

AMINAS BIÓGENAS Y BACTERIAS EN SALCHICHÓN TIPO MILANO: EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Bacterial and Biogenic Amines in Milano Type Sausage: Storage Time Effect

Pedro Izquierdo, María Allara, Aiza García, Gabriel Torres, Evelin Rojas y María Ysabel Piñero

*Unidad de Investigación Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia.
Maracaibo, Venezuela. E-mail: izquier@cantv.net; allara2004@hotmail.com*

RESUMEN

La presencia de aminoácidos libres, bacterias descarboxilantes, temperatura y tiempo de almacenamiento son factores que favorecen la formación de aminas biógenas. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la presencia de aminas biógenas y bacterias en salchichones tipo milano. Se utilizaron 9 salchichones enteros de tres marcas comerciales (tres unidades por marca), con fecha de vencimiento de dos meses. Las muestras se analizaron 60, 30 y 0 días antes del vencimiento. Se determinaron aminas biógenas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), recuento de bacterias ácido lácticas (BAL), enterococos (ENTC) y enterobacterias (ENTB) según ICMSF. En la marca 1 se observó una disminución significativa ($P < 0,05$) del número de BAL entre los muestreos, la marca 2 se mantuvo constante, mientras que la marca 3 aumentó significativamente ($P < 0,05$) entre el primer y segundo muestreo, para mantenerse constante hasta el vencimiento. No hubo diferencias significativas en los ENTC de las marcas 1 y 3, mientras que en la marca 2 se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre la primera fecha y las dos últimas, en las que se incrementó el número de UFC. Los factores marca, tiempo de almacenamiento e interacción de ambos tuvieron un efecto significativo ($P < 0,05$) sobre el contenido de aminas biógenas, ENTC y BAL. Durante el almacenamiento BAL predominó sobre ENTC. No se encontraron ENTB. Se detectó la presencia de tiramina, histamina, cadaverina y putrescina; las concentraciones de tiramina e histamina encontradas podrían producir intoxicación alimentaria en individuos susceptibles.

Palabras clave: Aminas biógenas, salchichón, bacterias productoras de aminas biógenas.

ABSTRACT

Free aminoacids presence, decarboxilating bacteria, temperature and storage time may induce biogenic amine formation. The objective of this research was to determine storage time effect on biogenic amine and bacteria presence in milano type sausage. Nine (9) complete sausages of three brands (3 units per brand) were used, two months from expiration date. Samples were analyzed 60, 30 and 0 days before expiration. Biogenic amines were determined by means of liquid chromatography (HPLC), lactic acid bacteria (LAB), enterococci (ENTC) and enterobacteria (ENTB) according to ICMSF. In brand 1 a significant diminishment ($P < 0.05$) in LAB number, brand 2 remain stable, meanwhile brand 3 raised significantly ($P < 0.05$) between first and second sampling, and kept this values until expiration date. There were no significant differences in ENTC of brands 1 and 3, but in brand 2, the number raised, and significant differences ($P < 0.05$) between first and later dates were found. Brand and storage time and interaction between them had a significant effect ($P < 0.05$) on biogenic amine content, ENTC and LAB. LAB was higher than ENTC during storage. ENTB were not found. Tiramine, histamine, cadaverin and putrescine were detected; tiramine and histamine concentrations could produce a food poisoning in susceptible individuals.

Key words: Biogenic amines, sausage, biogenic amine producing bacteria.

INTRODUCCIÓN

El consumo de alimentos que contienen elevadas concentraciones de monoaminas con propiedades vasoactivas y/o sicoactivas: histamina, tiramina, feniletilamina y triptamina, representa un riesgo de intoxicación alimentaria, especialmente en conjunción con factores adicionales, tales como el uso de drogas inhibitoras de monoamino oxidasa (IMAO), consumo

de alcohol, enfermedades gastrointestinales o pacientes que presentan deficiencias genéticas en el mecanismo de desintoxicación [2, 20, 25, 33]. Por otra parte, las aminas biógenas tales como tiramina, además de diaminas y poliaminas, han sido descritas como precursoras de nitrosaminas carcinogénicas en productos cárnicos que usualmente contienen nitrato y nitrito como aditivos [4].

Además de sus efectos toxicológicos, las aminas biógenas están relacionadas con la higiene de los alimentos, su presencia en elevadas concentraciones puede ser indicativa del uso de materias primas de baja calidad, de contaminación y condiciones inapropiadas durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos [3, 5, 18].

Se han detectado aminas biógenas en diferentes alimentos, especialmente en alimentos fermentados tales como queso, embutidos, sauerkraut y productos de soya [19]; en carne y productos cárnicos fermentados se ha reportado la presencia de tiramina, cadaverina, putrescina, espermina y espermidina, debido por una parte, a elevadas concentraciones de aminoácidos libres expuestos a degradación microbiana [3, 28]. Adicionalmente otros factores como condiciones anaeróbicas, sales de curado, carbohidratos, pH inferior a 5,8 y actividad del agua (a_w) elevada, favorecen el desarrollo de microorganismos productores de aminas biógenas [11].

Las reacciones microbianas y bioquímicas durante la fermentación del salchichón producen la acidificación, proteólisis y secado característico. Estos procesos son también responsables del sabor típico de tales productos fermentados. Sin embargo, la maduración del salchichón fermentado ofrece condiciones favorables para la producción de aminas biógenas, entre estas condiciones se encuentran el crecimiento de poblaciones microbianas que pueden tener actividad descarboxilasa, así como también la proteólisis, que incrementa la concentración de aminoácidos precursores disponibles para ser descarboxilados [6].

Las bacterias ácido lácticas (BAL) contaminantes son los microorganismos que principalmente se han relacionado con la producción de aminas biógenas en productos cárnicos fermentados [3, 20, 30]. La tiramina es la amina biógena más comúnmente relacionada con las BAL; tales como lactobacilos (*L. divergens*, *L. carnis*), carnobacterias (*Carnobacterium divergens*) y enterococos (*Enterococcus faecalis*), en estos productos cárnicos [18, 21, 28]. Por otra parte, putrescina y cadaverina han sido relacionadas con la actividad de la lisina y ornitina-decarboxilasa de *Enterobacteriaceas*, se ha sugerido que la producción de putrescina requiere la acción combinada de BAL y *Enterobacteriaceas*, debido a que su precursor, la ornitina, no es un aminoácido proteico, sino que debe ser sintetizado por las BAL a partir de otros aminoácidos [3].

Durante el proceso de fermentación y maduración del salchichón se producen cambios en los conteos de los diferen-

tes grupos microbianos presentes en el producto, de tal forma que se podrían producir variaciones de los microorganismos productores de aminas biógenas. A pesar que en diferentes países se ha estudiado la presencia de aminas biógenas en productos cárnicos fermentados, en Venezuela no existe información en los productos elaborados en el país, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la presencia de aminas biógenas y bacterias descarboxilantes de aminoácidos en tres marcas comerciales de salchichones tipo Milano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las muestras

Se recolectaron aleatoriamente 9 salchichones secos tipo Milano de tres marcas comerciales (1, 2 y 3) (tres salchichones por marca), los cuales fueron adquiridos en un mercado local (Maracaibo, estado Zulia, Venezuela). Los salchichones seleccionados de cada marca, con un peso aproximado de 1 Kg, pertenecían al mismo lote y tenían la misma fecha de vencimiento. Todos fueron adquiridos en una misma fecha y se trasladaron al laboratorio, donde se mantuvieron en condiciones de almacenamiento similares al lugar donde se adquirieron (refrigeración 7°C).

Los análisis microbiológicos y químicos se realizaron a los 60, 30 y 0 días de la fecha de vencimiento de los salchichones. En la fecha de análisis se fraccionó, en condiciones asépticas, un tercio de cada salchichón, para realizar los análisis microbiológicos y químicos. El salchichón restante se guardó en bolsas plásticas estériles con cierre hermético, con la finalidad de evitar su contaminación.

Análisis microbiológico

Se prepararon diluciones seriadas (10^2 - 10^6) siguiendo las metodologías recomendadas por la ICMSF [15]. A partir de estas diluciones se realizó por duplicado el recuento de bacterias ácido lácticas (BAL), enterococos (ENTC) y enterobacterias (ENTB). Para BAL se utilizó Agar MRS, sembrando por profundidad 1 mL de cada dilución, incubado a 37°C por 48 h. en condiciones microaerofílicas. Para ENTC se sembró 0,1 mL de cada dilución por extensión en Agar Kanamicina Esculina Azida, incubado a 37°C por 48 h, contándose las colonias de color negruzco. Para ENTB se sembró por profundidad 1 mL de cada dilución en Agar Violeta Rojo Bilis Dextrosa, incubado a 30°C por 24 h.

Análisis químico

Se pesaron 50 g de muestra para realizar los análisis químicos. La determinación de humedad se realizó a través del método de secado en horno 110°C/16 h según la AOAC [1] y la medición del pH siguiendo la metodología de Guerrero [13].

Determinación de las aminas

Para la extracción de las aminas, la formación de derivados fluorescentes y el análisis por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se utilizó la metodología propuesta por Eerola y colaboradores [9].

Condiciones del cromatógrafo

El cromatógrafo marca Shimadzu®, estuvo integrado por una válvula de inyección manual, una bomba modelo LC-6A, un detector de UV-VIS SPD-6A a 254 nm y una columna marca Merck® Lichrospher RP-18 (12,5 cm × 4,5 mm × 5 µm). Se utilizó un gradiente de elución con una mezcla de acetato de amonio 0,1 M (solvente A) y acetonitrilo (solvente B), comenzando con 50% y terminando con 90% de acetonitrilo en 19 minutos. El flujo de fase móvil fue de 1,0 mL/min y el volumen de inyección de 20 µL.

La identificación y cuantificación de las aminas se realizó por comparación con estándares marca Sigma®. Para el análisis de los datos se utilizó el software cromatográfico Class Vp marca Shimadzu®.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño factorial 3 × 3 con 3 repeticiones por tratamientos, y las unidades experimentales fueron asignadas a los tratamientos en forma aleatoria. Para el análisis de los datos se utilizó el programa SAS versión 6,1 [29].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bacterias ácido lácticas

La TABLA I muestra los valores promedio (Log UFC/g) del recuento de BAL en las muestras analizadas. En las marcas 1 y 3 se detectaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el primer muestreo (60 días antes de la fecha de vencimiento) y los muestreos siguientes (30 días antes de la fecha de vencimiento y en la fecha de vencimiento (cero días); en la marca 1 se observó una tendencia al descenso en este grupo microbiano asociado a la proximidad de la fecha de vencimiento que pudo deberse al agotamiento de la fuente principal de

energía de estos microorganismos [32, 33], mientras que en la marca 3 aumentó.

Las diferencias encontradas en los recuentos de BAL entre marcas, pueden ser atribuidas principalmente a variaciones en el patrón de fermentación y en la utilización de diferentes fuentes de carbono, así como también al tipo y carga de BAL presentes en la materia prima [20]. Adicionalmente, factores como el contenido de humedad, pH, condiciones de elaboración, tiempo de almacenamiento y el tipo de transporte pueden estar influenciando estos valores [16].

Parente y col. [22] reportaron que durante la maduración del salchichón fermentado elaborado con cultivos iniciadores, el número de BAL aumentó rápidamente, de 8 a 9 Log UFC/g y luego disminuyó ligeramente, mientras que los conteos iniciales de BAL en salchichón elaborado sin cultivos iniciadores fue bajo, 6 Log UFC/g, y aumentó a 8-9 Log UFC/g durante las primeras semanas de maduración.

Las BAL que fermentan los alimentos son consideradas generalmente como no toxigénicas ni patógenas, sin embargo, algunas especies pueden producir aminas biógenas; se han reportado algunas cepas de *Lactococcus* y *Leuconostoc* productoras de tiramina, y cepas de lactobacilos que pertenecen a las especies *L. buchneri*, *L. alimentarius*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. farciminis*, *L. bavaricus*, *L. reuteri* entre otras, han sido amino positivas, siendo tiramina la amina biógena cuantitativamente más importante [31].

Enterococos

En las marcas 1 y 3 el conteo de ENTC no varió en forma significativa durante el período de tiempo estudiado, a diferencia de la marca 2 en la que se detectó un incremento significativo ($P < 0,05$) entre el primer muestreo (60 días antes de la fecha de vencimiento) y los muestreos siguientes (30 días antes de la fecha de vencimiento y en la fecha de vencimiento) (TABLA I).

Los ENTC son microorganismos contaminantes, que han sido asociados con la presencia de tiramina en productos cárnicos fermentados [5, 12, 26], en las carnes procesadas son generalmente indeseables debido a que causan deterioro [12]. La Tecnología para la producción de la mayor parte de

TABLA I
VALORES PROMEDIOS DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS Y ENTEROCOCOS EN SALCHICHONES TIPO MILANO /
MEAN VALUES OF LACTIC ACID BACTERIA AND ENTEROCOCCI IN MILANO TYPE SAUSAGES

Marca	60 días		30 días		0 días	
	BAL	ENTC	BAL	ENTC	BAL	ENTC
1	7,15 ^d	3,42 ^c	4,05 ^a	3,27 ^{bc}	4,34 ^a	3,38 ^c
2	6,94 ^d	3,61 ^c	7,07 ^d	4,86 ^d	7,15 ^d	5,06 ^d
3	5,09 ^b	2,24 ^{ab}	5,66 ^c	2,75 ^{abc}	5,84 ^c	2,03 ^a

Superíndices distintos indican diferencias significativas ($P < 0,05$). BAL: Bacterias ácido lácticas. ENTC: Enterococos. Cantidad de bacterias expresadas en: Log UFC/g.

los productos cárnicos fermentados es similar: después de un período de fermentación, las carnes procesadas son saladas o ahumadas. En estas condiciones, los ENTG que inicialmente contaminan las carnes crudas en el rango de 2-4 Log UFC/g, son resistentes a condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad, por lo que logran multiplicarse. En productos cárnicos fermentados como salami se ha encontrado conteos de 2-5 Log UFC/g [12], valores que se corresponden a los detectados en el presente estudio, los cuales se encontraron entre 2,03 y 5,06 Log UFC/g.

Enterobacterias

Los recuentos de ENTB en los muestreos para las tres marcas fueron < 1 Log UFC/g. Esto podría ser atribuido a que las BAL durante la maduración de los salchichones, crean un ambiente adverso para el crecimiento de dichas bacterias [11]; sin embargo, las ENTB han sido asociadas a la presencia de aminos tales como cadaverina y putrescina durante el período de maduración de productos cárnicos fermentados [5]. Estudios realizados por Roig y col. [26] reportan una disminución en el número de enterobacterias y *Pseudomonas* durante el proceso de producción de salchichón español madurado, estos microorganismos no estuvieron presentes al final del período de maduración del producto, resultados que coinciden con los encontrados en el presente estudio.

Por otro lado, Parente y col. [22] reportaron durante la maduración de salchichón fermentado, un descenso en los conteos de *Enterobacteriaceae* en el orden inferior de 3 Log UFC/g. En los salchichones elaborados con la adición de cultivos iniciadores, la disminución en el número de *Enterobacteriaceae* fue más evidente. Sin embargo, aunque estos microorganismos están usualmente presentes en bajo número en el producto final, un almacenamiento incorrecto de la materia prima, así como una fermentación no controlada, puede inducir la proliferación de enterobacterias, con la liberación de sus enzimas decarboxilasas en los primeros pasos de la producción del salchichón [31].

Porcentaje de humedad

La TABLA II muestra los resultados promedios del porcentaje de humedad de las tres marcas de salchichón en las tres fechas de muestreo. La marca 1 presentó un descenso

significativo ($P < 0,05$) entre los dos primeros tiempos de muestreo (60 y 30 días) con relación a la fecha de vencimiento (0 cero días). El menor contenido de humedad de la marca 1, se relaciona con los valores de pH observados (5,23-6,00), los cuales se aproximan al punto isoeléctrico de las proteínas fibrilares de la carne, por lo tanto, la capacidad del producto para retener humedad pudiera verse disminuida en relación con las otras dos marcas donde el pH fue mayor como lo han reportado otros estudios [10, 23, 24], sin embargo, el contenido de humedad en los salchichones de las tres marcas analizadas cumplen con lo establecido por la normativa venezolana vigente [8] y se encuentra en el rango de humedad reportado por otros investigadores en salchichones secos [3, 23].

pH

La TABLA II presenta los valores promedios de pH para los salchichones tipo Milano, como se puede observar estos oscilaron entre 5,23 a 6,36. No se observaron diferencias significativas entre marcas, ni en el tiempo de almacenamiento.

La regulación nacional sobre producción de salchichones no especifica un rango de pH para los salchichones que se expenden en Venezuela [8]. Según Price [23], los embutidos fermentados deberían presentar un valor de pH entre 5,2 y 4,6. Sin embargo, los valores observados se asemejan a los reportados por otros investigadores [3, 33] en embutidos fermentados similares a los salchichones tipo Milano. Estos valores de pH ligeramente elevados son atribuidos a la descomposición del ácido láctico, al agotamiento de los azúcares añadidos, al efecto amortiguador de las proteínas y a la presencia de aminos biógenas, las cuales son bases orgánicas producidas por microorganismos oportunistas para elevar el pH ácido que no le es favorable [33].

Según Parente y col. [22] los cambios en el pH durante la maduración dependen del tipo de salchichón y su origen. En productos artesanales, el pH no cambia significativamente durante la maduración, mientras que en productos de origen industrial en los que se utilizan cultivos iniciadores y azúcares, se observan descensos significativos del pH durante el principio de la maduración.

El pH es un parámetro importante para la descripción del crecimiento bacteriano y la producción de aminos biógenas en productos cárnicos fermentados. Es importante recordar que

TABLA II
VALORES PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD Y pH EN SALCHICHONES TIPO MILANO / MEAN VALUES OF MOISTURE AND pH IN MILANO TYPE SAUSAGES

Marca	60 días		30 días		0 días	
	Humedad	pH	Humedad	pH	Humedad	pH
1	23,70 ^b	5,23 ^{ad}	25,76 ^{bcd}	6,00 ^{ae}	19,33 ^a	5,58 ^{af}
2	30,56 ^e	5,57 ^{bd}	31,23 ^e	5,90 ^{be}	29,45 ^{ed}	6,15 ^{bf}
3	25,58 ^{bc}	5,76 ^{cd}	27,74 ^{cde}	6,36 ^{ce}	27,64 ^{cde}	6,20 ^{cf}

Superíndices distintos indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

cuanto más cercano esté el pH del producto al punto isoelectrico de las proteínas fibrilares de la carne (5-5,1) menor será la capacidad de retención de humedad de las proteínas [10, 23, 24] y que el porcentaje de humedad de los salchichones tiene influencia sobre el crecimiento y tipo de microorganismos que pueden desarrollarse en el mismo. Además, dependiendo si estos microorganismos son beneficiosos o no, pueden controlar el crecimiento de microorganismos indeseables o favorecer la producción de aminas biógenas.

Se ha reportado una correlación significativa entre pH y contenido de aminas, valores bajos de pH se han relacionado con el mayor contenido de aminas biógenas, basado en la hipótesis de que la producción de aminas biógenas podría ser un mecanismo de protección para los microorganismos contra las condiciones ambientales ácidas [22]. Esto se correlaciona con lo observado en el presente estudio, donde la marca 3, 30 días previos a la fecha de vencimiento, se detectó el pH más elevado, 6,36, y a su vez la mayor concentración de aminas biógenas totales (784,28 ppm), (FIG. 1). Esto podría ser indicativo de un incremento en el pH por efecto de la formación de aminas biógenas.

Variación del contenido total de aminas biógenas durante el almacenamiento

La FIG. 1 muestra la variación del contenido total de aminas biógenas (ppm) durante el almacenamiento. En la marca 3 se detectó la mayor concentración de aminas biógenas, con valores de 518,95 a los 60 días, que luego se incrementó a 784,28 a los 30 días y disminuyó ligeramente a 756,87 al vencimiento del producto. La marca 1, presentó un contenido de 266,94 a los 60 días de vencimiento del salchichón, que se incrementó a 371,47 a los 30 días y a 431,57 al vencimiento. Por su parte la marca 2, con un contenido de 197,39 a los 60 días, disminuyó a 165 a los 30 días y luego alcanzó 173,19 al vencimiento.

Si se considera el rango de 100-200 ppm como cantidad total permitida de aminas [28], sólo la marca 2 podría ser considerada como aceptable. El tipo de aminas biógenas detectadas en el salchichón tipo Milano fueron, de mayor a menor concentración: histamina > tiramina > putrescina > cadaverina (TABLA III). La secuencia cuantitativa de aminas biógenas en diferentes productos cárnicos fermentados elaborados en Europa es tiramina > histamina > triptamina > 2 feniletilamina [7].

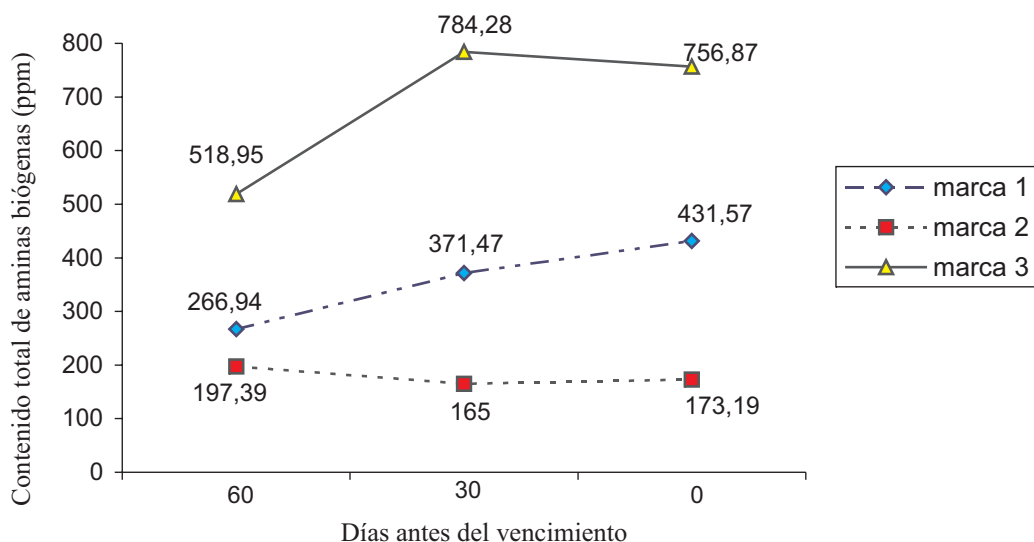


FIGURA 1. VARIACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE AMINAS BIÓGENAS DEL SALCHICHON TIPO MILANO DURANTE EL ALMACENAMIENTO / TOTAL BIOGENIC AMINE CONTENT VARIATION DURING STORAGE IN MILANO TIPE SAUSAGE.

**TABLA III
AMINAS BIÓGENAS (ppm) EN SALCHICHONES TIPO MILANO / BIOGENIC AMINES (PPM) IN MILANO TYPE SAUSAGES**

Marca	60 días				30 días				0 días			
	CA	PU	TY	HI	CA	PU	TY	HI	CA	PU	TY	HI
1	ND	114,32 ^a	152,62 ^{ab}	ND	ND	129,78 ^{ab}	241,69 ^{cd}	ND	ND	162,62 ^{ab}	268,95 ^d	ND
2	ND	ND	197,39 ^{abcd}	ND	ND	ND	165 ^{abc}	ND	ND	ND	173,19 ^{abc}	ND
3	85,96 ^b	105,93 ^a	125,20 ^a	201,80 ^a	81,39 ^b	183,40 ^b	231,77 ^{bcd}	287,72 ^b	94,63 ^b	158,92 ^{ab}	224,77 ^{bcd}	278,55 ^b

Superíndices distintos indican diferencias significativas (P < 0,05). CA: Cadaverina. PU: Putrescina. TY: Tiramina. HI: Histamina. ND: no detectada.

Según Parente y col. [22], en productos cárnicos fermentados la tiramina está presente en mayores concentraciones, constituyendo más de la mitad del contenido total de aminas biógenas de la mayoría de las muestras, putrescina y cadaverina también aumentan durante el almacenamiento, mientras que espermidina y espermina no aumentan significativamente durante la maduración, observándose en algunos casos un descenso en su concentración.

Según Bover y col. [4] las principales aminas biógenas encontradas comúnmente en salchichón son tiramina, en mayor proporción, seguida de las diaminas putrescina o cadaverina. La tiramina podría estar relacionada con la actividad tirosina descarboxilasa de BAL (lactobacilos y enterococos), cadaverina está asociada en mayor frecuencia con *Enterobacteriaceae*, mientras que putrescina parece ser el producto de ambos grupos microbianos.

Komprda y col. [17] reportaron un agudo incremento del contenido de aminas biógenas durante el almacenamiento a 22°C del salchichón seco fermentado "poličan" con cultivos iniciadores consistentes en *Lactobacillus casei*, *S. carnosus* y *P. pentosaceus*. Los autores relacionaron la masiva producción de aminas biógenas durante el almacenamiento con los microorganismos sobrevivientes o con la actividad residual de enzimas descarboxilasas producidas por microorganismos en el curso de la maduración.

Aminas biógenas en los salchichones madurados

La TABLA III muestra las aminas biógenas encontradas en los salchichones analizados:

Cadaverina. Se observan las concentraciones promedio de cadaverina en la marca 3 y en los tres tiempos de almacenamiento analizados. A pesar de que la cadaverina, junto a la putrescina y la tiramina, ha sido una de las aminas biógenas que con mayor frecuencia ha sido reportada en productos cárnicos fermentados [3, 5, 21, 27, 28, 30], sólo en la marca 3 pudo ser detectada, no encontrándose diferencias significativas entre las fechas de muestreo. Se observó un efecto significativo de la marca, así como una interacción significativa entre la marca y la fecha de muestreo sobre los contenidos promedios de cadaverina.

Al comparar estos valores con los obtenidos por Bover [4, 5], Shalaby [27] y Stratton [30], se observa que la concentración detectada es superior a lo reportado por estos autores. Esta amina podría estar relacionada con la presencia de enterobacterias que poseen enzimas descarboxilantes de lisina, debido a que estos microorganismos han sido reportados como los responsables de la producción de esta amina en productos cárnicos fermentados durante el período de maduración [3, 5].

Putrescina. En la marca 2 no se detectó putrescina, mientras que en la marca 1 el mayor contenido (162,62) se detectó a la fecha de vencimiento, y en la marca 3 el mayor con-

tenido de putrescina se detectó a los 30 días antes de la fecha de vencimiento con 183,40 ppm.

La concentración promedio de putrescina en las marcas de salchichones tipo Milano estudiadas superan los valores reportados por otros investigadores en embutidos secos fermentados [3, 5, 27, 30]. Los resultados obtenidos en el presente trabajo pertenecen al periodo de almacenamiento antes de la fecha de vencimiento. Resultados similares han conseguido otros autores [28], quienes han reportado valores de 150 ppm, atribuyéndolo al efecto residual de las enzimas descarboxilantes.

La putrescina podría ser un indicador de la presencia de ENTB y de BAL contaminantes, debido a que se ha reportado a las ENTB, en colaboración con BAL contaminantes, como responsables de la producción de putrescina en productos cárnicos fermentados [5]. Esta actividad conjunta en la producción de putrescina se debe a que la ornitina, precursor de la putrescina, no es un aminoácido proteico, sino que es formada por BAL a partir de otros compuesto [5, 28].

Se ha reportado que las únicas aminas presentes en concentraciones significativas en carne fresca utilizada para la producción de salchichón fermentado son espermina y espermidina y en menor extensión putrescina. Elevadas concentraciones de putrescina y la presencia de otras aminas han sido atribuidas al crecimiento microbiano y son dependientes de la frescura de la carne [5, 31].

Tiramina. La tiramina se detectó en las tres marcas de salchichón para las tres fechas de muestreo, siendo la amina encontrada en mayor concentración, como ha sido reportado por otros investigadores [3, 5] en embutidos fermentados.

Las marcas 1 y 3 mostraron diferencias significativas en la concentración de tiramina entre la primera fecha de muestreo y los 2 subsiguientes muestreos; esto podría deberse a que 30 días antes de la fecha de vencimiento de los salchichones, los microorganismos con actividad descarboxilante de tirosina o el efecto residual de las enzimas descarboxilantes de tirosina producidas durante la maduración, siguieron produciendo en forma significativa dicha amina. La marca 1 además, presentó el mayor contenido de tiramina de las tres marcas, siendo no significativa las diferencias entre las marcas. Por otra parte, para la marca 2 no se encontró diferencias significativas entre fechas de muestreo.

Los contenidos de tiramina encontrados en las tres marcas de salchichones tipo Milano exceden los valores promedio reportados por otros investigadores en embutidos fermentados [3, 5, 27, 30], sin embargo, se han reportado valores promedios de hasta 151 ppm [34]. Las concentraciones de tiramina de las tres marcas comerciales de salchichón tipo Milano estudiadas están dentro de los niveles máximos tolerables (100-800 ppm) reportados para alimentos en general [28].

En un estudio realizado en productos fermentados de origen español (Chorizo, Fuet, Sobrasada y Salchichón), la ti-

ramina fue detectada en concentraciones elevadas (excediendo 600 ppm), mientras en algunos casos, la putrescina se encontró en más de 450 ppm. La diamina cadaverina ha sido detectada en concentraciones relevantes en algunas muestras de chorizo y salchichón (más de 600 ppm), feniletilamina y triptamina fueron reportadas sólo en algunos productos en concentraciones superiores a 50 ppm [31].

Como ha sido reportado anteriormente en otros embutidos fermentados [5], la tiramina detectada en los salchichones tipo Milano podría estar asociada con la presencia de BAL contaminantes y enterococos con actividad descarboxilante de tirosina durante la maduración del producto y la acción residual de dichas enzimas durante el período de almacenamiento.

Según Coïson y col. [7] la concentración de tiramina e histamina aumenta durante la maduración del salchichón, relacionada con actividad microbiana, la presencia de tiramina ha sido correlacionada con recuento total de bacterias, y la producción de histamina ha sido relacionada con la presencia de *Enterococcaceae* y tiramina con *Enterobacteriaceae*.

Histamina. La histamina sólo fue detectada en la marca 3, lo que podría deberse a que la histamina, a diferencia de la tiramina, no es una amina comúnmente encontrada en elevadas concentraciones en productos cárnicos fermentados [30]. El promedio de histamina encontrado en la marca 3 supera los valores encontrados por otros investigadores en embutidos fermentados [3, 14, 27, 30], sin embargo, se ha reportado hasta 654 ppm [28]. Según Suzzi [31] la ausencia de la histamina en productos fermentados puede ser atribuida a condiciones desfavorables para el crecimiento de *Enterobacteriaceae*, que pueden acumular grandes cantidades de esta amina.

Desde el punto de vista de las buenas prácticas en la manufactura de alimentos en general, se ha establecido un nivel de tolerancia de histamina entre 50-100 ppm [28], lo que significa que los valores promedios de histamina detectados en la marca 3 superan el rango de tolerancia establecido para alimentos en general. La presencia de histamina en las muestras de salchichones en la marca 3, podría estar relacionada con la presencia de BAL contaminantes con enzimas que descarboxilan la histidina o al efecto residual de dichas enzimas durante el periodo de maduración y almacenamiento [28]. Un factor importante en la formación de histamina es un descenso del pH, además de una pobre calidad de la materia prima [17].

Se pudo también determinar que la marca, el tiempo de almacenamiento y la interacción marca-tiempo tuvieron un efecto significativo sobre la concentración de histamina en los salchichones tipo Milano.

Las diferencias en el tipo y la cantidad de aminas biógenas encontradas en las tres marcas de salchichones pudieran deberse a diversos factores como lo son, la variación en el tiempo de maduración, la variación y la diferencia en la activi-

dad de las descarboxilasas de la flora natural responsable de la fermentación, la biosíntesis y el metabolismo de las aminas, la proporción de carne agregada (así como su tipo y calidad) y la temperatura [5, 14, 21, 27, 34].

A pesar de que no existen concentraciones permitidas de aminas para salchichones secos, en general el nivel de tolerancia de aminas en un alimento se ha establecido en 40 ppm, sin embargo, se sabe que 8-40 mg de histamina pueden causar una intoxicación ligera, más de 40 mg una moderada y por encima de 100 mg una intoxicación severa. Mientras que 10-80 mg de tiramina pueden causar inflamación tóxica y por encima de 100 mg puede causar migraña [2, 20]. Desde el punto de vista de buenas prácticas de elaboración, niveles máximos de 50-100 ppm, 100-800 ppm y 30 ppm, para histamina, tiramina y β feniletilamina respectivamente, o en total entre 100-200 ppm de estas aminas biógenas son considerados como aceptables [28].

CONCLUSIONES

Considerando los parámetros microbiológicos estudiados, podemos concluir que el conteo de bacterias ácido lácticas en la marca 3 aumentó a medida que se acercó la fecha de vencimiento del salchichón. En la marca 1 disminuyó, mientras que en la marca 2 permaneció constante. El conteo de enterococos por efecto del tiempo de almacenamiento, sólo afectó a la marca 2 entre 60 y 30 días antes de la fecha de vencimiento.

En las marcas 1 y 3 se observó un incremento en el contenido total de aminas biógenas a medida que se acercó la fecha de vencimiento del salchichón, mientras que en la marca 2 se mantuvo constante.

Se detectaron las aminas biógenas cadaverina, putrescina, tiramina e histamina, en concentraciones que podrían representar un riesgo para la salud pública.

La interacción marca-tiempo de almacenamiento tiene un efecto significativo sobre el número de bacterias ácido lácticas, enterococos y la concentración de las aminas biógenas detectadas.

RECOMENDACIONES

Identificar las bacterias ácido lácticas, enterococos y enterobacterias presentes en salchichones secos, así como también determinar su capacidad para producir aminas biógenas.

Hacer un estudio de correlación entre la concentración de aminas biógenas en salchichones secos y el recuento de las bacterias productoras de dichas aminas.

Crear normas que regulen los contenidos de aminas biógenas en productos cárnicos madurados en Venezuela.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) por el financiamiento de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 15th Ed. Vol. 2. 1115-1176 pp. 1990.
- [2] AYHAN, K.; KOLSARICI, N.; ALSANCAK, G. The effects of starter cultures on the formation of Biogenic amines in Turkish soudjoucks. **Meat Sci**. 53(3): 183-188. 1999.
- [3] BOVER, S.; IZQUIERDO, M.; VIDAL, M. Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. **Meat Sci**. 57(2): 215-221. 2001.
- [4] BOVER, S.; IZQUIERDO, M.; VIDAL, M. Influence of Hygienic Quality of Raw Materials on Biogenic Amine Production during Ripening and Storage of Dry Fermented Sausages. **J. Food Prot**. 63(11): 1544-1550. 2000.
- [5] BOVER, S.; SCHOPPEN, S.; IZQUIERDO, M.; VIDAL, M. Relationship between biogenic amines contents and the size of dry fermented sausages. **Meat Sci**. 51(4): 305-311. 1999.
- [6] BOVER, S.; IZQUIERDO, M.; VIDAL, M. Mixed starter cultures to control biogenic amine production in dry fermented sausages. **J. Food Prot**. 63(11): 1556-1562. 2000. 1999.
- [7] COÍSON, J.; CERUTTI, C.; TRAVAGLIA, F.; ARLORIO, M. Production of biogenic amines in "Salamini italiani alla cacciatora PDO". **Meat Sci**. 67(2): 343-349. 2004.
- [8] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. (COVENIN). **Salchichón** Norma Venezolana 1410. 2000.
- [9] EEROLA, S.; HINKKANEN, R.; LINDFORS, E.; HIRVI, T. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. **J. AOAC Int**. 76(3): 575-578. 1993.
- [10] FENNEMA, O. **Introducción a la Ciencia de los Alimentos**. Editorial Reverté. España. 445 pp. 1985.
- [11] FRIEDRICH-KARL, L. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Sci**. 56(2): 105-115. 2000.
- [12] GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**. 26(2): 163-171. 2002.
- [13] GUERRERO, I. **Tecnología de carnes: Elaboración y preparación de productos cárnicos**. Editorial Trillas. México. 18-19 pp. 1990.
- [14] HERNÁNDEZ, J.; IZQUIERDO, M.; VECIANA, N.; MARINÉ, F.; VIDAL. Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. **J. Agric. Food Chem**. 45(6): 2098-2102. 1997.
- [15] INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS (ICMSF). **Microbiología de los Alimentos**. Vol I. 2^a Ed. Editorial Acribia. Zaragoza España. 431 pp. 1996.
- [16] JAY, J. **Microbiología moderna de los alimentos**. Editorial Acribia, S.A. España. 491 pp. 1992.
- [17] KOMPRDA, T.; NEZNALOVÁ, J.; STANDARA, S.; BOVER, S. Effect of starter culture and storage temperature on the content of biogenic amines in dry fermented sausage poličan. **Meat Sci**. 59(3): 267-276. 2001.
- [18] KOMPRDA, T.; SMĚLA, D.; PECHOVÁ, P.; KALHOTKA, L.; ŠTENCL, J.; KLEJDUS, B. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. **Meat Sci**. 67(4): 607-616. 2004.
- [19] MAIJALA, R. Histamine and Tyramine production by Lactobacillus strain subjected to external pH decrease. **J. Food Prot**. 57(3): 259-262. 1994.
- [20] MAIJALA, R.; EEROLA, S. Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. **Meat Sci**. 35(13): 387-395. 1993
- [21] MASSON, F.; JOHANSSON, G.; MONTEL, M. Tyramine Production by a strain of Carnobacterium divergens inoculated in meat-fat mixture. **Meat Sci**. 52(1): 65-69. 1999.
- [22] PARENTE, E.; MARTUSCELLI, M.; GARDINI, F.; GRIECO, S.; CRUDELE, M.; SUZZI, G. Evolution of microbial populations and biogenic amines in dry sausages produced in Southern Italy. **J. Applied Microbiol**. 90(6): 882-891. 2001.
- [23] PRICE, J.; SCHWEIGERT, B. **Ciencia de la carne y de los productos cárnicos**. Editorial Acribia, S.A. España. 296-300 pp. 1994.
- [24] REED, G. **Prescott and Dunn's industrial Microbiology**. The AVI Publishing Company. USA. 237-243 pp. 1983.
- [25] RICE, S.; EITTENMILLER, R.; KOEHLER, P. Biologically active amines in food: a review. **J. Milk Food Tech**. 39(5): 353-358. 1976.
- [26] ROIG, A.; HERNÁNDEZ, M.; LÓPEZ, E.; RODRÍGUEZ, J.; MORA, M. Microbiological events during the elaboration of "fuet", a Spanish ripened sausage. Relationships between the development of histidine- and tyrosine-decarboxylase containing bacteria and pH and water activity. **Europ. Food Res. and Technol**. 209(2): 108-112. 1999.

- [27] SHALABY, A. Significance of Biogenic amines to food safety and human health. **Food Res. Int.** 29(7): 675-690. 1996.
- [28] SHALABY, A. Survey on biogenic amines in Egyptian foods: sausage. **J. Sci. Food Agric.** 62(3): 291-293. 1993.
- [29] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **User's Guide.** Version 6,1: Cary, NC. 1985.
- [30] STRATTON, J.; HUTKINS, R.; TAYLOR, S. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. **J. Food Prot.** 54(6): 460-470. 1991.
- [31] SUZZI, G.; GIARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. **Int. J. Food Microbiol.** 88(1): 41-54. 2003.
- [32] TREVIÑO, E.; BEIL, D.; STEINHART, H. Determination of biogenic amines in mini-salami during long term storage. **Food Chem.** 58(4): 385-390. 1997.
- [33] TREVIÑO, E.; BEIL, D.; STEINHART, H. Formation of biogenic amines during the maturity process of raw meat products, for example of cervelat sausage. **Food Chem.** 60(4): 521-526. 1997.
- [34] VANDEKERCKHOVE, P. Amines in dry fermented sausage. A research note. **J. Food Sci.** 42(1): 283-285. 1977.