.

Tarea T4.3.- Protección de los resultados obtenidos

Con los resultados obtenidos a lo largo de la ejecución de este proyecto se han ido sacando conclusiones en relación con la reducción de nitrificantes en productos cárnicos tradicionales asturianos y la protección de los resultados obtenidos.

De los 6 productos evaluados, se plantea la patentabilidad de aquellos ensayos que han obtenido mejor valoración sensorial por panel experto y mejores resultados a nivel del estudio de vida útil y seguridad alimentaria.

La Ley de patentes establece los tres principales requisitos que debe reunir toda invención para poder ser objeto de patente: ser novedad; tener actividad inventiva; y debe tener aplicación industrial.

- Novedad: se considera que una invención es nueva cuando no está comprendida en el estado de la técnica.
- Actividad inventiva: no resulta del estado de la técnica de una manera evidente para un experto en la materia. La invención, a la luz del estado de la técnica existente y del progreso tecnológico normal, no resulta obvia para un experto en el sector, por lo que el invento tiene suficiente altura inventiva.
- Aplicación industrial: la invención objeto de solicitud de patente sea fabricable o utilizable en cualquier clase de industria.

Por otro lado, mientras una patente protege una invención absoluta, un modelo de utilidad protege aquellas invenciones que consisten en una mejora útil de algo ya existente.

La Ley de Patentes, en su artículo 137, especifica que serán protegibles como modelo de utilidad aquellas invenciones que “*consisten en dar a un objeto o producto una configuración, estructura o composición de la que resulte alguna ventaja prácticamente apreciable para su uso o fabricación*”. Por lo que se consideran protegibles como modelo de utilidad aquellas invenciones nuevas y con aplicación industrial siempre que no resulten del estado de la técnica de manera muy evidente para un experto en la materia.

En el caso de este proyecto, tras el estudio y valoración de la normativa regulatoria vigente a nivel Estatal y Europeo, se considera que el sistema de protección más adecuado para el desarrollo citado es el modelo de utilidad. Como se ha detallado en los objetivos del proyecto, se ha desarrollado un producto cárnico a partir de carne descongelada de porcino sometida a un proceso determinado de salado y secado que da lugar a un producto cárnico crudo curado estable y seguro.

El proceso de elaboración del ensayo 2 del lacón curado, cumpliría los requisitos para su protección a través de la figura del modelo de utilidad:

- Se trata de un producto elaborado mediante un nuevo proceso que incluye la reducción de la dosificación en nitrificantes y resultado similar a nivel sensorial con relación al proceso de elaboración habitual. No se ha encontrado evidencia de procesos productivos y formulación similares en el mercado y en la bibliografía consultada.
- Los productos obtenidos no resultan del estado de la técnica de una manera muy evidente para un experto en la materia, con relación a la formulación de nitrificantes y sus propiedades sensoriales conseguidas.
- La invención es fabricable en cualquier industria cárnica dedicada a los productos crudo-curados.

Previamente a las conclusiones expuestas, se han buscado invenciones ya registradas que tengan alguna relación y que, en su caso, pudieran ser motivo de que esta invención careciese del requisito de novedad. Se han consultado la existencia de figuras de protección con similitudes a las que se pretende obtener.

Para la elaboración del presente informe y búsqueda de invenciones similares, se ha recurrido a las siguientes bases de datos abiertas al público:

www.oepm.es/es/Bases_de_Datos_Invenciones.html

- INVENES: invenciones en español.
- Espacenet: invenciones a nivel mundial.
- Patent Scope.

- GOOGLE PATENTS.
- Latipat-espacenet: invenciones América Latina.

Se han empleado como palabras clave diversos términos que figuran en la memoria y la clasificación internacional de patentes correspondiente a alimentos.

Basándonos en la clasificación internacional de patentes, conocida como CIP:

<http://pubcip.oepm.es/classifications/ipc/ipcpub/?notion=scheme&version=20210101&symbol=A22C0018000000&menulang=es&lang=es&viewmode=f&fipcp=no&showdeleted=yes&indexes=no&headings=yes¬es=yes&direction=o2n&initial=A&cwid=none&tree=no&searchmode=smart>

A.- NECESIDADES CORRIENTES DE LA VIDA.

A22 CARNICERIA; TRATAMIENTO DE LA CARNE; TRATAMIENTO DE LAS AVES DE CORRAL O DEL PESCADO

A22C TRATAMIENTO DE LA CARNE

A22C 18/00 Fábricas, manufacturas o similares para el tratamiento de la carne

Este informe de patentabilidad debe ser revisado y evaluado por una empresa especializada en la gestión de patentes para posteriormente y si así lo creen conveniente registrar la solicitud ante la Oficina Española de Patentes y Marcas.

2. HITOS ALCANZADOS. GRADO DE CUMPLIMIENTO

2.1 Indique los diferentes hitos alcanzados, relacionándolos con la planificación inicial del proyecto. Detalle los indicadores de seguimiento y entregables obtenidos en el periodo justificado.

2.2 Declare el % estimado de cumplimiento en cada uno de ellos.

HITO 1.

Tarea 1.1.

Grado de cumplimiento respecto a lo planificado : 100%

Grado de cumplimiento respecto al total del proyecto: 100%

Tarea 1.2.

Grado de cumplimiento respecto a lo planificado: 100%

Grado de cumplimiento respecto al total del proyecto: 100%

HITO 2.

Tarea 2.1

Grado de cumplimiento respecto a lo planificado: 100%

Grado de cumplimiento respecto al total del proyecto: 100%

Tarea 2.2

Grado de cumplimiento respecto a lo planificado en 2023: 100%

Grado de cumplimiento respecto al total del proyecto: 100%

Tarea 2.3.

Grado de cumplimiento respecto a lo planificado en 2023: 100%

Grado de cumplimiento respecto al total del proyecto: 100%

Tarea 2.4.

Grado de cumplimiento respecto a lo planificado en 2023: 100%

Grado de cumplimiento respecto al total del proyecto: 100%

HITO 3.

Tarea 3.1

Grado de cumplimiento respecto a lo planificado en 2023: 100%

Grado de cumplimiento respecto al total del proyecto: 100%

Tarea 3.2

Grado de cumplimiento respecto a lo planificado en 2023: 100%

Grado de cumplimiento respecto al total del proyecto: 100%

Tarea 3.3

Grado de cumplimiento respecto a lo planificado en 2023: 100%

Grado de cumplimiento respecto al total del proyecto: 100,0%

HITO 4.

Tarea 4.1

Grado de cumplimiento respecto a lo planificado en 2023: 100%

Grado de cumplimiento respecto al total del proyecto: 100%

Tarea 4.2

Grado de cumplimiento respecto a lo planificado en 2023: 100%

Grado de cumplimiento respecto al total del proyecto: 100%

Tarea 4.3

Grado de cumplimiento respecto a lo planificado en 2023: 100%

Grado de cumplimiento respecto al total del proyecto: 100,0%

3. RESULTADOS CONSEGUIDOS

Enumerar brevemente, pero con claridad y precisión, los resultados obtenidos, haciendo referencia expresa a los resultados inicialmente previstos.

HITO 1.

Tarea 1.1. :Se ha realizado la identificación y descripción de la actividad funcional de los nitrificantes en derivados cárnicos. Se ha realizado la caracterización de las etapas y parámetros de los 6 derivados cárnicos, a través del desarrollo de los diagramas de flujo.

Tarea 1.2.: Se ha realizado la identificación y caracterización de las principales estrategias tecnológicas alternativas al uso de nitrificantes en derivados de carne.

HITO 2.

Tarea 2.1.: Para cada derivado cárnico seleccionado se ha trabajado en el diseño de al menos 3 diferentes estrategias para hacer frente a la reducción de aditivos nitrificantes.

Tarea 2.2.: Se han diseñado sinergias entre las diferentes estrategias identificadas con el objeto de abordar la reducción de nitrificantes en los seis derivados cárnicos en estudio

Tarea 2.3.: Se han desarrollado pruebas experimentales de elaboración para los 6 derivados cárnicos en estudio (chorizo asturiano, criollo cocido, lomo adobado, costilla adobada, lacón curado y lacón cocido), implementando las estrategias definidas para cada uno de ellos en la tarea 2.1 y las sinergias identificadas en la tarea 2.2.

Tarea 2.4.: Se ha realizado la valoración organoléptica de cada prueba experimental desarrollada en la tarea 2.3.

HITO 3.

Tarea 3.1: Se han desarrollado ensayos de desafío con los patógenos listeria y/o salmonella en costilla adobada, lomo adobado, chorizo asturiano, criollo cocido y lacón cocido

Tarea 3.2: Se han realizado y finalizado estudios de vida útil en base a características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales en las pruebas experimentales en cada uno de los productos objeto de estudio del proyecto. Se ha finalizado un estudio de estabilidad oxidativa en chorizo asturiano, criollo cocido y lacón curado.

Tarea 3.3: Se ha realizado evaluación a nivel organoléptico por panel de cata experto en los ensayos seleccionados para cada una de las 6 referencias. Se han realizado estudios colorimétricos instrumentales a lo largo de la vida útil en lomo adobado, costilla adobada, chorizo asturiano, lacón curado y criollo cocido.

HITO 4.

Tarea 4.1: se ha realizado validación a escala preindustrial en los siguientes derivados ensayados:

- Lomo adobado: formulación tradicional y ensayo 2.
- Costilla Adobada: formulación tradicional y ensayo 1.
- Chorizo asturiano: formulación tradicional, ensayos 1 y 2.
- Lacón Curado: formulación tradicional y ensayos 1.
- Criollo cocido: formulación tradicional y ensayo 3.

- Lacón Cocido: formulación tradicional y ensayo 1.

Tarea 4.2: Se ha realizado el análisis y seguimiento de los resultados de los análisis previstos en el hito 3 para la evaluación de los ensayos experimentales y seguimiento de los resultados de las pruebas de validación a escala preindustrial.

Tarea 4.3: A medida que se han ido obteniendo resultados y conclusiones satisfactorias en cuanto a las estrategias desarrolladas, se ha estudiado la protección de los resultados para su posterior transferencia, así para el desarrollo susceptibles de ser protegidos se realizó el correspondiente estudio de patentabilidad.

4. RESULTADOS PREVISTOS NO CONSEGUIDOS

Indique y explique las causas.

En el desarrollo del proyecto se realizaron varias pruebas en torno al microorganismo *Clostridium spp.* detectándose dificultades en su manejo. Derivado de que se trata de un microorganismo anaerobio estricto y con capacidad de esporular, en los primeros ensayos se comprobó por estas características fisiológicas que no era posible tener recuentos microbianos que siguieran la dinámica habitual. Por ello se descartó el empleo de este microorganismo en los Challenge test debido a que no se podían obtener resultados cuantitativos robustos.