



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**Estudio de la cinética de bacterias halófilas presentes en  
la maduración de *Engraulis anchoita* involucradas en la  
transformación de histidina/histamina**

---

**Tesis doctoral**

**SILVINA PEREZ**

**Presentada ante la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata  
para acceder al grado académico de**

**DOCTOR EN INGENIERIA**

**Dirección de Tesis**

Co Director: Dra. Silvia Elena Murialdo

Director: Dra. Noemi Elisabet Zaritzky

**Jurados**

Dr. Roque Hours

Dr. Sergio Vaudagna

Dra. Silvia Peressutti

**La Plata, 26 de marzo de 2018**

El presente trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata fue realizado en el Grupo de Preservación y Calidad de Alimentos (Facultad de Ingeniería, UNMdP), en el Grupo de Ingeniería Bioquímica (Facultad de Ingeniería, UNMdP) y en el Departamento de Ingeniería Química (Facultad de Ingeniería, UNLP) bajo la dirección de la Dra. Ing. Noemí E. Zaritzky y la codirección de la Dra. Silvia E. Murialdo.

*A Gus y Oli, mi razón de ser.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Noemí E. Zaritzky, directora de esta tesis, por aclararme ideas, por confiar en mí a la distancia y por su apoyo y colaboración.

A la Dra. Silvia E. Murialdo, codirectora de tesis, por guiarme, por sus ideas, por estar siempre presente y por su apoyo y calidez.

A la Ing. María Isabel Yeannes, directora de beca, quién confió en mí y gracias a quién me introduje en el camino de la investigación, por su cariño y comprensión, y porque continúa brindándome su apoyo y sabiduría.

A la Universidad Nacional de La Plata por permitirme realizar el Doctorado en Ingeniería.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC-PBA) por haberme otorgado las Becas de Iniciación y Perfeccionamiento con las que comencé el doctorado y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado la Beca de Finalización de Doctorado.

Al Departamento de Ingeniería Química y en Alimentos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata donde se desarrolló esta tesis.

A Marina e Irene, por su cooperación en diferentes aspectos de esta tesis. A todos los que forman parte del Grupo de Investigación Preservación y Calidad de Alimentos, gracias por las innumerables charlas compartidas, por su amistad, por reconfortarme en los momentos difíciles y por el apoyo en todo este trayecto.

Al Grupo de Ingeniería Bioquímica, quienes me han hecho parte del grupo y también me bancaron en las buenas y en las malas, brindando su apoyo y amistad en este camino.

A la Lic. Silvia Barañano, de la empresa Pranas S.A., por facilitar las muestras de anchoíta.

A la Lic. María L. Patat, por su contribución en temáticas estadísticas.

A la Ing. Marisa Romero, del SENASA – Regional Mar del Plata, por su colaboración en las cuantificaciones de histamina.

A la Dra. Margarita Gomila, Dr. Narjol Sanchez-Escalona y Dr. Howard Junca, por su contribución en las identificaciones moleculares. A la Dra. Débora Nercessian y a la Dra. Karina Herrera-Seitz por brindarme sus conocimientos en los primeros pasos de este área.

A mi mamá y mi papá, eternamente agradecida por ser la fuerza impulsora en todos mis proyectos, por su constante apoyo, confianza y amor.

A Rau y Lu, mis hermanos, mis amigos y compañeros, siempre incondicionales en todos los aspectos. Agradezco al Universo que formen parte de mi vida.

A Gus, mi compañero de vida, por la familia que formamos, por bancarme y acompañarme, y a Oli, por enseñarme que en esta vida no hay obstáculos que no se puedan sortear.

A Mara, Jorge, Mati y Tati, quienes completan mi familia y siempre están brindándome su apoyo y amor incondicional.

A mi familia y amigos, por los mates compartidos y por bancar mis ausencias, y a todos los que de algún modo colaboraron en el desarrollo de esta tesis.

## **Producido de la Tesis**

---

## PRODUCIDO DE LA TESIS

Parte de los resultados de esta Tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones:

### Presentaciones orales en congresos

**2015 - “Caracterización de bacterias halófilas extremas. Determinación de curvas de crecimiento.”** Perez, Silvina; Sánchez Pascua, Gabriela; Murialdo, Silvia Elena; Yeannes, María Isabel. XV CYTAL. XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. VI Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías. IV Simposio Latinoamericano sobre Higiene y Calidad de Alimentos. Trabajo Completo - Sesión: Microbiología, toxicología e inocuidad de alimentos. ISBN: 978-987-22165-7-3. Buenos Aires. 3 al 5 de noviembre de 2015. Trabajo completo y seleccionado para ponencia oral.

**2015 - “Microorganismos halófilos de anchoíta salada-madurada y su rol en la presencia de histamina”.** Perez, Silvina; Murialdo, Silvia E.; Yeannes, María I. III Congreso de Bioquímicos del Litoral, XVI Jornadas Argentinas de Microbiología. Colegio de Bioquímicos de Santa Fe y Asociación Argentina de Microbiología. Libro de Resúmenes, código 15-14, página 240. Santa Fe. 5 al 7 de agosto de 2015. Seleccionado para ponencia oral. Disponible en:

<http://acreditaciones.azurewebsites.net/Content/Libro%20de%20res%C3%BAmenes%20III%20CBL%20XVI%20JAM%20Final.pdf>

**2014 - “Modificación de la flora microbiológica durante el salado de anchoíta (*Engraulis anchoita*).”** Pérez, Silvina; Barañano, Silvia; Murialdo, Silvia; Yeannes, María Isabel. International Conference on Food Innovation – FoodInnova 2014. Libro de resúmenes, código 553, página 159. ISBN 978-950-698-340-6. Trabajos Completos. Compilado por Pedro Fito Maupoey y Jorge Amado Gerard. ISBN OC 978-950-698-376-5. Autores varios. Editado por la Universidad Nacional de Entre Ríos y la Universitat Politècnica de València. Ebook: pdf. ISBN Tomo 1. 978-950-698-379-6. Pág. 455-464.

Concordia - Entre Ríos. 20 al 23 de octubre de 2014. Trabajo completo y seleccionado para ponencia oral.

### **Presentaciones en congresos**

**2017 - “Degradación de histamina por microorganismos halófilos”.** Perez, Silvina; Tranier, Ariel; Romero, Marisa; Amezttoy, Irene; Murialdo, Silvia E.; Zaritzky, Noemí E.; Yeannes María I. XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XVI CYTAL). 18 al 20 de septiembre de 2017 en Mar del Plata, Argentina. Trabajo completo.

**2017 - “Evaluación de la microflora en muestras de *Engraulis anchoita* en diferentes etapas del proceso de maduración.”** Perez, Silvina; Amezttoy, Irene; Yeannes, María I. XVI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos (XVI CYTAL). 18 al 20 de septiembre de 2017 en Mar del Plata, Argentina. Trabajo completo.

**2015 - “Rol de bacterias halófilas en el nivel de histamina de anchoíta madurada”** Perez, Silvina; Murialdo, Silvia E.; Yeannes, María I. Segundo Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires. Comisión de Investigaciones Científicas (CIC). La Plata. 1 de octubre de 2015. Poster. Disponible en: <http://concyt2015.cic.gba.gov.ar/posters.html>

**2014 - “Efecto de la temperatura en la deshidratación osmótica de anchoíta (*Engraulis anchoita*).”** Pérez, Silvina; Barañano, Silvia; Murialdo, Silvia; Yeannes, María I. International Conference on Food Innovation – FoodInnova 2014. Libro de resúmenes, código 552, página 158. ISBN 978-950-698-340-6. Concordia - Entre Ríos. 20 al 23 de octubre de 2014. Resumen.

**2014 - “Microbiological analysis of salt used in the process of salting fish.”** Pérez, Silvina; Nisembaum, Melina; Barañano, Silvia; Murialdo, Silvia; Yeannes, María I. X Congreso Argentino de Microbiología General. Sociedad Argentina de Microbiología

General (SAMIGE). Proceeding, código BD-006. Pág. 143. Mar del Plata. 2 al 4 de julio de 2014. Resumen. Disponible en: <http://www.samige.org.ar/doc/2014/Libro%20Samige%202014.pdf>

**2013 - “Halófilas en anchoíta quimiotácticas hacia histidina y/o histamina.”** Pérez, Silvina; Yeannes, María Isabel; Murialdo, Silvia. Primer Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires. Comisión de Investigaciones Científicas (CIC). La Plata. 19 y 20 de septiembre de 2013. Poster. Disponible en: <http://concyt2015.cic.gba.gov.ar/concic2013/posters.html>

### **Capítulo de libro**

**2016 - “Modificación de la microflora durante el salado de anchoíta (*Engraulis anchoíta*)”.** Perez, Silvina; Ameztoy, Irene; Murialdo, Silvia; Yeannes, María Isabel. Vinculación Tecnológica Vol. IV. Editorial EUDEM. UNMDP. ISBN: 978-987-544-724-0. Obras Completas "Vinculación Tecnológica" ISBN 978-987-544-493-5

### **Revistas internacionales con referato**

**2017 - “Monitoring the characteristics of cultivable halophilic microbial population during salted-ripened anchovy (*Engraulis anchoíta*) production”.** Perez S; Czerner M; Patat ML; Zarytzky NE; Murialdo SE; Yeannes MI. International Journal of Food Microbiology en agosto 2017. En revisión.

## **Resumen**

---

## RESUMEN

El proceso de salado-madurado es un método de preservación tradicionalmente aplicado a diferentes especies pelágicas obteniendo un producto con características sensoriales típicas. Dentro de este tipo de productos se encuentra la anchoíta salada-madurada, elaborada en Europa a partir de la especie *Engraulis encrasicolus* y en Latinoamérica a partir de las especies *Engraulis anchoita* y en menor medida, *Engraulis ringens*.

El proceso tradicional de elaboración de este producto consta de dos etapas en las que suceden los principales cambios fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales: el salado húmedo y la maduración. Tradicionalmente, estas etapas se efectúan a temperatura ambiente. El salado húmedo (deshidratación osmótica) consiste en sumergir el pescado en salmuera saturada, logrando una rápida reducción de la actividad de agua con el objetivo de impedir el desarrollo de microorganismos patógenos y/o la formación de toxinas. A continuación, el proceso de maduración implica una serie de transformaciones fisicoquímicas y enzimáticas que llevan a la obtención del producto con las características sensoriales deseadas, requiriendo un período mínimo estimado de 6-8 meses. Durante este período los microorganismos halófilos tienen un papel preponderante conformando la microbiota típica que según sus características podría causar deterioro y/o toxicidad por la formación de histamina. Esta intoxicación es la enfermedad transmitida por alimentos de origen marino más conocida y extendida a nivel mundial.

En este contexto, en el presente trabajo de Tesis se propuso desarrollar el estudio de la microbiota presente durante el proceso de salado-madurado enfocando el estudio principalmente en las características de la flora halófila, su cinética, su influencia en el proceso de salado-madurado y en la presencia de histamina y la potencialidad del uso de cepas halófilas autóctonas como complemento en el proceso para control del contenido de histamina. A tal fin, se abordó la temática en forma integral, considerando los aspectos microbiológicos en simultáneo con los fisicoquímicos y además teniendo en cuenta las posibles implicancias sensoriales.

En el Capítulo 1, se presenta una introducción sobre la anchoíta salada-madurada, describiendo la especie *E. anchoíta* y las distintas etapas del proceso de elaboración del producto salado-madurado, desarrollando en mayor detalle las etapas correspondientes al salado y madurado. Además, se exponen los antecedentes (“estado del arte”) relativos al estudio de las modificaciones fisicoquímicas y sensoriales durante el proceso, así como también sobre la formación de histamina y el potencial uso de cultivos *starters* para su control en alimentos salado-madurados. Finalmente, se plantean los objetivos del presente trabajo de Tesis.

En el Capítulo 2, se detalla: a) la experiencias de salado húmedo realizada y la metodología fisicoquímica y microbiológica implicada en la misma, b) la metodología utilizada en la evaluación de la microbiota durante distintas etapas del proceso de salado-madurado; c) la caracterización fenotípica de las cepas halófilas incluyendo aquellas características de interés tecnológico y ensayos de quimiotaxis hacia histidina y/o histamina; d) la metodología de las identificaciones moleculares; e) análisis efectuados en relación a la degradación de histamina por cultivo mixto y cultivos puros; e) los modelos matemáticos utilizados para la evaluación de la cinética de transferencia de masa y de la dinámica de los cambios microbiológicos.

En el Capítulo 3, se presentan los resultados de la evaluación de la microbiota en diferentes estadios del proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada llevada a cabo por análisis de anchoíta de diversos saladeros de la ciudad de Mar del Plata, así como también los resultados de las experiencias de salado húmedo donde se efectuaron investigaciones y seguimientos de parámetros físico-químicos y microbiológicos, y modelado de los mismos, a fin de ampliar los conocimientos sobre los cambios que se llevan a cabo durante esta etapa del proceso.

En el Capítulo 4, se presentan los resultados obtenidos en la caracterización fenotípica de las cepas halófilas aisladas durante el proceso de salado-madurado de anchoíta (materias primas, anchoíta durante la etapa de salado húmedo y anchoíta durante

la etapa de maduración). Los mismos se analizaron mediante técnicas estadísticas Univariadas, Bivariadas y Multivariadas. El Análisis Univariado de características fenotípicas se realizó a fin de evaluar los resultados globales mientras que con el Bivariado es posible distinguir relaciones entre resultados de a pares de sets. Asimismo, se propuso el uso Análisis Multivariado (Análisis de Correspondencias Múltiple seguido de Análisis de Clúster) con el objetivo de encontrar relaciones entre las variables (pruebas fenotípicas) que no podrían deducirse analizando pares. De este modo, se hizo un análisis integral de las características de la población halófila que actúa en el salado-madurado y se analizó su contribución en el proceso. En este capítulo también se incluyen los análisis de un set de cepas diferente a las anteriores, aisladas durante la maduración de anchoíta (cepas provenientes del stock del cepario del GIPCAL) y de filetes de anchoíta salada-madurada en aceite, los cuales se contrastaron con los resultados del Análisis Multivariado.

En el Capítulo 5, se presentan los resultados de la investigación la influencia de las cepas halófilas en la presencia de histamina. Se analizó la presencia de cepas formadoras de histamina y la posible quimiotaxis hacia la misma y hacia su precursor (histidina). Por otro lado, se presentan los resultados de los análisis de degradación de histamina por cepas puras y por cultivos mixtos. Se realizó la identificación genotípica de las cepas, con especial interés en las degradadoras de histamina, así como también se analizó su posible influencia sensorial en caso de ser utilizadas como cultivos iniciadores en el proceso de salado-madurado.

Finalmente, se exponen las Conclusiones generales obtenidas a partir de este trabajo de Tesis y en base a ellas, las Perspectivas futuras.

# Índice

---

# ÍNDICE

<b>Producido de la Tesis.....</b>	<b>5</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO 1: Introducción y objetivos.....</b>	<b>19</b>
1.1. Introducción .....	20
1.1.1. Generalidades sobre <i>Engraulis anchoita</i> .....	25
1.1.2. Composición química de la especie .....	30
1.1.3. Características de la sal .....	32
1.1.4. Proceso de salado-madurado.....	33
1.1.4.1. Captura y acondicionamiento a bordo.....	35
1.1.4.2. Recepción de la materia prima .....	36
1.1.4.3. Lavado y descamado .....	36
1.1.4.4. Salado húmedo (deshidratación osmótica).....	37
1.1.4.5. Descabezado y eviscerado.....	39
1.1.4.6. Clasificación por tamaño.....	40
1.1.4.7. Enjuague (opcional) .....	42
1.1.4.8. Acondicionamiento .....	42
1.1.4.9. Maduración .....	46
1.1.4.10. Elaboración de filetes de anchoíta.....	47
1.1.5. Desarrollo de la maduración .....	48
1.1.6. Caracterización sensorial del producto salado-madurado .....	50
1.1.7. Deterioro y pérdida de inocuidad de anchoíta fresca y salada-madurada .....	51
1.1.7.1. Deterioro autolítico y microbiano del pescado fresco.....	52
1.1.7.2. Microorganismos halófilos: generalidades e influencia en el proceso .....	53
1.1.7.3. Pérdida de inocuidad por presencia de histamina .....	56
1.1.8. Motilidad quimiotáctica de los microorganismos .....	57
1.1.9. Cultivos degradadores de histamina.....	59
1.1.10. Consideraciones cinéticas del crecimiento microbiano.....	60

1.1.11. Consideraciones cinéticas de la deshidratación osmótica .....	65
1.2. Objetivos .....	69
1.2.1. Objetivo General .....	69
1.2.2. Objetivos Particulares .....	69
<b>CAPÍTULO 2: Materiales y métodos.....</b>	<b>71</b>
2.1. Diseño de experiencias.....	72
2.2. Análisis efectuados a partir de muestras de pescado.....	75
2.2.1. Materia prima .....	75
2.2.2. Experiencias de deshidratación osmótica.....	78
2.2.3. Acondicionamiento de las muestras .....	78
2.2.4. Análisis físico-químicos de anchoíta.....	79
2.2.5 Análisis microbiológicos de anchoíta.....	81
2.3. Aislamiento y caracterización de cepas halófilas representativas .....	85
2.3.1. Pruebas fenotípicas de caracterización microbiana .....	86
2.3.1.1. Pruebas fenotípicas de interés tecnológico.....	91
2.3.1.2. Ensayo de quimiotaxis hacia histidina y/o histamina.....	94
2.3.2. Pruebas moleculares de identificación microbiana .....	95
2.4. Análisis efectuados en relación a la degradación de histamina.....	99
2.4.1. Medición de la biomasa en medios de cultivo líquidos.....	99
2.4.2. Investigación de cepas degradadoras de histamina .....	99
2.4.3. Investigación de la degradación de histamina por un cultivo mixto .....	100
2.4.4. Estudios de degradación de histamina en biorreactor discontinuo.....	101
2.4.4.1. Aclimatación a la presencia de alta concentración de histamina.....	101
2.4.4.2. Degradación de histamina como única fuente de carbono .....	101
2.4.5. Cuantificación de histamina mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC). 103	
2.5. Índices utilizados para evaluar eficiencia del procesamiento.....	103
2.5.1. Concentración de sal en la fase líquida del músculo.....	103
2.5.2. Índice de abundancia relativa de especies.....	104
2.5.3. Índice de diversidad de Shannon.....	105
2.5.4. Porcentaje de ocurrencia .....	105
2.5.5. Tasa de supervivencia .....	105

2.5.6. Actividad degradadora de histamina .....	106
2.6. Modelos matemáticos.....	106
2.6.1. Modelos matemáticos de crecimiento microbiano .....	106
2.6.1.1. Modelo de Gompertz (modificado).....	106
2.6.1.2. Modelo Logístico (modificado) .....	107
2.6.1.3. Parámetros derivados .....	108
2.6.2. Modelos matemáticos de inactivación microbiana .....	109
2.6.2.1. Modelo de Gompertz.....	109
2.6.2.2. Modelo de Weibull para inactivación microbiana .....	110
2.6.3. Modelo matemático para la estimación de <b>aw</b> en pescado.....	111
2.6.4. Modelos matemáticos de la cinética de transferencia de masa .....	111
2.6.4.1. Modelo de Peleg.....	111
2.6.4.2. Modelo de Zugarramurdi y Lupín (ZyL) .....	112
2.6.4.3. Modelo de Weibull.....	113
2.6.4.4. Modelo de Crank para cilindro infinito.....	114
2.7. Análisis estadísticos .....	115
2.7.1. Análisis estadístico para variables cuantitativas .....	116
2.7.2. Análisis estadístico para variables categóricas nominales (univariado, bivariado y multivariado).....	116
2.7.3. Análisis estadístico de bondad de ajuste de los modelos .....	117
<b>CAPÍTULO 3: Evaluación de la dinámica microbiana y transferencia de masa durante el proceso de salado-madurado de <i>E. anchoíta</i> .....</b>	<b>120</b>
3.1. Introducción .....	121
3.2. Resultados y discusión .....	124
3.2.1. Evaluación microbiológica de anchoíta de diferentes etapas y plantas elaboradoras de la ciudad de Mar del Plata.....	124
3.2.1.1. Análisis microbiológicos de anchoíta fresca .....	124
3.2.1.2. Análisis microbiológicos de anchoíta salada.....	126
3.2.1.3. Análisis microbiológicos de anchoíta madurada.....	127
3.2.1.4. Evaluación del comportamiento microbiano durante el procesamiento.....	129
3.2.2. Transferencia de masa durante la deshidratación osmótica por vía húmeda.....	133
3.2.2.1. Composición química proximal .....	133

3.2.2.2. Cinética de la deshidratación osmótica de anchoíta entera .....	133
3.2.2.3. Concentración de sal en la fase líquida del músculo.....	137
3.2.2.4. Ajuste de actividad de agua.....	138
3.2.2.5. Modelo de Peleg.....	140
3.2.2.6. Modelo de Zugarramurdi y Lupín .....	142
3.2.2.7. Modelo de Weibull.....	144
3.2.2.8. Modelo Difusivo Cilindro Infinito .....	147
3.2.3. Evaluación microbiológica durante la deshidratación osmótica de anchoíta entera por vía húmeda .....	150
3.2.3.1. Cinética microbiana durante la deshidratación osmótica de anchoíta entera .....	150
3.2.3.2. Modelos de crecimiento microbiano .....	156
3.2.3.3. Modelos de inhibición microbiana .....	158
3.3. CONCLUSIONES PARCIALES.....	163

**CAPÍTULO 4: Caracterización de bacterias y arqueas halófilas y evaluación de su influencia en el salado-madurado de *E. anchoíta* .....** 166

4.1. Introducción .....	167
4.2 Resultados y discusión .....	170
4.2.1 Análisis de la contribución de los microorganismos halófilos al proceso.....	170
4.2.1.1 Recuentos microbiológicos .....	170
4.2.1.2 Análisis estadístico.....	175
4.2.1.3 Análisis Univariado y Bivariado .....	175
4.2.1.4 Análisis Multivariado.....	186
4.2.2. Determinación de la validez del agrupamiento de características de cepas de la maduración .....	194
4.2.2.1 Descripción de las muestras .....	194
4.2.2.2 Aislamiento de microorganismos halófilos.....	196
4.2.2.3 Caracterización fenotípica de las cepas representativas.....	197
4.3 CONCLUSIONES PARCIALES.....	200

**CAPÍTULO 5: Influencia de bacterias y arqueas halófilas en la formación y degradación de histamina.....** 203

5.1. Introducción .....	204
-------------------------	-----

5.2. Resultados y discusión .....	206
5.2.1. Ensayos de cepas puras .....	206
5.2.1.1. Estudios de quimiotaxis .....	206
5.2.1.2. Formación de histamina por microorganismos halófilos .....	211
5.2.1.3. Degradación de histamina por microorganismos halófilos .....	212
5.2.1.4. Características fenotípicas de interés tecnológico .....	213
5.2.1.5. Identificaciones moleculares .....	217
5.2.2. Degradación de histamina por un cultivo mixto .....	220
5.2.2.1. Etapa de aclimatación.....	220
5.2.2.2. Modelado del crecimiento microbiano durante la aclimatación.....	222
5.2.2.3. Degradación de histamina por el consorcio microbiano .....	227
5.2.2.4. Degradación de histamina en condiciones de nutrientes limitadas .....	228
5.3 CONCLUSIONES PARCIALES.....	233
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>235</b>
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>241</b>
<b>NOMENCLATURA .....</b>	<b>244</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>248</b>

# **CAPÍTULO 1: Introducción y objetivos**

---

## 1.1. Introducción

El pescado es una fuente valiosa de micronutrientes, minerales, ácidos grasos esenciales y proteínas. La variación normal en la composición de la carne del pescado es de 16-21% de proteínas, 0,2-25% de grasas, menos de 0,5% de carbohidratos y 1,2-1,5% de compuestos minerales, cantidades abundantes de vitaminas solubles en agua, dependiendo de la especie que se trate. La composición química de los peces varía considerablemente entre las diferentes especies y también entre individuos de una misma especie debido a distintos factores tales como sexo, edad, madurez sexual, estado nutricional, fase migratoria, área de captura y otros (Carvalho y Castello, 2013; Huss, 1999).

Las especies pesqueras de origen marino se caracterizan por poseer altos contenidos de proteína de alto valor nutricional debido a la baja proporción de colágeno (Opara et al., 2007) y elevados niveles de ácidos grasos mono (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) independientemente de la cantidad total de lípidos que posean, dependiendo esto de la especie que se trate. Existe amplia bibliografía científica que indica los beneficios que otorga desde el punto de vista nutricional y para la salud la ingesta de estos ácidos grasos (Carrero et al., 2005; Castro-González, 2002; Huss, 1999). Por otro lado, estas características los hace fácilmente susceptibles a la rancidez oxidativa, por lo que se debe tener en cuenta que los procesos de conservación pueden modificar tanto la cantidad como la calidad de los mismos.

En función del contenido graso, las especies pesqueras se pueden diferenciar entre magras y grasas. Especies magras son aquellas que almacenan lípidos sólo en el hígado y especies grasas son las que almacenan lípidos en células distribuidas en otros tejidos del cuerpo. Las típicas especies magras son peces que habitan en el fondo acuático (demersales), como el bacalao, el carbonero y la merluza. Las especies grasas incluyen los pelágicos como la anchoíta (*Engraulis anchoita*) y la caballa (*Scomber japonicus*) (Huss, 1999).

La potencialidad de la costa de la Prov. de Buenos Aires radica en que es la única zona del litoral marítimo argentino donde confluyen la corriente cálida de Brasil y la fría de

Malvinas, lo que la hace rica en variedad de especies, pero fundamentalmente es la única que cuenta con especies pelágicas (anchoita y caballa) que circulan con la corriente del Brasil y también especies costeras, como corvina negra (*Pogonias cromis*) y rubia (*Micropogonias furnieri*). Esto hace a la zona del puerto de Mar del Plata especialmente rica en especies pesqueras con uso actual y potencial e importancia geopolítica, siendo le mencionado el principal puerto pesquero del país (Bourlon y Caro, 1997; Pastous Madureira et al., 2009).

La industria pesquera argentina tiene una importancia socio-económica de larga trayectoria y es una fuente significativa de ingresos para el país. En particular, en Mar del Plata se localiza el puerto con mayor porcentaje de desembarcos y actividad industrial relacionada con la pesca. El mercado exterior de pescado de Argentina se ha fundado principalmente en unas pocas especies (magras, demersales) y poca variedad de productos lo que lo hace particularmente sensible a las modificaciones del mercado. Las empresas y la tecnología se han dirigido casi con exclusividad a estas especies y productos. Este abuso a nivel industrial-comercial de las especies demersales ha puesto en peligro reiteradamente la pesquería de la merluza, entre otras. Encontramos así que las especies pelágicas y costeras privativas de la Prov. de Buenos Aires son las menos explotadas actualmente si bien su desarrollo tecnológico representa el futuro de esta provincia y del Puerto de Mar del Plata, representativo de la misma (Pastous Madureira et al., 2009).

Más del 50% de la población de Mar del Plata y alrededores está directa o indirectamente relacionada con la pesca (Yeannes, 2013). Informes recientes de FAO y otras organizaciones gubernamentales y no gubernamentales manifiestan su preocupación respecto del desarrollo sostenible de las pesquerías. Muchos recursos pesqueros tradicionales están sometidos a una excesiva explotación y/o han agotado sus caladeros, lo que malogra los beneficios potenciales de la actividad (FAO, 2011). Por ello, actualmente se están llevando a cabo programas nacionales e internacionales de investigación pesquera destinados a promover el manejo, la conservación y el aprovechamiento integral de las capturas marinas intentando promover el desarrollo de productos y subproductos con agregado de valor y alta calidad. Se promueve el sustento tecnológico de los procesos,

mejoramiento de la calidad para un mercado cada vez más competitivo e información sobre los peligros e inocuidad de estos productos.

En este contexto, con el objetivo de mejorar el aprovechamiento de especies pelágicas, los procesos que involucren a la especie *Engraulis anchoita* (Fig. 1.1) resultan estratégicos. Cabe destacar que Argentina es el principal explotador y elaborador de productos de *E. anchoita* para consumo humano de los mercados interno y de exportación (Pastous Madureira et al., 2009).



**Figura 1.1:** Ejemplar de *E. anchoita*

Fuente: Hansen (2000)

En la Argentina con *E. anchoita*, se elaboran conservas, marinado y productos del salado-madurado. Prácticamente el 100% de lo producido como marinado y el 95% del salado-madurado (Fig. 1.2) es exportado, en el último caso como producto intermedio (commodity). Así, esta especie y sus productos constituyen una entrada de divisas importantes para el Sector Pesquero, siendo asimismo una industria proveedora de gran cantidad de puestos de trabajo por su elaboración eminentemente manual.

a)



b)



**Figura 1.2:** a) Producto intermedio de anchoíta salada-madurada (en barriles) y b) filetes de anchoíta salada-madurada.

Fuente: Yeannes (2013)

La anchoíta salada-madurada es un producto típico de la industria pesquera que se elabora a partir de la adopción del proceso de salado-madurado tradicional de países europeos, donde se utiliza *Engraulis encrasicolus*. Este proceso de elaboración continúa manteniendo las características artesanales, restando aún analizar aspectos del proceso no dilucidados y desafíos en cuanto a la potencial presencia de peligros para la inocuidad de este producto.

La anchoíta salada-madurada se conserva debido a su alto contenido de NaCl (14-20% p/p) y baja actividad de agua ( $a_w \sim 0,75$ ) (Filsinger et al., 1987; Yeannes, 2006). Estas condiciones impiden el crecimiento de bacterias patógenas y deteriorantes típicas del pescado fresco (Gram y Huss, 1996). La fermentación natural de alimentos madurados salados conduce al crecimiento de gran diversidad de bacterias y arqueas halófilos o halotolerantes capaces de sobrevivir y crecer en ambientes hipersalinos (Czerner y Yeannes, 2014, Ventosa et al., 1998). Estos microorganismos pueden proceder tanto de la anchoíta como de la sal (Félix et al., 2006 y 2007; Fuselli et al., 2003; Yeannes, 2006). Durante el salado-madurado de anchoíta, los principales cambios en la microbiota se dan en las etapas de salado húmedo y maduración (Czerner y Yeannes, 2014; Hernández-Herrero et al., 1999c; Ramirez et al., 1994; Pons-Sánchez-Cascado et al., 2005). La microbiota

halófila de la anchoíta salada-madurada ha sido analizada por diversos autores (Czerner y Yeannes, 2014, Félix et al., 2016; Hernández-Herrero et al., 1999c) y se ha determinado el comportamiento de los grandes grupos (halotolerantes, halófilas moderadas, halófilas extremas) en distintas condiciones de proceso (temperatura y nivel de prensa) (Czerner y Yeannes, 2007, 2010 y 2011; Félix et al., 2007; Yeannes, 2006). Por otro lado, Ramirez et al. (1994) determinaron por primera vez en anchoíta salada-madurada la presencia de bacterias halófilas extremas con capacidad de descarboxilar histidina, es decir, formadoras de histamina. Esta amina biógena, según la dosis ingerida y la sensibilidad del consumidor, es causal de intoxicación. Se considera normal el contenido de histamina hasta 50 ppm, aumentado entre 50-100 ppm (provoca desordenes en sujetos susceptibles), tóxico entre 100-1000 ppm y altamente tóxico mayor a 1000 ppm (Ienistea, 1973; Yeannes, 1995).

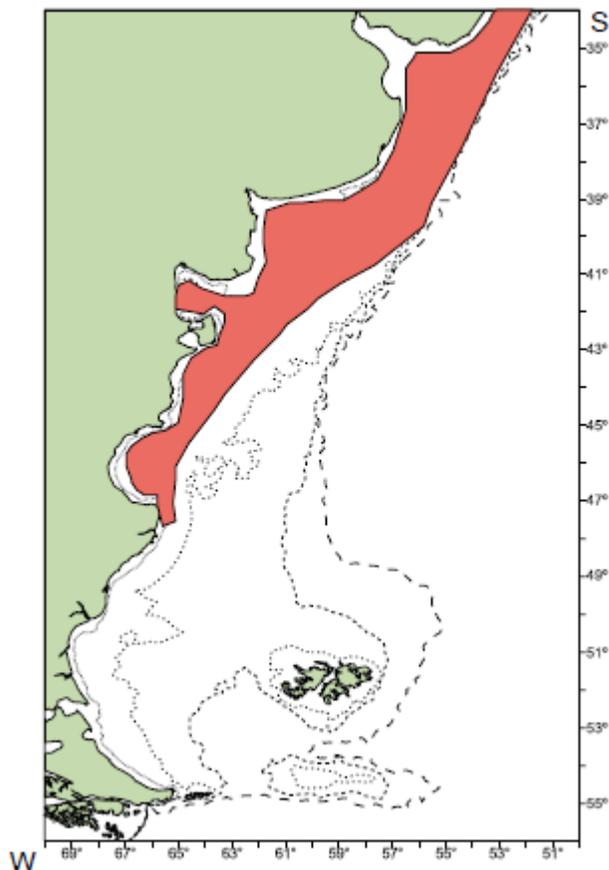
En estos productos se pueden generar pérdidas provocadas por problemas de deterioro y/o inocuidad. Desde el punto de vista del deterioro, tanto en la anchoíta fresca como en su producto salado-madurado, la actividad bacteriana juega un papel preponderante, modificando caracteres sensoriales, disminuyendo rendimiento y el tiempo de vida útil. El peligro potencial con mayor probabilidad de ocurrencia en estos productos es la presencia de histamina y/o otras posibles aminas biógenas, productos de la degradación de aminoácidos libres y proteínas del pescado (Gram y Huss, 1996; Yeannes, 2006).

La utilización de cepas que posean actividad degradadora de histamina podría ser un camino para la disminución de la cantidad de histamina producida en la anchoíta durante el proceso de salado-madurado. Se han reportado posibles cultivos puros como posibles iniciadores (Lee et al. 2016; Musmeci, 2001; Tapingkae et al., 2010; Villar et al., 1985; Zaman et al., 2014), pero no se ha considerado el efecto sobre las características sensoriales del producto que las mismas pueden provocar. Por otro lado, no hay antecedentes sobre el posible uso de cocultivos o cultivos mixtos, siendo que en la naturaleza la mayoría de los microorganismos se encuentran formando parte de comunidades microbianas, en las que se obtienen productos mediante la combinación de vías metabólicas de diferentes microorganismos (Wacher Rodarte, 2012; Smid y Lacroix, 2013).

De este modo, los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis serían de utilidad tecnológica para el proceso de elaboración de anchoíta salada y madurada así como también podrían extenderse a otros alimentos salados y madurados, como jamón crudo, quesos madurados, salsa de soja, entre otros.

### **1.1.1. Generalidades sobre *Engraulis anchoita***

La *Engraulis* spp. se distribuye ampliamente en los océanos templados. La anchoíta (*Engraulis anchoita*) es un pequeño pez pelágico que habita desde Vitoria, frente a Brasil (20°S), hasta el Golfo San Jorge, frente a Argentina (48°S) (Fig. 1.3). Habita en las aguas de la plataforma continental entre profundidades de 10 y 200 metros (Hansen y Garcarena, 2004; Castello, 2007). Los datos más recientes sugieren la presencia de tres grupos poblacionales mediante distintas características morfométricas de *E. anchoita* en el Suroeste Atlántico: el efectivo Patagónico (48°-41°S), el efectivo Bonaerense (41°-28°S norte de Argentina, Uruguay y sur de Brasil) y otro en el área entre 28° y 20°S, que se conoce como el efectivo Entrante del Sureste Brasileño (Castello, 2007; Carvalho y Castello, 2013). Esta clasificación es la más actual y se basa en datos biológicos y de población pero sus características de composición no se encuentran aun estudiadas.



**Figura 1.3:** Distribución de la *E. anchoita* frente a Argentina y Uruguay.

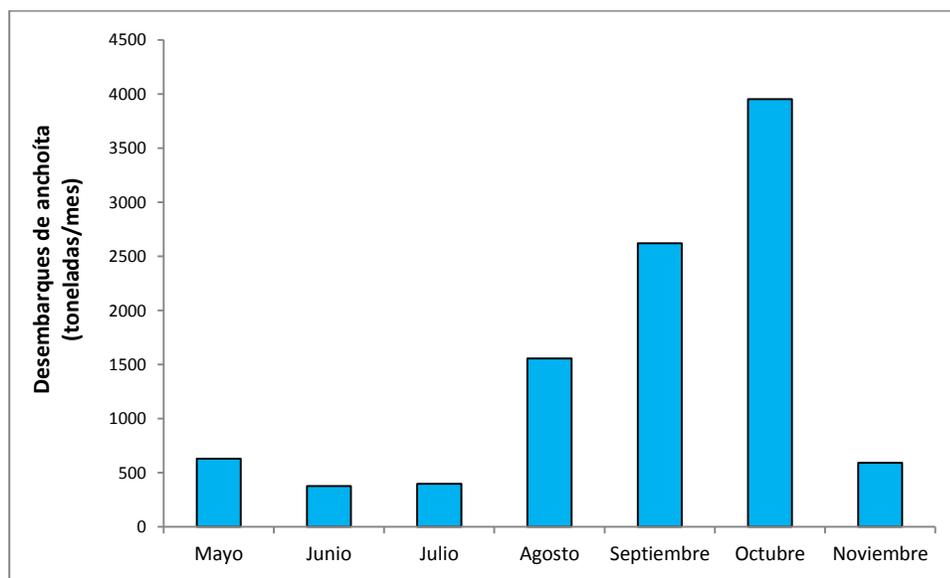
Fuente: Hansen (2000)

La *E. anchoita* tolera un rango salinidad de 14-35 ups (unidades prácticas de salinidad, son adimensionales pero se asigna 35 ups a 35 gramos de sal por litro de solución) y de temperaturas (8-25°C). Las áreas donde estos factores muestran marcados gradientes son favorables para la ocurrencia de mayores concentraciones de anchoíta. Como es común en otras especies pelágicas, durante el día forman densos cardúmenes a profundidad variable, mientras que por la noche ascienden hasta aguas cercanas a la superficie y se dispersan para alimentarse (Hansen, 2000).

En el trabajo de Massa et al. (2013) se analizan los efectivos denominados bonaerense y patagónico. Estas poblaciones están muy próximas hacia finales de la primavera y principios del verano, mientras que en el invierno los cardúmenes se encuentran separados por una distancia mayor a 500 km. El bonaerense cumple un ciclo

migratorio anual bien determinado, encontrándose una fracción variable de este efectivo en aguas del sur de Brasil durante el invierno. En agosto-septiembre, los primeros cardúmenes de adultos arriban a las aguas costeras y de la plataforma intermedia argentina provenientes del noreste. Su presencia es masiva durante el pico de la estación reproductiva (octubre-noviembre), momento en el cual se producen los mayores volúmenes de captura (Figura 1.4). Una vez producido el desove, los cardúmenes dejan las aguas costeras y son encontrados principalmente en la plataforma intermedia y exterior, donde se alimentan en forma intensiva (diciembre-mayo). Durante el final del otoño, las anchoítas se alejan aún más de las regiones costeras, alcanzando la parte externa de la plataforma y aguas sobre el talud continental, entre los 33 y 37° S, constituyendo su principal lugar de ocurrencia durante el invierno. Habitualmente, durante los meses de mayo-julio se registra un arribo secundario de cardúmenes de adultos al área pesquera de Mar del Plata (Hansen, 2000).

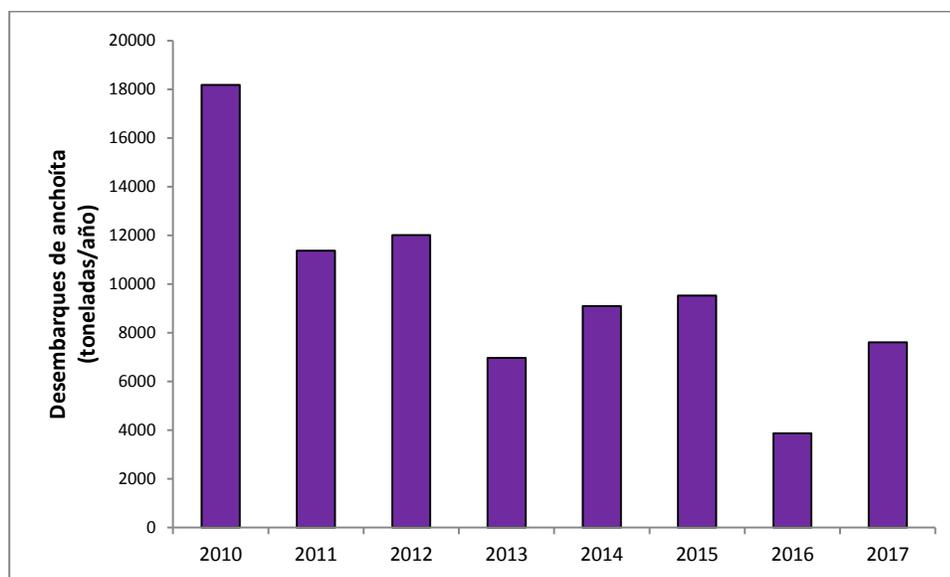
La población bonaerense de anchoíta constituye el recurso íctico más abundante de la zona, con estimaciones de biomasa total entre 1 y más de 5 millones de toneladas. Acerca del efectivo patagónico se dispone de menor información, esta población tendría una composición química diferente de la bonaerense (Hansen, 2000).



**Figura 1.4:** Desembarques de anchoíta por mes. Datos mensuales\* promedio entre el 2010 y 2016 en la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguaya.

\*En los meses restantes las capturas promedio fueron menores a 100 toneladas.

De acuerdo a esta información queda claro que la *E. anchoita* es la especie pesquera menos explotada del Atlántico Sudoccidental. Para el año 2016, se fijó la Captura Total Permissible (CTP, corresponde a la máxima captura posible sin entrar en sobrepesca) en 80.000 toneladas para la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguaya (ZCPAU). Las capturas se mantienen muy por debajo del CTP, como puede observarse en la figura 1.5. El principal explotador de este recurso ha sido históricamente Argentina. Las capturas realizadas por Uruguay representan menos del 0,2% del total. En Brasil no hay actividades de pesca de anchoíta que se lleven a cabo comercialmente. Recientemente el mercado externo de la anchoíta se expandió considerablemente a partir del agotamiento de algunos caladeros tradicionales como el del Golfo de Vizcaya, la incorporación al mercado de destinos asiáticos y la posible utilización de este recurso en la fabricación de harina y aceite de pescado (Barbosa y Abdallah, 2012; CTMFM, 2017; Pastous Madureira et al., 2009).



**Figura 1.5:** Desembarques de anchoíta por año en la Zona Común de Pesca Argentino-Uruguaya.

Argentina fue el pionero en la región en cuanto a la explotación y manufactura de la anchoíta para productos de consumo humano. La comercialización comenzó con materia prima salada antes de la Primera Guerra Mundial, abriendo nuevas perspectivas para la explotación pesquera (Pastous Madureira et al., 2009). La pesca de anchoíta transformó el

puerto de Mar del Plata, donde se desembarca el mayor volumen de esta especie. La producción nacional de anchoíta salada-madurada se concentra en Mar del Plata y Quequen/Necochea (Prov. de Buenos Aires) (Bourlon y Caro, 1997; CTMFM, 2017).

Las plantas de procesamiento comenzaron a proliferar en la década de 1970, cuando la pesquería de la anchoíta europea (*Engraulis encrasicolus*) declinó, principalmente en España y Portugal, debiendo recurrir a la importación de anchoíta salada-madurada, alentando de este modo a Argentina a expandir sus plantas (Bertolotti y Manca, 1986). Este recurso se destina en Argentina, a consumo directo e industrialización, siendo este último al que corresponde la mayor utilización. La anchoíta es utilizada por la industria argentina en la conservería, para elaborar las denominadas "sardinias argentinas", en la elaboración de anchoítas marinadas comercializadas como "boquerones" y en el salado-madurado, para elaborar anchoítas, filete de anchoíta y productos derivados (Yeannes, 2006). El 55 % de la anchoíta utilizada por la industria local se destina al producto "sardinias argentinas", teniendo lugar su procesamiento principalmente durante el mes de octubre. Su producción se destina casi en su totalidad al mercado interno. La anchoíta marinada posee un mercado pequeño y se destina el 90% del mismo para exportación fundamentalmente a países limítrofes y España y el resto para mercado interno (Yeannes, 2006). En cuanto a los productos salado-madurados, el 95% se destina al mercado externo y se comercializa principalmente como producto intermedio (commodity) en tambores de 200 kg, cuyo envío se realiza generalmente sin que el producto finalice el período de maduración (se completa en el trayecto hacia el destino final), teniendo a España como principal importador y en menor medida a Portugal, Francia, Italia, Grecia, Austria, Reino Unido, Estados Unidos, Canadá, Brasil, Uruguay y Sudáfrica. También se exporta anchoíta salada "a la vera carne" (mínimo contenido de sal indicado para su estabilidad) destinada a Italia y filetes de anchoíta en aceite destinado a Estados Unidos y Brasil, entre otros (Bertolotti y Manca, 1986; CTMFM, 2017; Pastous Madureira et al., 2009). El 5% restante con destino al mercado interno puede ser como anchoíta salada-madurada, filetes de anchoíta en salmuera y filetes de anchoíta en aceite (girasol, soja), correspondiendo el 33,5% a la ciudad de Buenos Aires y el 66,5 % al interior del país (Bertolotti y Manca, 1986; CTMFM, 2017; Yeannes, 2006).

La producción actual de anchoíta salada-madurada no logra abastecer la demanda (Yeannes, 2006; Pastous Madurereira, 2009; CTMFM, 2017). Esta especie y sus productos constituyen una entrada de divisas importantes para el Sector Pesquero y en general del país, siendo asimismo una industria proveedora de gran cantidad de puestos de trabajo, por su elaboración eminentemente manual.

### 1.1.2. Composición química de la especie

La anchoíta es una especie pelágica grasa, por lo tanto se caracteriza por un alto contenido de lípidos y con una amplia variación estacional, observándose valores máximos en materia grasa entre enero y agosto (hasta 18%) y los mínimos entre agosto y diciembre (~0,5%) (Massa et al., 2013; Mattos Avallone et al., 1976). También existe variación del contenido lipídico y del perfil de ácidos grasos de la anchoíta bonaerense en función de la zona de captura y al tamaño de los ejemplares (Massa et al., 2013). En cuanto al resto de los macronutrientes se ha reportado 70-77% de humedad, contenido de cenizas 2-3 (valor medio) y proteínas entre 16 y 18% (leve aumento en primavera) (Aizpún de Moreno et al., 1979; Massa et al., 2007 y 2012).

**Tabla 1.1.** Composición proximal (g/100 g) del efectivo Bonaerense y patagónico de anchoíta entera (base húmeda)

	Efectivo Bonaerense	Efectivo Patagónico
Proteína (%)	17,29 ±1,91	18,30±0,37
Grasas (%)	10,04±0,84	7,05±1,68
Humedad (%)	71,34±0,32	73,94±1,12
Cenizas (%)	2,76±1,47	3,04±0,32

Fuente: Massa et al. (2007)

Esta especie posee una considerable proporción de músculo oscuro, asociado al metabolismo energético aeróbico, el cual se caracteriza por una alta concentración de mioglobina y de lípidos comparado con el músculo claro y está localizado principalmente en las regiones asociadas a una gran actividad, como lo es la zona cercana a la cola y aletas formando una capa subcutánea en la zona de la línea lateral (Fig. 1.6 y 1.7) (Burt y Hardy, 1992).



**Figura 1.6.** Distribución del músculo oscuro en especies pelágicas

Fuente: Burt y Hardy (1992)



**Figura 1.7.** Corte de *E. anchoita* donde se observa el músculo oscuro

### 1.1.3. Características de la sal

El cloruro de sodio (sal) es un ingrediente esencial en los procesos de salado dado que posee diferentes funcionalidades: proporciona sabor, solubiliza proteínas, deshidrata y altera la presión osmótica a fin de inhibir el crecimiento bacteriano y la posterior descomposición (Gómez-Salazar et al., 2015). Industrialmente se utiliza sal comercial de grado alimentario, la cual puede variar en cuanto a su pureza, tamaño de granulos y contenido microbiano.

Respecto a la composición de la sal, la misma puede variar de acuerdo a su origen. La sal proveniente de mina o de salina a cielo abierto puede contener otras sales como sulfato de calcio ( $\text{CaSO}_4$ ), sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) y cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) como impurezas. Por otro lado, la sal refinada es prácticamente cloruro de sodio puro.

Para el salado-madurado de peces grasos se necesita una sal relativamente pura si bien para algunos productos la presencia de pequeñas cantidades de sales de calcio mejoraría la apariencia del producto. Sin embargo, demasiado calcio reduce la velocidad de penetración de la sal lo que podría favorecer el deterioro. Por otro lado, las sales de magnesio cuando están en altas concentraciones pueden aumentar el sabor a amargor, el cual es indeseado y podría causar deterioro durante las operaciones de salado.

Otra condición adversa que puede afectar la calidad del pescado es la decoloración marrón (amarilla) a menudo proveniente de la rancidez causada por catalizadores metálicos de la sal (Codex Alimentarius, 2012).

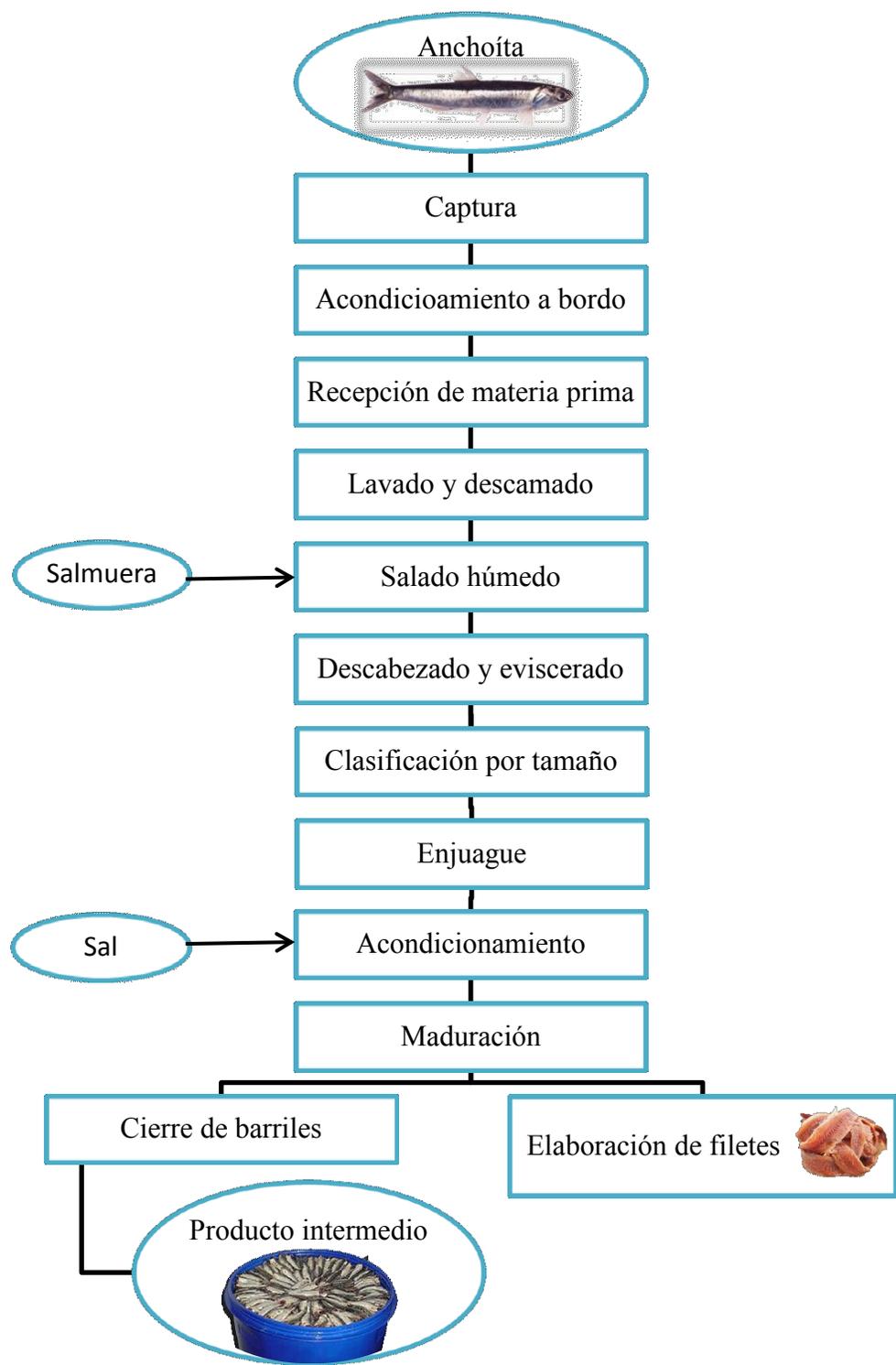
También es importante el tamaño de los granulos de la sal. Al intercalar capas de pescado y sal, el uso de sal de granulometría fina podría resultar en la formación de cúmulos, los cuales podrían impedir la distribución uniforme de sal sobre el pescado. Por otro lado, el uso de sal de granulometría muy grande podría dañar la carne de pescado y también podría reducir la velocidad de la maduración (Codex Alimentarius, 2012). Por ello,

para la maduración se utiliza sal con granulometría de pequeños cristales, denominada entrefina, mientras que se utiliza sal gruesa para la elaboración de la salmuera.

Asimismo, la sal puede contener microorganismos halófilos (bacterias, arqueas o mohos) que permanecen viables en la sal, los que en el pescado salado podrían contribuir al deterioro (Codex Alimentarius 2012; Félix et al., 2006).

#### **1.1.4. Proceso de salado-madurado**

En Argentina, la elaboración de anchoíta salada-madurada se realiza en la mayoría de las industrias de forma artesanal, utilizando un mínimo de equipamiento. Su proceso en planta consta de la recepción de materia prima, lavado y descamado, salado húmedo (inmersión en salmuera/deshidratación osmótica), descabezado y eviscerado, lavado, clasificación por tamaño, acondicionamiento en barriles con agregado de sal y maduración en salas climatizadas. Luego de la maduración, se puede comercializar como producto intermedio anchoíta salada-madurada en tambores o continuarse el proceso para la elaboración de filetes de anchoíta. El proceso detallado desde la captura se puede observar en la Fig. 1.8. Entre las etapas mencionadas, dos de ellas son las principales: 1) Salado húmedo: corresponde a la difusión de la sal dentro del músculo y la eliminación del agua, finalizando al alcanzar el equilibrio y 2) Maduración: se produce una transformación físico-química y enzimática que lleva a la obtención del producto con las características sensoriales deseadas (Filsinger et al., 1978).



**Figura 1.8:** Diagrama de flujo de la elaboración de anchoíta salada-madurada

En el diagrama de flujo de la Figura 1.8 se puede observar el proceso usual de procesamiento de la industria local. Los tiempos de cada proceso pueden variar con las características del pescado a salar, así como también con modificaciones de acuerdo a la experiencia de cada elaborador.

#### 1.1.4.1. Captura y acondicionamiento a bordo

La captura puede ser realizada por la flota costera amarilla (Fig. 1.9a) que transporta la anchoíta sin hielo y a granel y tiene una autonomía máxima de 12 horas, o en barcos fresqueros (Fig. 1.9b) que acondicionan el pescado en cajones plásticos con el agregado de hielo tienen autonomía mayor y pueden demorar días (7 a 10) en regresar a puerto. La tradicional flota amarilla dedicada en exclusividad a la captura de especies pelágicas costeras, si bien ejerce resistencia, esta siendo desplazada por la flota fresquera. La flota fresquera presenta la ventaja de traer la materia prima mantenida en hielo, lo que disminuye la probabilidad de problemas de inocuidad, si bien en la flota costera se mantiene mejor la calidad sensorial (piel, textura, daños) dado que generalmente el tiempo de viaje no supera la etapa de “rigor mortis” de la especie.

a)



b)



**Figura 1.9:** Flota de pesca de anchoíta. a) Flota costera amarilla y b) Barco fresquero

Fuente: Yeannes (2013)

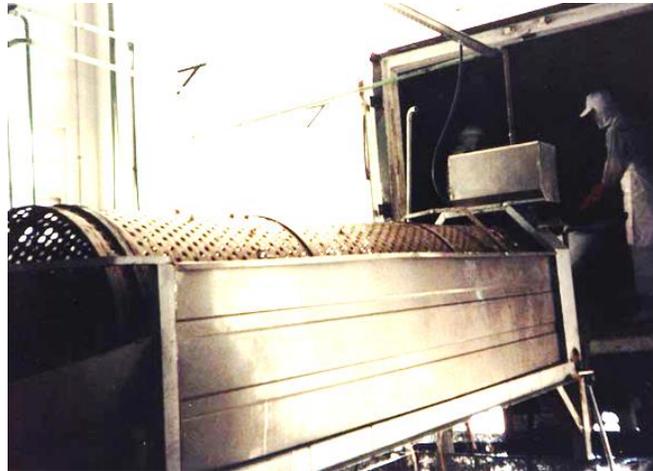
La diferencia en la captura puede significar una diferencia en cuanto a la inocuidad. La captura en el fresquero es más segura que en el costero, desde ese punto de vista y significa tener más cuidada la materia prima, en cuyo caso la histamina se formaría por la contaminación de halófilas de la sal si luego de la captura no se mantiene la cadena de frío. Por otro lado, la flota costera regresa rápidamente a puerto elaborándose en forma inmediata y manteniendo mejor característica textural, siendo por ello preferida por los empresarios que elaboran este producto siguiendo los pasos tradicionales (Yeannes, 2006).

#### **1.1.4.2. Recepción de la materia prima**

La anchoíta, transportados en camiones térmicos, se recibe en las instalaciones de la fábrica procesadora en cajones de 40 kg, los que comienzan a procesarse por lo general en forma inmediata (Barañano, 2013; Yeannes, 2006).

#### **1.1.4.3. Lavado y descamado**

Una vez en la planta, la anchoíta ingresa mediante una tolva a la maquina lavadora y descamadora. El diseño de la misma permite el descamado, ingreso a la planta procesadora y lavado (Fig. 1.10). Esta máquina está compuesta por un tambor cribado rotatorio que colabora en el descamado. Dentro del tambor hay un helicoide con corrientes de agua que direcciona la anchoíta en el sentido de ingreso a la planta. El tambor esta inclinado y los ejemplares se ven forzados a circular de acuerdo al helicoide y con esa inclinación (hacia abajo) y contra las paredes del tambor, se genera la descamación y el lavado (Barañano, 2013; Yeannes, 2006).



**Figura 1.10:** Lavadora de tambor cribado y giratorio.

Fuente: Yeannes (2013)

#### **1.1.4.4. Salado húmedo (deshidratación osmótica)**

La deshidratación osmótica por medio del salado húmedo, también llamado presalado, se lleva a cabo por inmersión de los ejemplares enteros en una solución de NaCl (salmuera) saturada durante períodos variables. Esta etapa tiene como objetivo una rápida penetración de sal que concluye al alcanzar el equilibrio entre la concentración de sal de la salmuera y el músculo de pescado. Según los estudios más recientes, en la deshidratación osmótica de ejemplares enteros de anchoíta parcialmente descamada (salado húmedo en proporción salmuera pescado 1:1), el tiempo para llegar al equilibrio puede variar entre 5,15 y 33,5 horas dependiendo del contenido de lípidos del músculo, tamaño de los ejemplares y temperatura de proceso, siendo que mayor contenido de lípidos y menor temperatura retrasan la penetración de sal (Czerner y Yeannes, 2013).

Cuando se efectúa esta etapa en una planta elaboradora, los períodos varían de 24 hs hasta 10-12 días (Bertolotti y Manca, 1986; Czerner y Yeannes, 2013). Esta etapa se efectúa en piletones de plástico reforzado (Fig. 1.11). Usualmente las empresas utilizan sal en exceso para mantener la salmuera saturada durante esta etapa (Czerner y Yeannes, 2013). Sin embargo, dada la tendencia a consumir alimentos menos salados, algunos elaboradores a solicitud de los compradores utilizan salmuera saturada sin agregado

adicional de sal para llegar en el equilibrio a valores menores de sal en el músculo (Barañano, 2013).



**Figura 1.11:** Etapa de salado húmedo: a) Llenado de piletones y b) Piletones de anchoíta con salmuera en reposo.

Fuente: Yeannes (2013)

En esta etapa, la actividad de agua ( $a_w$ ) del pescado se reduce a un valor entre 0,82- 0,86, dependiendo del tamaño y concentración de salmuera, inactivando la flora deteriorante y/o patógena potencialmente presente en el pescado fresco. Esta etapa se efectúa inmediatamente de recepcionada la materia prima para evitar el deterioro y/o la formación de histamina por acción enzimática de la microbiota típica del pescado (Barañano, 2013; Yeannes, 2006).

Asimismo, durante esta etapa en simultáneo al salado ocurre el desangrado de los ejemplares con la expulsión de agua, así como también se modifica la textura del pescado volviéndose mas rígido debido a la incorporación de sal, facilitando así la etapa de descabezado y eviscerado posterior (Bertolotti y Manca, 1986).

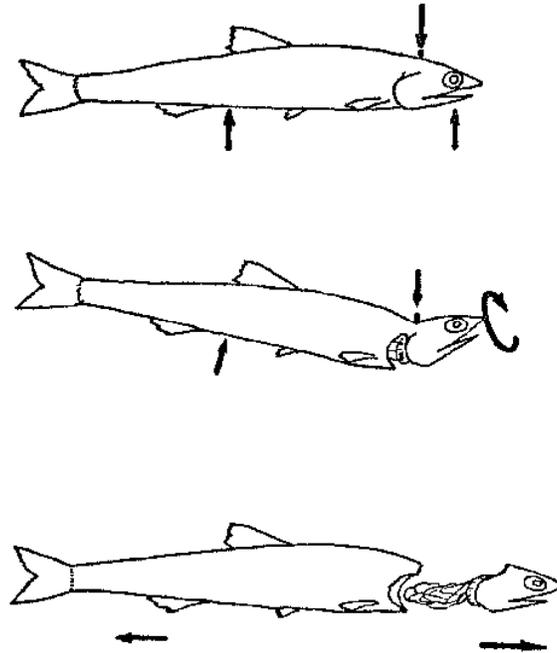
Cabe destacar que la etapa de salado húmedo se suele utilizar como reguladora de flujo de materia prima para las etapas siguientes (Barañano, 2013; Bertolotti y Manca, 1986; Yeannes, 2006). Esto es importante de considerar en cuanto a la calidad final del

producto. Cuando la etapa de salado húmedo se prolonga por varios días -hasta que el mismo pueda ser preparado y ubicado en los tambores-, comienza a darse el proceso de maduración estando aún los ejemplares enteros. De esta forma, la presencia de vísceras genera coloraciones oscuras en el músculo, lo que luego se manifiesta en la coloración de los filetes. Asimismo, considerando el aspecto de inocuidad, al generarse la maduración en presencia de vísceras que cuentan con microorganismos formadores de histamina (altamente relacionado con la familia *Enterobacteriaceae*) y de enzimas altamente proteolíticas, colabora en la formación de la misma (López-Sabater et al, 1996; Nei, 2014; Yeannes, 1995).

Si bien en la generalidad de los saladeros de anchoíta, la sala de salado húmedo no posee controles de temperatura, las mismas presentan amplias dimensiones, techos a grandes alturas y buena circulación, lo que impide la formación de zonas estancas que provoquen aumentos indeseados de la temperatura.

#### **1.1.4.5. Descabezado y eviscerado**

Esta etapa se realiza de forma manual. El procedimiento consiste en aplicar fuerzas paralelas sobre el cuerpo y cabeza manteniéndose fija la unión superior entre ambas partes (Fig. 1.9); en la operación normal ambas fuerzas son provistas por las manos y el punto de apoyo se logra mediante la primer falange del dedo pulgar, lo que permite la ruptura de la columna vertebral a la altura de la cabeza.. Luego se somete la cabeza a un leve movimiento de rotación, lo que permite despegar las vísceras adheridas al cuerpo. Finalmente se realiza un movimiento de tracción separando la cabeza del cuerpo, la que va acompañada por la parte de las vísceras que se encuentran en la cavidad abdominal (Fig. 1.12) (Lupín, 1979). El eviscerado realizado de este modo es parcial, ya que la última parte del saco pilórico y las gónadas quedan en el pescado (Czerner, 2011).



**Figura 1.12:** Secuencia en el corte de la anchoíta

Fuente: Lupín (1979)

Otra modalidad consiste en tomar la cabeza del pescado y efectuar un giro para romper la espina dorsal. Luego se vuelve la cabeza a la posición original y se la separa arrastrando las vísceras. Estos sistemas con variantes se emplean en la mayoría de las plantas elaboradoras (Bertolotti y Manca, 1986).

Para manipular con mayor facilidad el pescado, los ejemplares se cubren de sal entrefina (operación denominada “rebozado”) que además facilita el descamado (Yeannes, 2006).

#### **1.1.4.6. Clasificación por tamaño**

La anchoíta se clasifica según su tamaño/calibre. Esta clasificación se efectúa simultáneamente con el descabezado y eviscerado, ya que una vez obtenida la anchoíta sin cabeza ni vísceras es colocada en diferentes recipientes de acuerdo a la cantidad de piezas por kg de pescado (Tabla 1.2). El precio de comercialización del producto madurado

guarda relación con el tamaño de los ejemplares debido a la diferencia en el rendimiento. El tamaño E se destina generalmente a pasta de anchoíta. Una vez clasificados, los ejemplares se acomodan en los cajones con la cabeza hacia afuera (Figura 1.13) (Barañano, 2013; Czerner, 2011).

**Tabla 1.2.** Clasificación comercial de la anchoíta por tamaño

Calibre	Piezas/kg
A	Hasta 32
B	33 a 35
C	38 a 42
D	47 a 50
E	60 a 65



**Figura 1.13:** Etapa de clasificación por tamaño: a) Ejemplares de anchoíta descabezados y eviscerados clasificados por tamaño y b) Vista general de la zona de descabezado y eviscerado y clasificado por tamaño

Fuente: Yeannes (2013)

#### **1.1.4.7. Enjuague (opcional)**

Previo al acondicionamiento, algunas empresas realizan un enjuague rápido y superficial con salmuera que se realiza para eliminar los resabios que puedan quedar del descabezado eviscerado. Esto tiene que ver con el aspecto en que entrarán luego al tambor las anchoítas. En esta etapa no se producen cambios físico-químicos (Barañano, 2013, Yeannes 2006).

#### **1.1.4.8. Acondicionamiento**

La etapa de acondicionamiento consta de la colocación en los barriles de capas alternadas de pescado y sal entrefina. La proporción de sal que se utiliza es de aproximadamente 0,25 kg por kg de pescado (Czerner y Yeannes, 2011; Yeannes, 2006). La forma en que se acomoda el pescado en esta etapa puede ser a granel, en forma de corona y para “vera carne”.

##### **a) A granel:**

El pescado se mezcla con sal entrefina y se vuelca en piletones o tambores en los que se ha agregado una capa de sal en el fondo (Fig. 1.14). El volcado puede ser manual mediante canastos o bien mecánico por medio de cintas transportadoras que realizan el mezclado del pescado y la sal (Bertolotti y Manca, 1986, Yeannes, 2006).

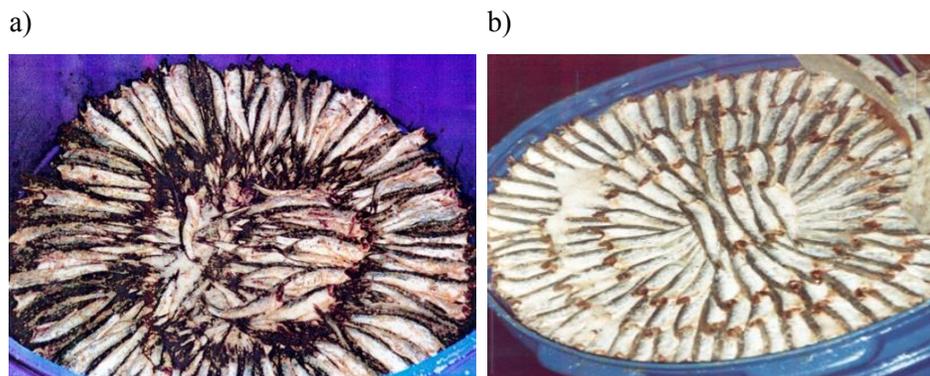


**Figura 1.14:** Acondicionamiento a granel.

Fuente: Yeannes (2013)

b) En forma de corona:

Se toma directamente entre las dos manos una cantidad de ejemplares, “puño”, y se disponen en forma de corona en el interior de tambores de 200/240 kg (Fig. 1.15), recipiente en el cual se exporta antes de completar el proceso de maduración. La sal se distribuye entre capa y capa de pescado (Bertolotti y Manca, 1986).



**Figura 1.15:** Acondicionamiento en forma de corona: a) Corona hecha con tamaño A; b) corona hecha con ejemplares C o D.

Fuente: Yeannes (2013)

c) Vera carne:

Se acondiciona el pescado con un mínimo de sal en latas de 5 o 10 kg. Se dispone los lomos hacia arriba y la sal se coloca entre capas de pescado (Fig. 1.16). Se

selecciona para este tipo de producto el pescado de mayor tamaño y preferentemente con huevas (Bertolotti y Manca, 1986).



**Figura 1.16:** Acondicionamiento “vera carne”

Fuente: Czerner (2011)

El proceso de acondicionamiento se completa con la colocación de una capa de sal y tapas prensas sobre el pescado (Fig. 1.17).

a)



b)



**Figura 1.17:** Tapas de barriles: a) tapa tradicional de madera y b) “tapas prensa” actuales de plástico.

Fuente: Yeannes (2013)

La prensa se realiza colocando bloques de hormigón (25 kg/bloque) sobre la tapa lo que contribuye a eliminar parte de la grasa, a acelerar la salida del agua y a desalojar el aire ocluido. En el caso del uso de la tapa de madera, la misma posee un diámetro unos

centímetros inferior al diámetro del tambor a fin de servir de sustento a la prensa, pero no impedir la salida del exudado de agua y lípidos del tambor durante el prensado y maduración. El uso de las tapas de madera no es aconsejable desde el punto de vista sanitario, dado que la porosidad de la misma genera el ámbito propicio para la multiplicación microbiana. Por esta razón las mismas son esterilizadas al terminar la temporada de zafra. Se realizaron varios intentos de reemplazarlas siendo estos fallidos, hasta que hace unos años atrás se llegó al diseño de las llamadas “tapas prensa” fabricadas en plástico reforzado que permiten ser llenadas de cemento (Yeannes, 2013).

Luego de varios días dependiendo de la calidad de la materia prima, sin que se excedan los 10 días, el nivel del recipiente desciende a un tercio de su altura por efecto de la pérdida de agua y grasa. Una práctica que se utilizaba para completar el barril era colocar nuevas capas de pescado y sal, pero esta operación generaba cambios en la homogeneidad del producto disminuyendo su calidad. Debido a esto actualmente se colocan “cuellos” (cilíndricos de acero inoxidable o teflón) cuya altura corresponde al tercio de la altura del tambor, en la parte superior del mismo y se completa con pescado, de modo que al perder agua y grasa por efecto del prensado se llega al nivel superior del tambor, quedando el mismo completo, resultando homogénea la calidad del producto (Barañano, 2013; Yeannes, 2013).

En la Fig. 1.18 se pueden observar barriles con anchoíta acondicionada donde se utilizan los “cuellos” de teflón y los bloques de hormigón que contribuyen a la prensa. Así, el pescado queda cubierto siempre por la salmuera saturada formada por la sal y el agua que ha perdido el pescado. Esta salmuera es renovada periódicamente para eliminar la grasa e impedir la contaminación microbiana (Barañano, 2013; Bertolotti y Manca, 1986; Yeannes, 2006 y 2013).



**Figura 1.18:** Barriles con anchoíta acondicionada para la maduración: tapa de madera, cuello de teflón y prensa con bloques de hormigón.

Fuente: Yeannes (2013)

#### **1.1.4.9. Maduración**

El proceso de maduración de la anchoíta es relativamente lento, requiriendo varios meses para generar los cambios que modifican sus características sensoriales. La maduración es un proceso complejo que involucra modificaciones físico químicas (proteólisis, lipólisis, aumento del NBV-T, disminución del pH) y microbiológicas y enzimáticas (actividad de enzimas microbianas y propias del músculo) (Czerner, 2011; Yeannes, 2006 y 2013; Yeannes, 2013). Se requiere de un período mínimo de 5 meses para cumplir con lo establecido por el Código Alimentario Argentino (Capítulo VI, Art. 463). Sin embargo, en la práctica este período suele ser mayor y varía de acuerdo al contenido de lípidos de la materia prima y temperatura de la sala de maduración (Yeannes, 2006 y 2013).

Con respecto a la sala de maduración (Fig. 1.19), pueden encontrarse plantas que llevan a cabo la maduración en ambientes climatizados con control automático de la temperatura, otras que logran mantener la temperatura aproximadamente constante mediante sistemas de aislamiento térmico edilicio y también aquellas que no poseen un control específico de esta variable (Czerner, 2011).

a)



b)

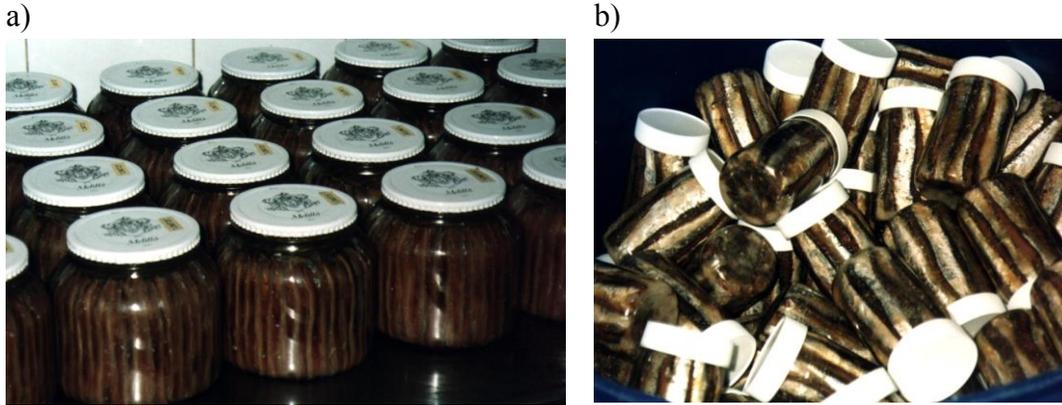


**Figura 1.19:** Vista de salas de maduración con aislación térmica: a) Maduración en barriles y b) Maduración a la “vera carne”

Fuente: Yeannes (2013)

#### **1.1.4.10. Elaboración de filetes de anchoíta**

A las anchoítas maduradas se les corta la cola y la panza, luego se lavan con salmuera saturada para facilitar la separación de los filetes, operación que se efectúa en forma manual. Para los filetes en aceite el líquido en exceso se elimina por prensado manual o mediante centrífuga. El filete se envasa en frascos de vidrio de diversos tamaños, utilizando aceite de girasol o soja (líquido de cobertura) (Fig. 1.20). Algunos productores envasan los filetes con la piel hacia la parte exterior del envase (Fig. 1.20b) (Barañano, 2013; Bertolotti y Manca, 1986).



**Figura 1.20:** Filetes de anchoíta en diferentes presentaciones: a) Piel hacia la parte interior del envase b) Piel hacia la parte exterior del envase

Fuente: Yeannes (2013)

Para elaborar los filetes de anchoíta sin piel, se realiza la eliminación de la piel en baños sucesivos en salmuera a diferentes temperaturas. Luego del corte de la región ventral (panza) y de la cola se separan los filetes como en el proceso descrito anteriormente, y se utiliza como líquido de cobertura aceite de girasol u oliva (Bertolotti y Manca, 1986).

### 1.1.5. Desarrollo de la maduración

Los cambios ocurridos durante la maduración de *E. anchoita* han sido estudiados por diversos autores (Czerner et al., 2010; Besteiro et al., 2000; Filsinger et al., 1982 y 1987; Musmeci, 2001), así como también hay disponible literatura sobre este proceso con la especie *E. encrasicolus* (Campello, 1985; Hernández-Herrero et al., 1999b; Pons Sánchez-Cascado et al., 2005; Triqui y Reineccius, 1995a y 1995b). Existen tres hipótesis relacionadas con los distintos mecanismos implicados en la maduración de las especies pelágicas. La **teoría microbiológica** establece que la microbiota es la responsable de los cambios físico-químicos que ocurren durante la maduración. La **teoría autolítica** atribuye estos cambios a las enzimas musculares y digestivas. Por último, la **teoría enzimática** considera que la maduración se debe una combinación de las dos anteriores, es decir, que tiene lugar tanto la acción microbiana como la actividad enzimática endógena (Besteiro et

al., 2000; Campello, 1985; Czerner et al., 2010; Hernández-Herrero et al., 1999b; Triqui y Reineccius, 1995a y 1995b).

Diversos autores han estudiado la importancia de las enzimas musculares y digestivas en la maduración de pequeños pelágicos. Según estudios realizados por Hernández-Herrero et al. (1999b) para *E. encrasicolus*, la evisceración y limpieza rigurosas llevan a una maduración más lenta y el producto no adquiere el *flavor* característico. En el proceso de elaboración de *E. anchoita* salada-madurada, Czerner et al. (2010) encontraron que la realización de la etapa de salado introduciendo un nuevo tipo de corte, diferente al tradicional, como es el empleo de filetes, lleva a la obtención de un producto madurado de un color totalmente uniforme, sin ningún tipo de manchas, debido a la eliminación ya desde esta etapa de las vísceras. Asimismo, el color desarrollado es más suave, el cual junto con el aroma, el sabor y la textura, resulta agradable para el consumo.

En general, los cambios en los lípidos durante el procesamiento, como la lipólisis y la oxidación de lípidos en el músculo del pescado, están asociados con deterioro de la calidad. Filsinger et al. (1982) en *E. anchoita* observaron un incremento en el índice de ésteres y Roldán et al. (1985) en el de ácidos grasos libres, lo cual estaría indicando la ocurrencia de lipólisis. En este sentido, Triqui y Reineccius (1995a y 1995b) han identificado algunos de los volátiles de importancia para el sabor madurado de *E. encrasicolus* y propusieron que estos compuestos probablemente podría ser generado por la actividad lipooxigenasa y la autooxidación de AGPI. Czerner et al. (2010) determinaron que, como resultado de la maduración de la especie *E. anchoita*, rica en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), estos se ven disminuidos, siendo los ácidos grasos n-3 los más afectados, mientras que los ácidos grasos saturados son los más estables en el proceso. Como producto de la maduración, sucede un aumento del contenido de ácidos grasos libres. Hernández-Herrero et al. (1999b) reportaron que, durante la maduración de *E. encrasicolus*, aumentan el valor de las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) y el índice de peróxido. Este comportamiento en cuanto al contenido de las sustancias reactivas al TBA fue encontrado también por Czerner et al. (2010) en la maduración de *E. anchoita*.

Por otro lado, el valor de Nitrógeno Básico Volátil Total (NBV-T) establecido como límite máximo tolerable en pescado fresco (exceptuando los peces uricotélicos como cazones, tiburones, etc.) es de 30 mg/100 g de parte comestible, por encima del cual se considera que el pescado no es apto para el consumo humano (Código Alimentario Argentino, Capítulo VI, Artículo 276). Con el término de NBV-T se incluye las bases nitrogenadas volátiles asociadas al deterioro de los productos pesqueros, entre ellos, trimetilamina (TMA) (producida por el deterioro microbiano), dimetilamina (producida por enzimas autolíticas durante el almacenamiento en congelación), amoníaco (producido por desaminación de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos) (Huss, 1999). Sin embargo, en algunos productos pesqueros procesados, como es el caso de la anchoíta salada-madurada, el valor de NBV-T aumenta durante su procesamiento (Filsinger et al., 1984; Lupín y Trucco, 1978). Un comportamiento similar se ha observado durante la maduración de *E. encrasicholus* (Hernández-Herrero et al., 1999a; Pons-Sánchez-Cascado et al., 2005). En este sentido, Czerner y Yeannes (2014) hallaron bacterias halófilas, flora normal de estos productos, degradadoras del Óxido de trimetilamina (OTMA) que lo transforman a trimetilamina (TMA) durante la maduración de *E. anchoita*. Por lo tanto el NBV-T aumenta, pero no indicando deterioro, sino como algo normal dentro del proceso, dado que estas halófilas forman parte y son necesarias para el mismo. Esto, sumado al aumento de ácidos grasos libres, se transforma en el aroma típico de estos productos. Asimismo, se ha observado que durante la maduración se produce pérdida en el contenido de proteínas, incremento en el contenido de Nitrógeno no proteico (NNP) y en el contenido de aminoácidos libres (Durand, 1981; Filsinger et al., 1978; Hernández-Herrero et al., 1999a y 1999b, Besteiro et al., 2000b).

#### **1.1.6. Caracterización sensorial del producto salado-madurado**

Las características sensoriales típicas de la anchoíta salada-madurada se desarrollan a lo largo del proceso. Para describir al producto en su punto óptimo de maduración, los atributos considerados son el sabor, el aroma, el color de la carne, la adherencia de la carne al espinazo y la textura. Filsinger et al. (1982) desarrollaron una escala para evaluar el

punto óptimo de maduración, en el cual la anchoíta debe presentar un color rosado uniforme; sabor ajamonado; aroma agradable, a ésteres volátiles, característico; consistencia firme y resistente al tacto, no elástica y baja adherencia de la carne al espinazo. Asimismo, Filsinger et al. (1987) desarrollaron una escala de estos atributos para evaluar la calidad sensorial del producto madurado. En ella, se consideran las características que puede exhibir un producto sobremadurado o con fallas: sabor rancio, off-flavors; color del filete rojo oscuro, con puntos rojo oscuro o negros; color más intenso en la zona del espinazo; aroma rancio, ácido, amoniacal o sulfuroso; filete que presenta humedad al tacto, de consistencia desmenuzable que se rompe durante el fileteado o muy adherido al espinazo. Posteriormente, Musmesci (2001) encontraron que los atributos evaluados por Filsinger et al. (1982) pueden ir avanzando independientemente, por ejemplo, que la anchoíta presente un color rosado uniforme pero que aún la adherencia de la carne al espinazo no permita separar un filete entero, por ello actualmente se pondera la puntuación de los atributos al utilizar las escalas en las plantas elaboradoras (Barañano, 2013).

### **1.1.7. Deterioro y pérdida de inocuidad de anchoíta fresca y salada-madurada**

En anchoíta fresca y salada-madurada se pueden generar pérdidas provocadas por problemas de deterioro o por pérdida de inocuidad. Desde el punto de vista del deterioro, en el pescado fresco ocurren dos tipos: autolítico y microbiano. Los cambios enzimáticos (autolíticos) no guardan relación con los cambios de la calidad microbiológica. En algunas especies, los cambios enzimáticos preceden y por lo tanto predominan al deterioro del pescado refrigerado. En otros la autólisis, sumada al proceso microbiano, contribuye en diferentes grados a la pérdida general de la calidad (Huss, 1999). En los productos salados se genera un ambiente hipersalino, promoviendo que los microorganismos halófilos y halotolerantes jueguen un papel preponderante en los mismos, que puede ser tanto beneficioso como perjudicial según las características de las especies y los recuentos en que se hallen (Félix et al., 2007; Gram y Huss, 1996; Huss y Valdimarsson, 1990; Ramírez et al., 2012). En cuanto a la pérdida de inocuidad, el peligro potencial con mayor probabilidad de ocurrencia en estos productos es la presencia de histamina y/u otras posibles aminas

biógenas, productos de la degradación de aminoácidos libres y proteínas del pescado (Gram y Huss, 1996; Yeannes, 2006).

#### **1.1.7.1. Deterioro autolítico y microbiano del pescado fresco**

Los cambios autolíticos pueden involucrar la acción de enzimas proteolíticas, la cual se evidencia cuando el deterioro es avanzado. Muchas proteasas han sido aisladas del músculo de pescado y el efecto de la descomposición proteolítica está generalmente relacionado con un extenso ablandamiento del tejido. Por ejemplo la proteólisis autolítica puede relacionarse con la incidencia del vientre desgarrado (estallido ventral) en especies pelágicas. Este tipo de ablandamiento del tejido es más predominante cuando los pelágicos se alimentan abundantemente. Los péptidos de bajo peso molecular y los aminoácidos libres producidos por la autólisis de las proteínas no sólo disminuyen la aceptación comercial de los pelágicos. También se ha demostrado que la autólisis acelera el crecimiento de las bacterias del deterioro, proporcionando un medio de crecimiento superior para este tipo de organismos. La inducción del deterioro bacteriano -por autólisis- también ocasiona la descarboxilación de aminoácidos, produciendo aminas biógenas y disminuyendo significativamente el valor nutritivo del pescado (Huss, 1999).

Aun así, la actividad microbiana es el principal factor que limita la durabilidad del pescado fresco. Los microorganismos se encuentran en todas las superficies externas (piel y branquias) y en los intestinos de los peces vivos y recién capturados. El número total de microorganismos varía en un rango normal entre  $10^2$  -  $10^7$  UFC (unidades formadoras de colonias)/cm<sup>2</sup> en la superficie de la piel. Las branquias e intestinos contienen entre  $10^3$  y  $10^9$  UFC/g. La microbiota en pescados recién capturados depende más del medio ambiente de captura, que de la especie. Los pescados capturados en aguas muy frías y limpias contienen menor recuento de microorganismos, mientras que el pescado capturado en aguas cálidas presenta recuentos ligeramente superiores. En aguas muy contaminadas se pueden encontrar valores superiores a  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> en pescados capturados (Huss, 1999; Mossel et al., 2003).

Se puede encontrar una amplia variedad de especies de bacterias en la superficie de los peces, principalmente las clasificadas como psicrotróficas y psicrófilas de acuerdo al rango de su temperatura de crecimiento. Las psicrotróficas (tolerantes al frío) son bacterias capaces de crecer a 0°C con su óptimo es alrededor de los 25°C. Las psicrófilas (amantes del frío) son bacterias con una temperatura máxima de crecimiento alrededor de los 20°C y su óptimo a 15°C (ICMSF, 1981 y 1983). En las aguas cálidas pueden aislarse un mayor número de mesófilos (Huss, 1999).

La microbiota en peces de aguas templadas está dominada por bacterias psicrófilas Gram negativas con forma de bastones, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Shewanella* y *Flavobacterium*. Miembros de las Vibrionáceas (*Vibrio* y *Photobacterium*) y Aeromonadáceas (*Aeromonas* spp.) son también bacterias acuáticas comunes y típicas de la flora bacteriana en pescado. Organismos Gram positivos como *Bacillus*, *Micrococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y coryneformes también pueden ser encontrados en distintas proporciones. La microbiota en especies de peces tropicales es muy similar a la flora en especies templadas (Hozbor et al., 2006; Huss, 1999; Pons-Sánchez-Cascado, 2005).

#### **1.1.7.2. Microorganismos halófilos: generalidades e influencia en el proceso**

Los ambientes hipersalinos, son en general medios inhóspitos para los seres vivos. Sin embargo, los microorganismos halófilos moderados y extremos han desarrollado mecanismos para acumular en su citoplasma una sustancia capaz de regular su turgencia interna sin producir inhibición del metabolismo celular (Meseguer Soria, 2004). Existen diferentes clasificaciones de los microorganismos en función del rango de salinidad en el cual pueden desarrollarse, González-Hernández y Peña (2002) establecieron que los halófilos débiles pueden crecer con 2-5% de NaCl, mientras que los denominados halófilos moderados lo hacen entre 5-20% de NaCl, y que los halófilos extremos se desarrollan con 20-30% de NaCl. También es posible clasificar bacterias como halotolerantes, como es el caso de bacterias capaces de crecer en ausencia de sal, así como en presencia de

concentraciones de sal relativamente altas (Ventosa et al., 1998). Por ello, en el proceso de salado-madurado de anchoíta son de particular interés los microorganismos moderados y extremos por estar adaptados a las condiciones hipersalinas, dentro de los cuales las bacterias y las arqueas constituyen la microbiota de mayor importancia (Félix et al., 2007; Ramírez et al., 2012; Yeannes, 2006).

Tradicionalmente se utilizaba el término Bacteria para abarcar todos los microorganismos unicelulares procariotas. Sin embargo, la filogenia molecular ha demostrado que los microorganismos procariotas se dividen en dos dominios, *Bacteria* y *Archaea*, que evolucionaron independientemente. Estos dos dominios, junto con el dominio *Eukarya* que incluye las formas de vida más complejas (protistas, animales, hongos y plantas), constituyen la base del sistema de tres dominios, que actualmente es el sistema de clasificación más ampliamente utilizado en bacteriología (Di Salvo, 2013; Meseguer Soria, 2004). Cabe destacar que dependiendo de la concentración de sal, la abundancia de los microorganismos varía considerablemente. Los microorganismos eucariotas son minoritarios cuando el contenido de sal supera el 5%. Las arqueas son los microorganismos dominantes en ambientes con salinidad extrema, mientras que las bacterias van aumentando a medida que la concentración de sal es más bien moderada, siendo dominantes cuando la concentración es inferior al 10% (Meseguer Soria, 2004).

Las arqueas y bacterias tienen rasgos en común, siendo el principal la arquitectura celular dado que son células procariotas con un único cromosoma carente de membrana nuclear. Sin embargo, se diferencian por la pared celular, dado que las arqueas carecen de peptidoglicano, así como muestra mayor proximidad filogenética con los eucariotas. Lo que resulta más llamativo de las haloarqueas es su capacidad para vivir en las condiciones extremas de los ambientes hipersalinos y bajo una intensa radiación solar, y su viabilidad está condicionada a una concentración salina mínima, por debajo de la cual las células se lisan. Las haloarqueas poseen en su membrana celular pigmentos carotenoides que les proporciona protección frente a la fuerte irradiación solar, que al ser cultivadas dan colonias de diversas tonalidad rojizas, rosas o anaranjadas, dependiendo de las especies y condiciones de cultivo (Sehgal y Gibbons, 1960; Meseguer Soria, 2004). Además algunas

haloarqueas producen otros pigmentos, “retinal proteins”, entre los cuales se destaca la bacteriorrodopsina y la halorrodopsina que permiten al microorganismo utilizar la luz para distintos procesos bioenergéticos (Meseguer Soria, 2004). Otra característica de estos microorganismos es la producción de halocinas (equivalentes a las bacteriocinas producidas por bacterias) que poseen actividad antibiótica frente a otras haloarqueas así como también se han descrito interacciones antagónicas entre distintos dominios (Atanasova et al., 2013; Meseguer Soria, 2004).

Desde el punto de vista del proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada, se presentan diversos aspectos a considerar por la influencia que ejercen los microorganismos especialmente en la maduración. Son de especial interés características microbianas como pueden ser la producción de enzimas proteolíticas, lipolíticas o la actividad de enzimas descarboxilasas, así como también la capacidad de los microorganismos de producir sulfuro de hidrógeno o indol. En este sentido, diversos estudios indican que los compuestos derivados de la proteólisis y la lipólisis contribuirían al desarrollo del sabor característico. La proteólisis también contribuye al desarrollo de la textura, mientras que la lipólisis está más relacionada con el aroma. Sin embargo, un exceso de estas actividades podría causar deterioro debido al desarrollo de sabores desagradables (Czerner y Yeannes, 2014). Asimismo en relación con el deterioro, las bacterias halófilas extremas, también conocidas como halófilas rojas, son responsables de la formación de un limo rojizo que se puede encontrar en distintas superficies como ser los productos marinos salados, prensa, barriles, instalaciones. La presencia de halófilos rojos ha sido relacionada con la aparición de aromas desagradables (sulfuro de hidrógeno e indol) relacionados con el deterioro del producto (Czerner y Yeannes, 2014; Huss y Valdimarson, 1990). Por otro lado, la descarboxilación de aminoácidos produce aminas biógenas, siendo la histamina la amina biógena de mayor importancia por su toxicidad. Si bien las aminas biógenas se pueden encontrar en otros alimentos salado-madurados (González Martínez, 2013; Yongmei et al., 2009), sólo el contenido de histamina en pescados se encuentra actualmente regulado (Alonso Díaz, 2013; CE, 2005).

### 1.1.7.3. Pérdida de inocuidad por presencia de histamina

La intoxicación por histamina es la enfermedad transmitida por alimentos de origen marino más común (Dalgaard y Emborg, 2008; Yeannes, 1995). Existe disparidad de criterios respecto a los límites de concentración de histamina que producen intoxicación y no existe coincidencia en los límites sanitarios fijados en los diferentes países. La Comunidad Europea (actualmente Unión Europea) establece que el plan de muestreo para productos de la pesca procedentes de especies de pescados asociados a un alto contenido de histidina (particularmente especies de pescados de las familias siguientes: *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae* y *Scombrosidae*) consta de la toma de 9 muestras, cuyo valor medio no debe superar 100 ppm de histamina, dos de las muestras podrán tener un valor superior a 100 ppm pero inferior a 200 ppm y ninguna podrá tener un valor superior a 200 ppm. Para productos de la pesca sometidos a tratamiento de maduración enzimática en salmuera se establece que pueden contener valores de histamina más elevados, sin superar el doble de los límites mencionados (CE, 2005). Suiza establece el mismo plan de muestreo que la CE (2005) con la diferencia que en salsa de pescado permite hasta 500 ppm. Australia y Nueva Zelanda establecen el límite de 200 ppm en general para pescados y productos de la pesca. Canadá permite valores de hasta 200 ppm para productos fermentados de pescado y 100 ppm en otros pescados y productos de pescado (Alonso Díaz, 2013).

Según Ienistea (1973), el contenido de histamina menor a 50 ppm es considerado normal, entre 50-100 ppm aumentado (provoca desórdenes en sujetos susceptibles), 100-1000 ppm tóxico y mayor a 1000 ppm altamente tóxico.

Cabe destacar que la histamina es estable al calor y no es detectable mediante análisis sensoriales llevados a cabo aún por panelistas entrenados. Excepto por la irradiación gamma, no hay otros métodos disponibles para la degradación de histamina (Kim et al., 2004). Si el contenido de histamina en los alimentos regulados es superior al establecido por la normativa vigente, dichos alimentos son descartados. Pese a la

posibilidad de hallar altos niveles de histamina en diversos alimentos, actualmente solo en productos de la pesca se establece niveles de histamina máximos.

En anchoíta salada-madurada, Ramirez et al. (1994) identificaron presuntivamente las arqueas halotolerantes: *Halococcus* spp., *Haloferax* spp., *Halobacterium* spp., *Haloárcula* spp. Muchas de ellas tienen acción proteolítica, lipolítica y sacarolítica, por lo que su desarrollo genera perjuicio económico, pero además determinaron por primera vez en anchoíta salada-madurada la presencia de bacterias halófilas extremas que pueden descarboxilar la histidina, dando lugar a la formación de histamina. Emborg y Dalgaard (2008) estudiaron la cinética de formación de histamina por bacterias halófilas débiles.

Dado que la maduración implica una proteólisis aumentando el sustrato para la generación de esta amina, este resulta el peligro potencial con mayor probabilidad de ocurrencia. Esta es una intoxicación química causada preponderantemente, pero no en forma exclusiva, por la ingesta de pescados, ya sean de la familia scombridae o no escombroides pero con altos porcentajes de musculo denominado “rojo” que posee entre otros compuestos elevadas concentraciones de histidina libre, precursora de la histamina. En este caso particular el proceso de maduración implica una proteólisis aumentando el sustrato para la generación de estas aminas. Existen dos vías de formación de histamina, siendo la principal la descarboxilación enzimática microbiana, donde la enzima actuante es la histidina descarboxilasa (Yeannes, 1995).

#### **1.1.8. Motilidad quimiotáctica de los microorganismos**

La motilidad microbiana está asociada a la formación de biofilms y acelera los proceso de degradación de compuestos. Si bien es un campo de permanente exploración, los procariotas utilizan para moverse flagelos, poros, estructuras de rotación, citoesqueleto contráctil (Bardy et al., 2003). La quimiotaxis corresponde a un tipo de motilidad de los microorganismos con la particularidad que el desplazamiento neto de los microorganismos no es realizado al azar, sino que sucede a favor o en contra de gradientes de concentración

de sustancias químicas. (Cunliffe y Kertesz, 2006; Marx y Aitken, 2000; Paul et al., 2006). En otros campos de aplicación, las respuestas quimiotácticas de los microorganismos frente a diferentes compuestos químicos han sido ampliamente estudiadas. La importancia de evaluar esta característica se debe a que la quimiotaxis se ha reportado como una ventaja competitiva de las bacterias y arqueas, dado que los microorganismos quimiotácticos poseen sistemas de percepción que les permiten detectar los gradientes de concentración de determinadas sustancias químicas y dirigir su movimiento hacia zonas más favorables y los ayuda a encontrar óptimas condiciones para su crecimiento y supervivencia (Di Salvo, 2013; Herrera Seitz y Studdert, 2008; Paul et al., 2006). La quimiotaxis es una de las propiedades fenotípicas celulares que ha sido propuesta para superar la baja biodisponibilidad de nutrientes y permitir el crecimiento bacteriano (Marx y Aitken, 2000; Cunliffe y Kertesz, 2006). Asimismo, esta propiedad facilita varias interacciones entre los microorganismos y el medio ambiente y contribuye a la estructura de la comunidad microbiana (Chet y Mitchell, 1976). La quimiotaxis se denomina positiva si el movimiento es en dirección hacia la mayor concentración de la sustancia química en cuestión y negativa si es en dirección opuesta (Di Salvo, 2013; Herrera Seitz y Studdert, 2008).

Según el microorganismo, pueden presentarse diferentes movimientos. Uno de los movimientos más estudiados corresponde a los realizados por cepas de *E. coli*, denominado “corridas y tumbos”, haciendo referencia a que en un ambiente uniforme las bacterias nadan y dan tumbos alternadamente (sin dirección neta), pero si detectan un aumento en la concentración de una sustancia atrayente, los tumbos disminuyen y se produce un desplazamiento neto en la dirección favorable (quimiotaxis positiva), mientras que si la concentración de atrayente disminuye o se incrementa la concentración de una sustancia repelente, la frecuencia de tumbos aumenta y también la probabilidad de encontrar la dirección que las aleje del estímulo desfavorable (quimiotaxis negativa). Otros movimientos pueden ser cuando se controla la velocidad de rotación, en otros la frecuencia con la que la rotación se detiene. Otros microorganismos carecen de flagelos pero se desplazan sobre superficies utilizando otros tipos de apéndices o movimientos específicos, o secretando sustancias mucosas, logrando así dirigir su movimiento neto frente a los estímulos ambientales (Herrera Seitz y Studdert, 2008; McBride, 2001; Mignot et al.,

2007). Recientemente se ha descubierto otra forma de motilidad en la cual los microorganismos nadan al envolver sus filamentos flagelares alrededor de sus cuerpos celulares (Kinosita et al., 2017). Aunque puedan presentarse diferencias en los movimientos, el sistema de señalización utilizado es muy similar y comparte proteínas con elevado grado de similitud (Herrera Seitz y Studdert, 2008).

Por lo antedicho, resulta de importancia la posibilidad que los microorganismos presenten respuestas quimiotácticas hacia histamina o hacia su precursor, histidina. Bacilio-Jiménez et al. (2003) observaron que bacterias endofíticas (*Azospirillum* spp. principalmente) mostraron respuesta quimiotáctica hacia aminoácidos presentes en las raíces de plantas de arroz. Sin embargo, según las búsquedas bibliográficas efectuadas, no se conoce la respuesta quimiotáctica hacia el aminoácido histidina ni hacia la amina biógena histamina, ni se ha estudiado la respuesta quimiotáctica de cepas halófilas presentes en el proceso de salado-madurado de anchoíta.

### **1.1.9. Cultivos degradadores de histamina**

Paredi y Yeannes (1987) observaron disminuciones importantes de niveles de histamina en anchoíta salada-madurada, lo que lleva a inferir presencia de microorganismos degradadores de la misma en este producto.

La presencia de enzimas degradadoras de histamina, sea histamina oxidasas o dehidrogenasas han sido reportadas en varios organismos superiores tanto como en microorganismos. La aplicación de cepas starter que posean actividad degradadora de histamina podría ser un camino para la disminución de la cantidad de histamina producida *in situ*. Tapingkae et al. (2010) observaron que *Natrinema gari* (arquea halófila) exhibió capacidad para reducir histamina en estudios *in vitro*. Lee et al. (2016) and Zaman et al. (2014) observaron que *Bacillus polymyxa* y *Staphylococcus carnosus*, respectivamente, redujeron el contenido de histamina en productos fermentados de pescado. Si bien la presencia de cepas degradadoras de histamina es beneficiosa para la inocuidad del proceso,

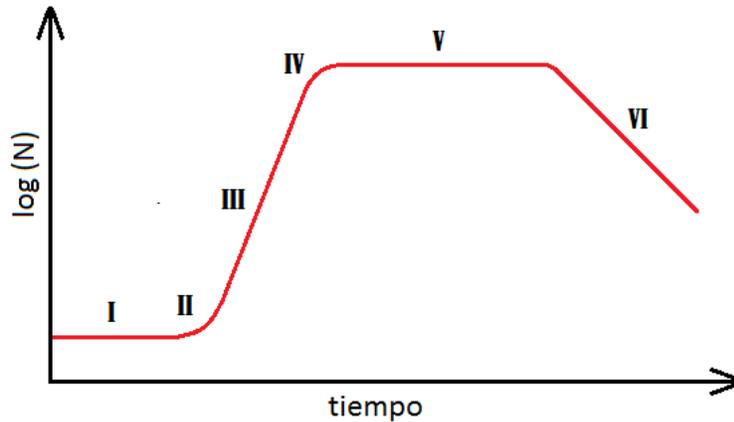
se debe considerar el efecto sobre las características sensoriales del producto que las mismas pueden provocar.

Por otro lado, en general se han desarrollado cultivos puros como iniciadores de procesos de alimentos. Sin embargo, en la naturaleza la mayoría de los microorganismos se encuentran formando parte de comunidades microbianas, en las que se obtienen productos mediante la combinación de vías metabólicas de diferentes microorganismos. Estos cultivos mixtos, de los cuales comúnmente no se conoce qué microorganismos los componen, se pueden diferenciar de los cocultivos, que se forman mezclando microorganismos conocidos y se llevan a cabo en condiciones asépticas (Wacher Rodarte, 2012). Los consorcios microbianos complejos realizan actividades más complejas (versatilidad) y toleran más variación en el ambiente (robustez) en comparación con cultivos puros. Por ello, se espera que en el futuro desarrollo y diversificación de los cultivos iniciadores para los procesos de fermentación de alimentos se implementen consorcios microbianos (Smid y Lacroix, 2013). En el caso particular de procesos de salado-madurado de pescado, se han reportado posibles cultivos puros como posibles iniciadores pero, según las búsquedas bibliográficas realizadas, no hay antecedentes sobre el estudio de cocultivos o cultivos mixtos.

#### **1.1.10. Consideraciones cinéticas del crecimiento microbiano**

La vida útil e inocuidad de los alimentos están determinadas principalmente por la presencia y el desarrollo de microorganismos deteriorantes y patógenos. En este sentido, describir el comportamiento de los microorganismos ante diferentes factores intrínsecos (pH,  $a_w$ , etc.) y extrínsecos (temperatura, atmósfera, etc.) es de suma importancia. Así, los modelos predictivos constituyen un campo prometedor de la microbiología de los alimentos. Los modelos permiten la predicción de la vida útil de los alimentos, la detección de partes críticas de la producción o la distribución u optimización de las mismas (McMeekin et al., 1993).

Para realizar las predicciones es necesario medir y modelar el crecimiento microbiano. A menudo el crecimiento microbiano muestra una fase de latencia o retardo, también llamada fase *lag*, en la cual no se evidencia crecimiento (la velocidad específica de crecimiento es cero). Es el período en el cual los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales. Luego la velocidad se acelera llegando a una velocidad máxima ( $\mu_m$ ) que corresponde a la fase exponencial o logarítmica. En esta fase el tiempo de generación es mínimo y las bacterias consumen a velocidad máxima los nutrientes del medio, ocurriendo un aumento regular de la población que se duplica a intervalos regulares de tiempo. Posteriormente, la velocidad decrece hasta llegar a cero y se mantiene así por un período variable de tiempo. Cuando esto sucede se denomina fase estacionaria, en ella no se incrementa el número de bacterias (ni la masa u otros parámetros del cultivo) dado que la tasa de crecimiento es igual a la tasa de muerte. Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio o porque los productos de desecho que han liberado durante la fase exponencial hacen que el medio sea inhóspito para el crecimiento microbiano. Posteriormente se presenta una fase de declinación o muerte que presenta una velocidad específica de muerte ( $\mu_d$ ). La muerte puede asociarse a la inactivación de la actividad metabólica o puede ser la descomposición real de las células. En esta fase el número de células que mueren es mayor que el número de células que se dividen (Blanch y Clark, 1996; Zwietering et al., 1990). En un cultivo discontinuo, cuando el crecimiento es definido como el logaritmo del número de microorganismos (biomasa) en función del tiempo, este crecimiento resulta en una curva sigmoideal como puede observarse en la Fig. 1.21.



**Figura 1.21:** Representación gráfica de una curva de crecimiento microbiano (N: número de células). I: Fase lag; II: Aceleración; III: Fase Exponencial; IV: Desaceleración; V: Fase estacionaria; VI: Fase de declinación.

La cinética de la variación de biomasa se puede estimar a partir de un balance de biomasa para un reactor discontinuo o *batch* y se expresa de forma general como la Ec. 1.1, haciendo posteriormente en cada fase las consideraciones correspondientes:

$$\frac{dX}{dt} = r_x = \mu X = \underbrace{\mu_g X}_{r_g} - \underbrace{\mu_d X}_{r_d} \quad (1.1)$$

donde  $X$  representa la biomasa (ej: número de células) a tiempo  $t$  y  $t$  es el tiempo transcurrido, por consiguiente  $dX$  corresponde a una pequeña variación en la biomasa que sucede en un intervalo pequeño de tiempo ( $dt$ ),  $\mu$  [1/tiempo] representa un índice de la velocidad de crecimiento denominado velocidad específica de crecimiento (velocidad de crecimiento por unidad de biomasa), que puede discriminarse en lo que refiere a multiplicación ( $\mu_g$ ) y muerte celular ( $\mu_d$ ). La velocidad neta de crecimiento es  $r_x$ , mientras que  $r_g$  y  $r_d$  son la velocidades de multiplicación y de muerte, respectivamente.

Monod (1949 y 1950) estudió el efecto de la composición de un medio de cultivo libre de sustancias inhibitorias sobre la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ). La ecuación de Monod describe la relación entre  $\mu$  y la concentración del sustrato limitante ( $S$ )

en un cultivo microbiano. La ecuación propuesta por Monod (Ec. 1.2) es similar a la propuesta por Michaelis-Menten para reacciones enzimáticas, basado en que las reacciones que tienen lugar en el interior del microorganismo son enzimáticas.

$$\mu = \mu_m \frac{S}{k_S + S} \quad (1.2)$$

donde  $\mu_m$  (máxima velocidad específica de crecimiento) es la velocidad máxima de multiplicación que puede alcanzar el microorganismo en las condiciones en las que está creciendo y  $k_S$  (constante de saturación) es la concentración de sustrato para la cual la velocidad específica de crecimiento es la mitad del valor máximo. La constante  $k_S$  disminuye a mayor afinidad de los microorganismos por el sustrato limitante. Cuando la concentración de sustrato limitante ( $S$ ) es mucho mayor que la constante de saturación ( $k_S$ ), la velocidad específica alcanza su valor máximo ( $\mu = \mu_m$ ). Normalmente  $k_S$  tiene valores muy pequeños ( $\sim 10^{-2}$ - $10^{-3}$  g/L) para sustratos fácilmente metabolizables por lo que a concentraciones relativamente pequeñas de sustrato limitante ( $S$ ) son suficientes para que  $\mu = \mu_m$ .

Desde un enfoque cinético, la velocidad específica de crecimiento es máxima ( $\mu = \mu_m$ ) en la fase exponencial y la muerte celular se considera despreciable dado que  $\mu_g \gg \mu_d$ , así como en la fase de muerte  $\mu_d \gg \mu_g$  (Tabla 1.2, Ec. 1.3 y 1., respectivamente). Integrando durante el tiempo de cultivo se obtienen las ecuaciones que caracterizan dichas etapas (Tabla 1.2). Para la biomasa se obtienen funciones exponenciales (Ec. 1.4 y 1.8) que usualmente se linealizan (Ec. 1.5, 1.6, 1.9 y 1.8) (Blanch y Clark, 1996).

**Tabla 1.3:** Ecuaciones correspondientes a las fases de crecimiento y declinación

Fase Exponencial	Fase de declinación
$\frac{dX}{dt} = r_g = \mu_m X \quad (1.3)$	$\frac{dX}{dt} = r_d = -\mu_d X \quad (1.7)$
$X = X_0 e^{\mu_m t} \quad (1.4)$	$X = X_0 e^{-\mu_d t} \quad (1.8)$
$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu_m t \quad (1.5)$	$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu_d t \quad (1.9)$
ó	ó
$\log(X) = \log(X_0) + \frac{\mu_m}{2,303} t \quad (1.6)$	$\log(X) = \log(X_0) + \frac{\mu_d}{2,303} t \quad (1.10)$

Además de la velocidad específica de crecimiento máxima e inactivación ( $\mu_m$  y  $\mu_d$ , respectivamente), es de interés identificar la fase *lag* y los valores de las asíntotas. Estos parámetros podrían estimarse decidiendo subjetivamente las zonas de la curva que son aproximadamente lineales y en el caso  $\mu_m$  y  $\mu_d$  estimar la pendiente por regresión lineal. Sin embargo, se han desarrollado mejores métodos para estimar estos parámetros a partir de modelos de crecimiento o inactivación a partir de un set completo de datos. Estos métodos corresponden a los denominados modelos primarios que describen la respuesta de microorganismos en función del tiempo, para unas condiciones específicas. Modelos de crecimiento, crecimiento-descenso, inactivación, modelos exponenciales, Gompertz, Logístico, Richards, Von Bertalanffy, Weibull y Baranyi-Roberts son algunos ejemplos de éstos (McKellar et al., 2004; Zwietering et al.; 1990). Los modelos matemáticos pueden ser empíricos o mecanísticos. Los modelos mecanísticos representan los procesos bioquímicos que gobiernan el crecimiento microbiano. Sin embargo, si este mecanismo es desconocido, se utilizan funciones matemáticas que se ajustan a los datos experimentales en base a criterios estadísticos (López et al., 2004). Los procesos fundamentales empleados para medir la respuesta microbiana corresponde a la enumeración microbiana por métodos directos e individuales (microscopía, citometría de flujo, metodología de biología molecular), por métodos directos y masivos (biomasa), por métodos indirectos e individuales (unidades formadoras de colonias), o por métodos indirectos y en bloque (número más probable, turbidez, absorción de nutrientes) (McMeekin et al., 1993).

El modelo de Gompertz (Gibson et al., 1987) y el modelo de Gompertz modificado por Zwietering et al. (1990) son modelos empíricos de los más utilizados para describir el crecimiento microbiano en alimentos (Cardenas et al., 2007, Tomac et al., 2013). El modelo de Gompertz modificado representa una curva sigmoideal asimétrica y es en general más flexible que el modelo logístico (simétrico) (Gibson et al., 1987 y 1988). Los modelos mencionados describen la biomasa y no incluyen el consumo de sustrato como un modelo basado en la ecuación de Monod podría hacer. No obstante, el nivel de sustrato suele no ser de interés en las aplicaciones en alimentos (Zwietering et al.; 1990). A menudo la fase de crecimiento y de muerte se modelan por separado (Huang et al., 2012; Possas et al., 2017; Putnik et al., 2017; Zwietering et al., 1990), sin embargo, hay modelos que hacen un ajuste simultáneo (Chatterjee et al., 2015).

También pueden desarrollarse modelos secundarios que describen la relación entre los parámetros de los modelos primarios y los factores ambientales como la temperatura, el pH, la  $a_w$ , las sustancias preservantes, etc. (Fakruddin et al., 2011). Los modelos terciarios son softwares basados en la combinación de modelos primarios y secundarios que permiten predecir la evolución de los microorganismos en función del tiempo, los factores de procesamiento y las condiciones ambientales (Coll Cárdenas et al., 2001).

#### **1.1.11. Consideraciones cinéticas de la deshidratación osmótica**

En el proceso de salado -realizado tradicionalmente como método de conservación de pescado mediante el cual se reduce la actividad del agua y se otorgan características sensoriales específicas a los productos- la forma de adición de sal difiere según el producto final que se desee obtener. El salado (deshidratación osmótica) de pescado puede realizarse **por vía húmeda**, también denominado presalado o salmuereado, el cual consiste en sumergir el pescado en una solución de agua y sal (salmuera o solución osmótica); **por vía seca**, que se realiza mediante el armado de pilas formadas por capas de pescado y sal alternadas, permitiendo el drenaje del líquido exudado; o **salado mixto**, también denominado piclado, en el cual se apilan capas de pescado y sal alternadas, pero dentro de

un recipiente para que el pescado quede inmerso en la salmuera formada por el líquido exudado y los gránulos de sal. Durante el proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada se ven involucrados el salado por vía húmeda y el salado mixto. Este último es el que ocurre en los tambores durante la maduración (Yeannes, 2013).

El sistema alimento-salmuera se considera multicomponente y polifásico. Las fases presentes son la salmuera (solución osmótica), la matriz sólida del producto, la fase líquida interna (intra y extracelular) y la fase gaseosa atrapada en la estructura porosa (Barat, 1998; Ochoa-Martínez y Ayala-Aponte, 2005). Respecto a la termodinámica, en general, el sistema se encuentra muy alejado del equilibrio, lo que provoca espontáneamente los fenómenos de transporte. La difusión de sal está relacionada con el cambio entre la concentración de sal en el interior del alimento y la de la solución de salmuera externa, donde las tasas de transferencia de masa no cesan hasta que se alcanza el equilibrio. El equilibrio es el final del proceso de difusión, es decir, cuando la tasa neta de transferencia de masa es cero. La velocidad de difusión necesaria para alcanzar el equilibrio depende del gradiente de concentración (potencial químico) entre la salmuera y el producto (Gómez-Salazar et al., 2015).

Los mecanismos de transferencia de sal en el sólido son aspectos muy interesantes a considerar. Los modelos matemáticos son la mejor manera de conocer los factores controlantes en estos procesos. Éstos representan y explican los datos observados y predicen el comportamiento bajo diferentes condiciones. Los modelos teóricos se desarrollan utilizando los principios de la química, la física y la biología, y derivan de balances de masa y energía. Entre los modelos teóricos que se han aplicado a la transferencia de masa, los difusivos son los más utilizados. La difusión es el mecanismo de transporte predominante involucrado en el salado. Es un fenómeno espontáneo de transferencia de masa causado por el movimiento aleatorio de las moléculas bajo un gradiente de concentración. Con el propósito de modelar la difusión en procesos de salado, comúnmente se considera la difusión de agua y la difusión de sal por separado (Czerner Yeannes, 2013; Gómez-Salazar et al., 2015; Gravier et al., 2009; Nguyen et al., 2010).

La ecuación clave que describe la difusión es la segunda ley de Fick (Ec. 1.11) que se basa en la hipótesis que la velocidad de transferencia de una sustancia difusora a través de un área unitaria es proporcional al gradiente de concentración medido normalmente en la sección.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad (1.11)$$

La difusividad efectiva es una propiedad que determina la velocidad de propagación de la masa a través del material. Las soluciones analíticas de la ecuación de difusión de Fick para predecir  $D$  para geometrías clásicas se han utilizado ampliamente para diferentes geometrías (placa, cilindro, esfera o paralelepípedo). La solución depende de las condiciones de contorno. El número de condiciones de frontera requeridas está determinado por el orden de los derivados más altos que aparecen en cada variable independiente en las ecuaciones diferenciales gobernantes (Crank, 1975).

La mayoría de los modelos utilizados para describir el proceso de salado son los difusionales, basados en la segunda ley de Fick, y se afectan principalmente por la permeabilidad de las membranas a los diferentes componentes. La precisión predictiva es difícil cuando se usan modelos matemáticos rigurosos debido a la alta complejidad del sistema, lo que hace que la precisión dependa de la determinación apropiada de las condiciones de equilibrio y de parámetros como la difusividad (Gómez-Salazar et al., 2015; Ochoa-Martínez y Ayala-Aponte, 2005).

También es posible encontrar modelos empíricos, siendo algunos ejemplos los modelos de Azuara, Weibull, Peleg y Zugarramurdi y Lupín (Azuara et al., 1992; Corzo y Bracho, 2008; Peleg, 1988; Zugarramurdi y Lupín; 1977 y 1980). Si bien la información obtenida bajo esquemas empíricos o semiempíricos es válida solamente para reproducir condiciones semejantes a las del trabajo del cual se obtuvieron (no son extrapolables más allá del rango experimental) (Ochoa-Martínez y Ayala-Aponte, 2005), estos modelos son ampliamente utilizados (Assis et al., 2016; Arballo et al., 2011; Corzo et al., 2012; Czerner y Yeannes, 2013; Schmidt et al., 2009). El nivel de complejidad que se necesita en un

modelo depende del objetivo que se desea alcanzar. En general, cuanto más fácil es el modelo, más fácil es su solución. Sin embargo, se debe garantizar una buena descripción de los resultados experimentales. Por esta razón, el modelo que se utilizará será analizado en cada caso (Gómez-Salazar et al., 2015).

Para obtener productos de alta calidad es esencial llevar a cabo un control exhaustivo del proceso de salado. Esto implica una buena distribución de la sal en el producto y una estimación del tiempo de salado. Para controlar ambos aspectos, es importante conocer los principales factores que rigen la penetración de la sal. En general, se generan dos flujos simultáneos principales durante los procesos de salado, la pérdida de agua y la absorción de sal. Los iones de sal se difunden a través de la fase acuosa del producto, que se distribuye por medio de una compleja red de canales microscópicos dentro de la matriz de materia seca. Al mismo tiempo, la fase líquida del producto no permanece constante cuando la sal se disuelve en él. Las moléculas de agua migran fuera del producto, lo que causa resistencia a la difusión (Andrés y Ruíz, 2001; Gómez-Salazar et al., 2015).

Los fenómenos de transporte implicados en la transferencia de sal y agua son complejos y dependen de aspectos como la concentración de salmuera, la temperatura, el pH, el contenido de lípidos del pescado, el tamaño de los ejemplares, el estado de *rigor mortis* o el congelado previo al salado, entre otras cosas (Birkeland et al., 2005; Czerner y Yeannes, 2013; Gallart-Jornet et al., 2007; Gómez-Salazar et al., 2015; Gravier et al., 2006; Lauritzsen et al., 2004). En cuanto a la vía de salado (húmeda o seca), Barat et al. (2003) no encontraron diferencias significativas entre estos dos procesos en términos de parámetros fisicoquímicos y sensoriales, pero señalaron que el salado por vía seca es más favorable a la deshidratación, mientras que el salado por vía húmeda favorece la entrada de sal. Sin embargo, el salado húmedo tiene varias ventajas sobre la salazón seca, incluyendo tiempos de procesamiento más cortos debido a una mayor absorción de sal y mayores rendimientos de peso debido a un mejor control sobre la tasa de absorción de sal y la pérdida de agua en el músculo (Andrés et al., 2005; Beraquet et al., 1983).

## 1.2. Objetivos

En virtud de lo expuesto, los objetivos del presente trabajo de Tesis Doctoral se detallan a continuación:

### 1.2.1. Objetivo General

El objetivo de esta tesis consiste en obtener mayor información del ecosistema microbiano y sus actividades durante el proceso de salado y madurado de la *Engraulis anchoíta*, así como también investigar la posibilidad de la implementación de cepas autóctonas como iniciadores en el proceso a fin de mantener bajos niveles de histamina.

### 1.2.2. Objetivos Particulares

- 1) Investigar la influencia de la microbiota autóctona del pescado y no autóctona durante el proceso de salado-madurado de *E. anchoíta*
- 2) Evaluar y modelar la dinámica de la microbiota en simultáneo a la transferencia de masa (agua y sal) y disminución de la actividad de agua que sucede durante la etapa de salado húmedo (tradicional, en fábrica).
- 3) Caracterizar fenotípicamente la microbiota halófila que actúa en el proceso de salado-madurado de *E. anchoíta* a fin de analizar su contribución en el proceso.
- 4) Analizar las bacterias y arqueas halófilas en cuanto a las posibles respuestas quimiotácticas hacia histidina y/o histamina.
- 5) Seleccionar bacterias y/o arqueas halófilas con capacidad para degradar histamina y evaluar el posible efecto sobre las características sensoriales del producto que la inoculación de las cepas degradadoras de histamina podría provocar.
- 6) Identificar por técnicas moleculares las cepas halófilas aisladas del proceso de salado-madurado de anchoíta.

- 7) Analizar la potencialidad del uso de consorcios microbianos como iniciadores en el proceso de salado-madurado a fin de mantener bajos niveles de histamina.

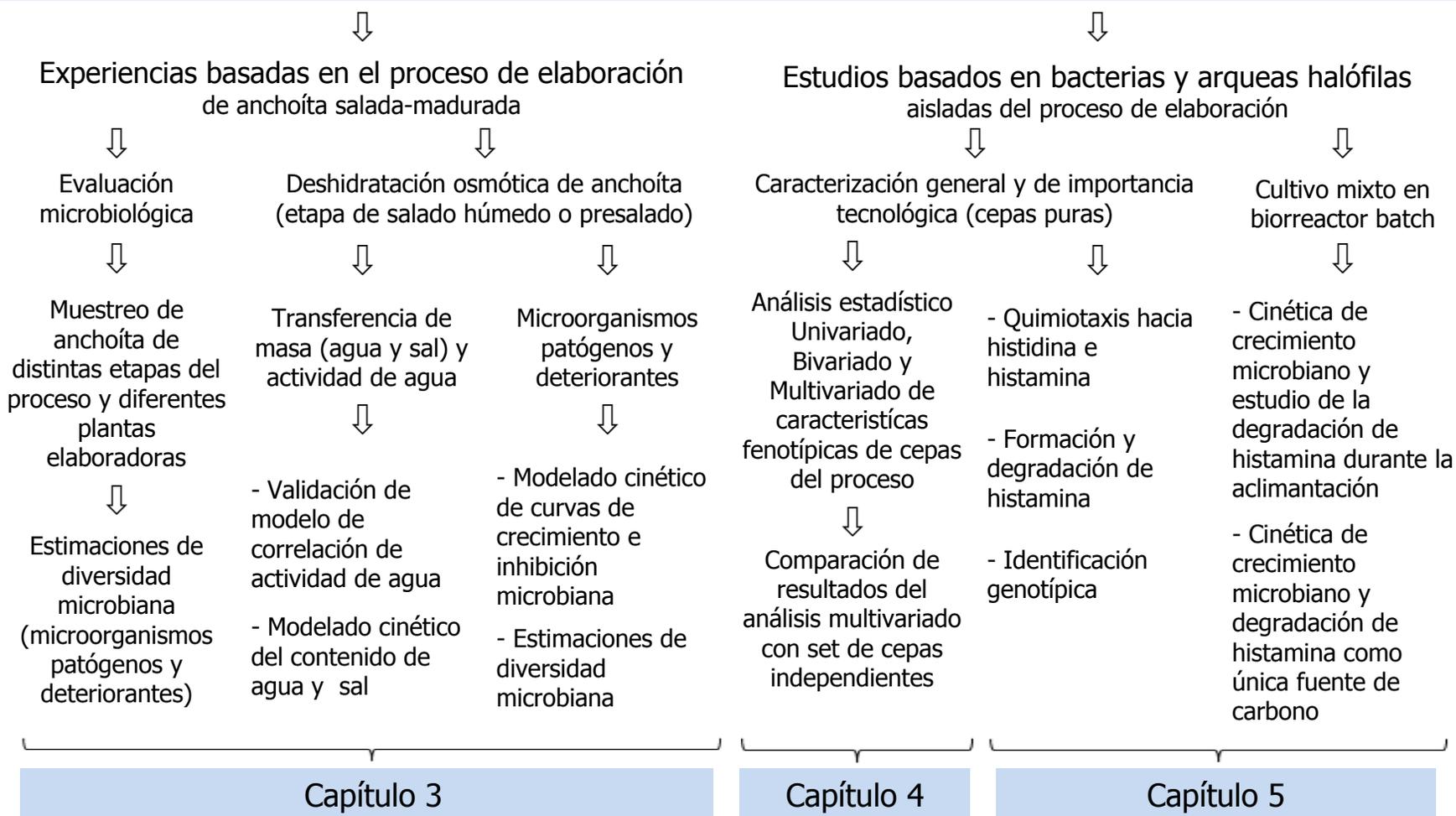
## **CAPÍTULO 2: Materiales y métodos**

---

## **2.1. Diseño de experiencias**

A fin de cumplimentar los objetivos planteados en la presente Tesis la tarea experimental contó con los siguientes abordajes: 1) Estudios basados en el proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada (análisis fisicoquímicos y microbiológicos); 2) Estudios basados en bacterias y arqueas halófilas autóctonas del proceso de salado-madurado de anchoíta. La distribución de las experiencias realizadas y los análisis de datos efectuados, así como también la organización de los Capítulos, se pueden observar en el esquema presentado en la Fig. 2.1.

## Proceso de salado-madurado de anchoíta



**Figura 2.1:** Esquema descriptivo de las experiencias llevadas a cabo en la presente Tesis.

Los estudios basados en el proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada incluyen:

- Experiencia I: Investigación llevada a cabo por muestreo de anchoíta en las distintas etapas del proceso proveniente de diversos saladeros de la ciudad de Mar del Plata a fin de hacer un análisis integral de la microbiota y la efectividad del proceso.
- Experiencia II: Experiencia de deshidratación osmótica por vía húmeda (también llamada salado húmedo o presalado), siguiendo la metodología de la elaboración tradicional de anchoíta salada-madurada, donde se efectuaron investigaciones y seguimientos de parámetros físico-químicos y microbiológicos a fin de ampliar los conocimientos sobre los cambios que se llevan a cabo durante esta etapa del proceso. Asimismo, se efectuó el modelado cinético de la transferencia de masa (agua y sal), seguimiento de la actividad de agua y modelado cinético de crecimiento e inhibición microbiana, como así también evaluaciones de diversidad de microorganismos.

Los estudios basados en las bacterias y arqueas halófilas aisladas durante el proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada contienen:

- Experiencia III: Esta experiencia constó de una primera parte de aislamiento y caracterización fenotípica de las cepas halófilas representativas de materias primas (anchoíta y sal) y etapas principales del proceso (salado húmedo y maduración) que se evaluaron mediante diferentes técnicas estadísticas (Análisis Univariado, Bivariado y Multivariado) con el objetivo de analizar la contribución de las cepas en el proceso. En una segunda parte, estos resultados se compararon con un set de cepas independientes provenientes de muestras de filetes de anchoíta salada-madurada en filetes y de anchoíta salada-madurada.
- Experiencia IV: Se realizó la identificación molecular de las bacterias y arqueas, así como también análisis fenotípicos en relación a la presencia de histamina (formación y degradación de histamina y motilidad (quimiotaxis) hacia histamina e histidina) y a la calidad sensorial del producto.
- Experiencia V: Estudio de la capacidad de un cultivo mixto en biorreactor *batch* para degradar histamina, lo que incluye el modelado cinético y las cuantificaciones

de histamina durante la etapa de aclimatación, como así también frente a histamina como única fuente de carbono.

Los capítulos se organizaron en relación a las siguientes temáticas: estudios del proceso de elaboración (Experiencias I y II), evaluación de la contribución de la microbiota halófila al proceso de salado-madurado (Experiencia III) y estudios relacionados con la formación de degradación de histamina por cultivos puros y por un consorcio microbiano y su potencialidad como cultivos *starters* (Experiencias IV y V).

## **2.2. Análisis efectuados a partir de muestras de pescado**

### **2.2.1. Materia prima**

La Experiencia I se llevó a cabo con materia prima obtenida de distintos saladeros de la ciudad de Mar del Plata: anchoíta fresca, anchoíta de la etapa de salado húmedo y anchoíta de la etapa de maduración. Estas muestras se identificaron con la siguiente nomenclatura: Letras A a L (primera letra) corresponde al lote; luego AF, AS y AM corresponden a anchoíta fresca, durante la etapa de salado y durante la etapa de maduración, respectivamente; Números: corresponden al número de muestra; b: branquias, p: piel; i: intestino; m: músculo. Ejemplo: A-AF1/p corresponde al lote A, muestra de anchoíta fresca, ejemplares de muestra 1, piel.

Las muestras de la Experiencia II (deshidratación osmótica por vía húmeda) se obtuvieron en una empresa radicada en el puerto de Mar del Plata dedicada a la elaboración de anchoíta salada-madurada, según el proceso tradicional. Esta empresa no cuenta con barcos propios y obtiene la materia prima de barcos fresqueros con *Engraulis anchoita* del efectivo Bonaerense, capturada cerca de la costa de Mar del Plata, Argentina (38° S, 5° 33' W). Se utilizó sal comercial de grado alimentario proveniente de una salina a cielo abierto localizada en la provincia de Río Negro, Argentina. Los ensayos se realizaron con pescado fresco, el cual fue mantenido en hielo desde la captura (en buques fresqueros de media altura) hasta su procesamiento. En todos los casos se utilizó anchoíta de un tamaño

correspondiente a 33-35 piezas/kg de pescado (calibre “B”). Se seleccionaron al azar 3 ejemplares, los cuales se midieron longitudinalmente y cada 2,5 cm se tomaron medidas de ancho y alto con calibre (Fig. 2.2).

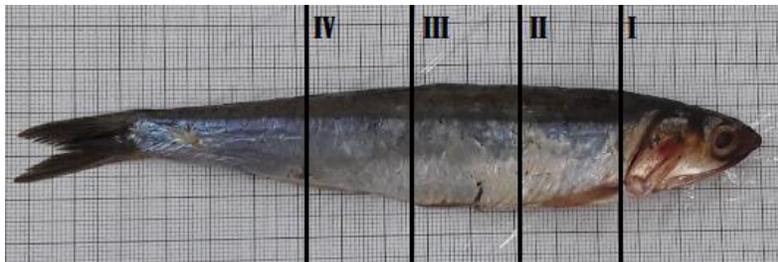
a)



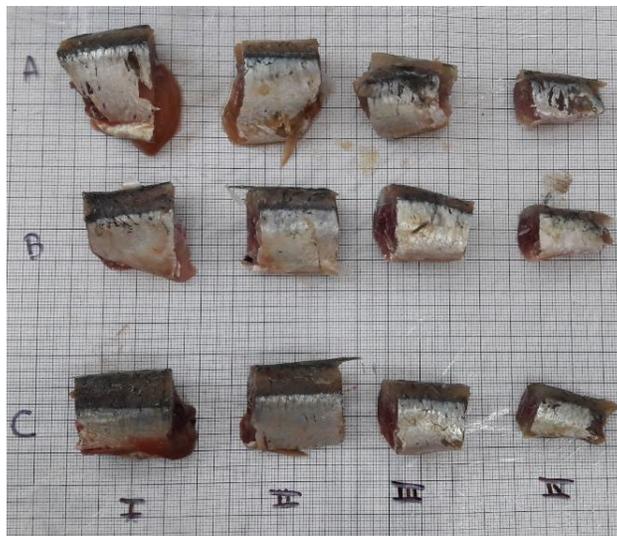
b)



c)



d)



**Figura 2.2:** Ejemplares de *Engraulis anchoita*: (a) vista lateral, (b) vista superior, (c) y (d) diferentes cortes utilizados para caracterizar las medidas de los ejemplares.

### **2.2.2. Experiencias de deshidratación osmótica**

En la Experiencia II correspondiente al salado húmedo (deshidratación osmótica) se respetaron las condiciones de procesamiento a nivel industrial de la planta elaboradora en la cual se llevaron a cabo. Se efectuaron dos experiencias cuya variable fue la temperatura de la sala donde se mantuvieron las bachas durante el salado húmedo.

Se preparó salmuera (25°B) con sal gruesa de grado alimentario (cristales de 5 mm de diámetro), libre de nitratos y nitritos (CAA, Capítulo 6, Art. 461) y agua potable. Se utilizó pescado entero con piel parcialmente descamado.

Se colocaron los ejemplares de anchoíta dentro de bachas junto con la salmuera, en una relación 1:1,3 pescado a salmuera. Las bachas se mantuvieron en salas climatizadas (5 y 14°C) de la planta elaboradora. Se extrajeron muestras de aproximadamente 1 kg (~ 80 ejemplares enteros) a lo largo de la etapa a fin de efectuar los análisis microbiológicos y físico-químicos. En simultáneo, se tomaron muestras de salmuera y se midió el contenido de sal en grados Baumé con salinómetro de vidrio y se registró la temperatura.

### **2.2.3. Acondicionamiento de las muestras**

Todas las muestras de ejemplares de anchoíta se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis. Según el tipo de muestra y experiencia correspondiente, se efectuó el procesamiento de las mismas. A los ejemplares enteros de anchoíta se les realizó el descabezado y eviscerado así como también el fileteado manual o separación de piel, branquias, intestino y músculo, según correspondiera. Para realizar los estudios microbiológicos se separaron al azar aproximadamente 50 gr de muestra de forma aséptica. En caso de efectuar análisis físico-químicos, el resto de la muestra (filetes) se procesó mediante procesadora eléctrica de mano y se mantuvo en refrigeración hasta.

Por otro lado, se analizaron muestras de sal de la experiencia de salado para investigación de cepas halófilas. Estas muestras se mantuvieron a temperatura ambiente envasadas asépticamente hasta su análisis.

#### **2.2.4. Análisis físico-químicos de anchoíta**

Para la Experiencia II se analizó anchoíta fresca a fin de caracterizar la materia prima. Para ello se determinó el contenido de agua, lípidos, proteínas, cenizas, sal y actividad de agua ( $a_w$ ). Asimismo, a fin de estudiar los fenómenos de transferencia de masa, se tomaron muestras a diferentes tiempos y se analizó el contenido de agua, sal y actividad de agua. Las técnicas se describen a continuación.

- Contenido de agua

El contenido de agua (humedad) fue determinado mediante secado en estufa a  $105 \pm 1$  °C hasta peso constante (AOAC, 1990. Sec 984.25). Esta técnica se realizó por duplicado.

- Contenido de proteínas

La determinación del contenido de proteínas se realizó por el método de Kjeldahl (AOAC, 1990. Sec. 920.152) que consta de la digestión de la muestra con ácido sulfúrico concentrado usando sulfato de cobre como catalizador. Se le agregó a la muestra NaOH 40% y se destiló el nitrógeno liberado hacia una solución de ácido bórico. El destilado fue titulado con ácido sulfúrico normalizado. Se utilizó el factor 6,25 para transformar el nitrógeno total en proteína total (Kirk et al., 1996). Esta determinación se realizó por duplicado.

- Contenido de lípidos totales

La cuantificación del contenido de lípidos se realizó mediante el método de hidrólisis ácida (AOAC, 1990. Sec. 922.06). Se pesaron 2 g de muestra y se trataron con 2 mL de etanol hasta humedecer la muestra. Se adicionaron 10 mL de solución de HCl (25 partes de HCl + 11 partes de H<sub>2</sub>O) y se colocó en baño maría a 70-80 °C durante 30 minutos. Se pasó el material a una ampolla de decantación y se trató con 25 mL de éter etílico más 25 mL de éter de petróleo. Se dejó decantar hasta lograr la separación de las fases. Se filtró la fase superior sobre un erlenmeyer de 125 mL previamente tarado. Se repitió dos veces el procedimiento de extracción del líquido remanente utilizando 15 mL de la mezcla de extracción. Se evaporó el éter en un baño termostático a 80 °C y luego en estufa a 100 °C hasta peso constante. Se dejó llegar a temperatura ambiente antes del pesado. Se calculó el contenido de grasa presente en la muestra mediante la diferencia de peso del erlenmeyer vacío y con el residuo graso. Se efectuó por duplicado.

- Contenido de cenizas

Las cenizas se determinaron por calcinación a 550°C (AOAC, 1990. Sec. 945.46) utilizando un horno eléctrico modelo 332 (Indef, Córdoba, Argentina). Esta determinación se realizó por duplicado.

- Contenido de NaCl

Para la determinación de NaCl en anchoíta salada, el residuo seco fue tratado con agua destilada durante 5 min a 100 °C, luego se filtró y se llevó a un volumen final de 250 mL (Kirk et al., 1996). En anchoíta fresca y proveniente de las primeras 3 hs del salado, el residuo seco se calcinó en mufla (modelo 332, Indef, Córdoba, Argentina) a 500 °C (AOAC, 1993), llevándose luego a un volumen final de 100 mL. Alícuotas de estos extractos fueron tituladas, utilizando una solución normalizada de AgNO<sub>3</sub> y solución de K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> como indicador.

- Actividad de agua

La medición de actividad de agua ( $a_w$ ) se llevó a cabo mediante un higrómetro digital Aqualab, modelo CX-2T (Decagon, Pulman, Estados Unidos). Esta medición se efectuó por triplicado.

### 2.2.5 Análisis microbiológicos de anchoíta

Los análisis microbiológicos efectuados a partir de anchoíta fresca, anchoíta de la etapa de salado húmedo y anchoíta de la etapa de maduración de plantas elaboradoras (Experiencias I y II) incluyeron el estudio de microorganismos autóctonos presentes en pescado fresco que pueden causar deterioro o ser patógenos, así como también sobre microorganismos halófilos. Los análisis efectuados en la Experiencia III corresponden únicamente a determinaciones de la microbiota halófila. Los ensayos microbiológicos se efectuaron en un cuarto de siembra destinado a tal fin (Fig. 2.3).



**Figura 2.3:** Cuarto de siembra para ensayos microbiológicos

- Preparación de diluciones decimales

Por un lado, se pesaron 10 g de muestra que fueron homogeneizados con 90 ml de agua peptonada para diluciones estéril (peptona, 1 g/L). Por otro lado, para los estudios sobre microorganismos halófilos, se pesaron 10 g de muestra y se homogenizaron con 90 ml de caldo sal estéril (NaCl, 150 g/L; Peptona de carne, 3 g/L; Extracto de carne, 3 g/L). En ambos casos, se dejó en reposo durante 30 min como etapa de enriquecimiento para favorecer el desarrollo de las células injuriadas. Se realizaron diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  con agua peptonada y  $10^{-2}$  con caldo sal, respectivamente (ICMSF, 1983), según corresponda. Los análisis microbiológicos que se llevaron a cabo se detallan a continuación.

- Bacterias aerobias totales a 7, 25 y 35 °C

Se investigaron en Agar para Recuento en Placa (Britania) mediante siembra de 1 ml de las diluciones decimales por placa vertida y se incubó en diferentes condiciones ( $7\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 10 días,  $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 5 días y  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 48 hs, abreviadas como BA7, BA25 y BA35, respectivamente (ICMSF, 1983).

- *Staphylococcus* spp

Se sembró 0,1 ml de las diluciones en superficie en Agar Baird-Parker y se incubó a  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 48 hs. Se realizó el recuento de colonias características (ICMSF, 1983).

- *Staphylococcus aureus*

Se realiza por siembra de 0,1 ml de las diluciones en superficie en Agar Manitol Salado y se incubó a  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 48 hs. Se seleccionaron las colonias con características morfológicas típicas y se verificaron mediante la prueba de la coagulasa (ICMSF, 1983).

- Enterobacterias totales

Se sembró 1 ml de las diluciones por placa vertida en Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa y se incubó a  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 24 hs (ISO, 1991).

- Enterococos

Los enterococos presuntivos se determinaron en Agar KF (Merck) a partir de la inoculación de 1 ml de las diluciones decimales por placa vertida ( $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 48 hs) y se confirmaron en Caldo Glucosa Azida incubando a  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 48 hs (ICMSF, 1983).

- Coliformes totales

Se sembró 1 ml de las diluciones en Agar Violeta Rojo Bilis Neutro por placa vertida y se incubó a  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 24 hs para recuento y se investigaron en Caldo Verde Brillante Bilis ( $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 48 hs) (ICMSF, 1983).

- Coliformes fecales

Se determinaron repicando en caldo EC (incubación  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 48 hs) a partir de coliformes totales positivos en Caldo Verde Brillante Bilis 2% (ICMSF, 1983).

- *Clostridium* sulfito-reductores (CSR)

Se sembró 1 ml de las diluciones decimales en tubos de Miller Pricket, se colocó posteriormente Agar SPS y se generó anaerobiosis mediante el agregado de vaselina líquida (incubación  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 48 hs) (IRAM 15964).

- *C. perfringens*

Se investigaron a partir de CSR positivos en Agar SPS por tinción gram y en caso de bacilos positivos se repicó en Caldo para anaerobios (Tioglicolato) y se realizaron las pruebas bioquímicas pertinentes (movilidad, hidrolisis de gelatina, formación de ácido a partir de hidratos de carbono) (Mc Faddin, 1980).

- Mohos y levaduras (MyL)

Se sembró 0,1 ml en superficie en Agar YGC (extracto de levadura, glucosa, cloranfenicol) (HyL, Britania) y se incubó a  $25\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 5 días.

- *Pseudomonas* spp

Se sembró 1 ml de las diluciones por placa vertida en Agar Cetrimida (Britania) y se incubó 48 hs a  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

- *Lactobacillus* spp

Se sembró 1 ml de las diluciones por placa vertida en Agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe), se envasó al vacío y se incubó a  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 48 hs (ISO 15214: 1998).

- *Escherichia coli*

En caso de coliformes fecales positivos, se efectuaron las pruebas IMViC para investigación de presencia de *E. coli* (ICMSF, 1983).

Para las determinaciones de microorganismos halófilos, se partió de las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$  en caldo salino y se realizaron los siguientes ensayos por duplicado:

- Bacterias y/o Arqueas Halófilas con 15, 20 y 25% NaCl p/v

Para efectuar los recuentos se sembró 0,1 ml de la dilución correspondiente en superficie en Agar Gibbons (NaCl, 150 g/L o 200 g/L; SO<sub>4</sub>Mg(7H<sub>2</sub>O), 20 g/L; KCl, 2 g/L; Citrato trisódico, 3 g/L; Peptona ácida de caseína, 7,5 g/L; Extracto de levadura, 10 g/L; Agar, 20 g/L; Fe<sup>2+</sup>, 10 ppm; Mn<sup>2+</sup>, 0,1 ppm) y se incubó a 35±0,5°C por 21 días (Holt, 1989; Sehgal y Gibbons, 1960).

Para investigar presencia se inoculó 1 ml de la dilución 10<sup>-1</sup> en 9 ml de Caldo Gibbons (NaCl, 150 g/L o 200 g/L o 250 g/mL; SO<sub>4</sub>Mg(7H<sub>2</sub>O), 20 g/L; KCl, 2 g/L; Citrato trisódico, 3 g/L; Peptona ácida de caseína, 7,5 g/L; Extracto de levadura, 10 g/L; Fe<sup>2+</sup>, 10 ppm; Mn<sup>2+</sup>, 0,1 ppm) y se incubó a 35±0,5°C por 7 días (Holt, 1989; Sehgal y Gibbons, 1960).

Se utilizan las siglas BH15, BH20 y BH35 para hacer referencia a los análisis de bacterias y arqueas halófilas en medios de cultivo con diferentes concentraciones salinas (15, 20 y 25 % p/v, respectivamente).

- Mohos y levaduras halófilos

Se sembró 0,1 ml en superficie en Agar YGC (extracto de levadura, glucosa, cloranfenicol) (HyL, Britania) con agregado de NaCl (17,5 % p/v) y se incubó a 25±0,5°C por 5 días (Yeannes et al., 2016).

### **2.3. Aislamiento y caracterización de cepas halófilas representativas**

A partir de los crecimientos observados en las placas de cultivo utilizadas para desarrollo de bacterias y arqueas halófilas, se seleccionaron las cepas representativas en función de las características morfológicas de las colonias (color, borde y propiedades ópticas de la luz transmitida y reflejada). Las mismas se aislaron en tubos con agar Gibbons

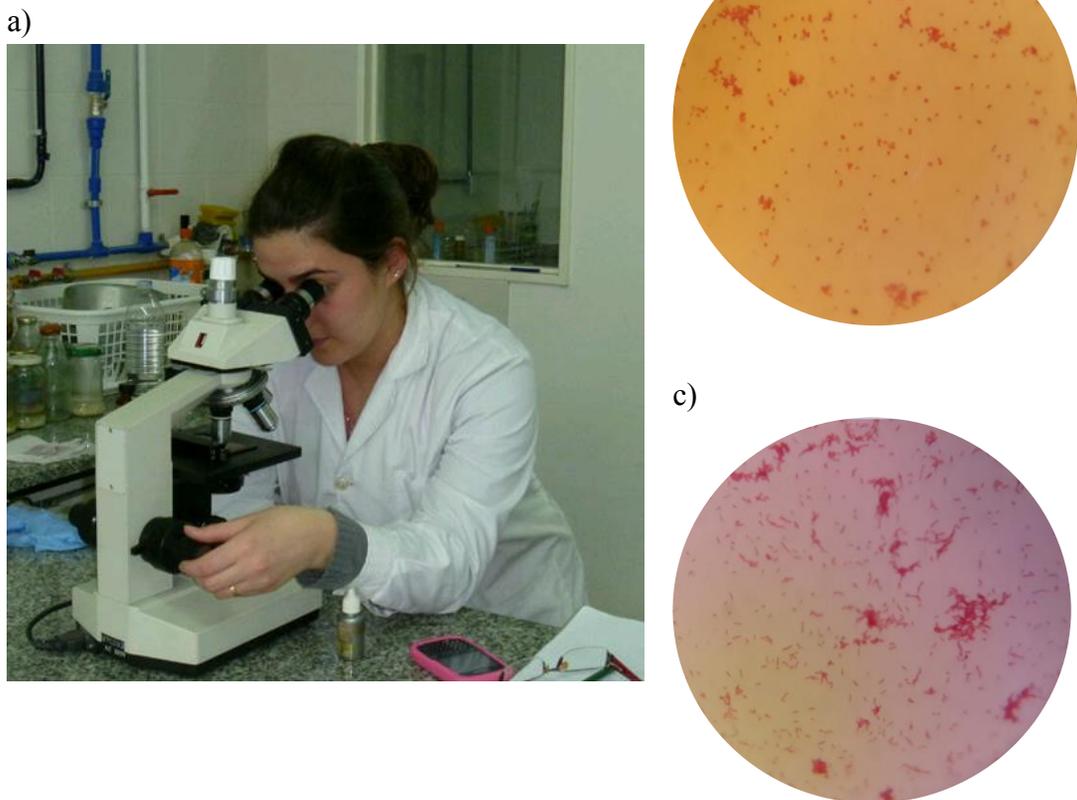
en pico de flauta, se incubaron hasta tener buen desarrollo y se almacenaron en refrigeración para los posteriores análisis. Los cultivos stocks se mantuvieron con renovación constante, para ello se utilizó agar halofílico (NaCl, 175 g/L; triptona, 5 g/L; SO<sub>4</sub>Mg(7H<sub>2</sub>O), 20 g/L; Extracto de levadura, 4 g/L; Agar, 17 g/L; KCl, 5 g/L; CaCl(6H<sub>2</sub>O), 0,2 g/L, pH 7,0-7,2) (IRAM, 1988).

### **2.3.1. Pruebas fenotípicas de caracterización microbiana**

Para la caracterización de las mismas se llevó a cabo la caracterización microscópica de las células y diferentes pruebas bioquímicas clásicas y otras de importancia para el proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada. Cabe destacar que los medios de cultivo utilizados para las pruebas bioquímicas se suplementaron con NaCl hasta una concentración final de 150-200 g/L y también con K<sup>+</sup> (10 ppm) y Mg<sup>2+</sup> (0,1 ppm) para proporcionar los nutrientes específicos necesarios para los microorganismos halófilos. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

#### **- Caracterización microscópica**

Se preparó un frotis a partir del cultivo puro utilizando una solución de ácido acético al 2 % debido a la fragilidad osmótica de las células de las bacterias y arqueas halófilas y se estudió la morfología celular de los aislados a partir de la coloración de Gram y observación en microscopio óptico mediante lente de inmersión con aumento 1000x (Fig. 2.4) (Holt, 1989).



**Figura 2.4:** Caracterización microscópica de microorganismos: a) Observación de frotis de células coloreadas por tinción Gram en microscopio óptico (1000x); b) Cocodiscos Gram negativos; c) Bacilos Gram negativos

- Rango de requerimiento/tolerancia de sal

Para determinar el rango de salinidad de crecimiento de las cepas aisladas, se utilizaron medios Gibbons con distintos niveles de NaCl (0, 1, 5, 7,5, 10, 15 y 20% p / v) (ICMSF, 1983). Los inóculos se incubaron a 35-37° C. Se consideró positivo en los casos en que se observó desarrollo.

- Actividad de la citocromo-oxidasa

Para determinar si las cepas aisladas presentan la enzima citocromo-oxidasa, y por lo tanto utilizan oxígeno en la cadena de transporte de electrones), se partió del cultivo puro fresco en medio nutritivo (stock en agar halofílico). Sobre un portaobjetos se dispuso un disco de oxidasa impregnado con oxalato de tetrametil-p-fenilendiamina (Oxoid) y con varilla de vidrio se colocó sobre él material de la colonia en estudio. El oxalato de tetrametil-p-fenilendiamina es un indicador redox que pasa de azul a una tonalidad rojiza/púrpura al ser oxidado (citocromo-oxidasa positivo).

- Actividad de la catalasa

La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$ . La presencia de esta enzima se determinó a partir de la extracción de material de una colonia fresca (stock en agar halofílico) con un ansa que se resuspendió en agua oxigenada (3% v/v) sobre un portaobjetos. Se consideró el ensayo positivo cuando se observó la producción de burbujas (ICMSF, 1983).

- Motilidad

Se determinó por siembra en punción profunda con aguja de inoculación recta en el centro de tubos con medio de cultivo semisólido (SIM Medio, Britania). Se incubó 14 días a 35-37°C. Se consideraron cepas móviles las que produjeron turbidez del medio más allá de la línea de siembra y cepas inmóviles cuando el crecimiento se observó solamente en la línea de siembra.

- Reducción de nitratos

Para esta determinación se incubaron los cultivos puros en un caldo con nitrato potásico (Mc Faddin, 1980) hasta obtener un buen crecimiento. Para revelar la

presencia de nitritos en el medio, se añadió a cada tubo 1 mL de reactivo A (ácido sulfanílico al 0,8% p/v en ácido acético 5 N), se homogeneizó y luego se agregó el reactivo B ( $\alpha$ -naftilamina al 0,5% p/v en ácido acético 5 N). La aparición de una coloración rosa, roja o castaña en los 30 segundos siguientes al goteo se consideró positiva para la presencia de nitritos (Merck).

- Utilización del citrato

Esta prueba se efectuó en agar citrato de Simmons (Britania) que permite la detección de microorganismos capaces de utilizar el citrato como única fuente de carbono y fosfato monoamónico como única fuente de nitrógeno. Se prepararon tubos inclinados conteniendo medio sólido citrato de Simmons (Britania). Los tubos fueron sembrados por estriado y punción e incubados a 35-37 °C. Se consideró la reacción positiva al observar un viraje del indicador del verde al azul, debido a la alcalinización del medio provocada por la utilización del citrato (Mc Faddin, 1980).

- Oxidación y/o fermentación de la glucosa

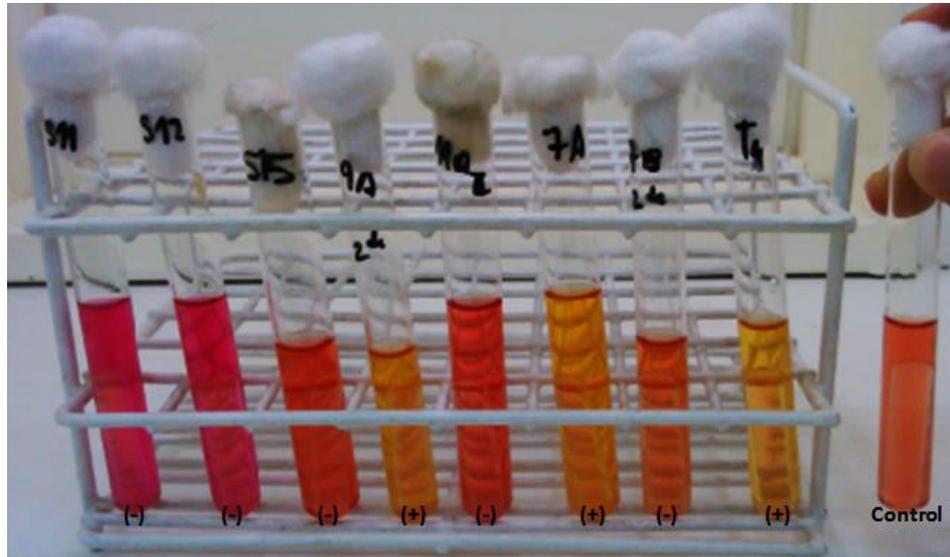
Esta determinación se realiza a fin de diferenciar el metabolismo oxidativo o fermentativo, así como la no utilización de un hidrato de carbono. Para ello, se prepararon tubos con 10 mL de medio OF (Merck) semisólido con agregado de glucosa. Se inocularon por punción dos tubos por cada cepa en estudio, uno de los cuales se selló con vaselina líquida (2 cm), y ambos tubos se incubaron a 35-37° C (Fig. 2.5). Las cepas oxidativas de la glucosa producen una reacción ácida (viraje del verde al amarillo) solo en el tubo “abierto” y presentan poco o nulo desarrollo y ausencia de producción de ácido en el tubo “cerrado” (microorganismos aerobios). Las cepas fermentadoras de la glucosa se distinguen porque producen reacción ácida tanto en tubos “abiertos” como “cerrados” (microorganismos anaerobios facultativos). Las cepas que no utilizan la glucosa no producen cambios en ninguno de los 2 tubos que permanecen verdes (Mc Faddin, 1980).



**Figura 2.5:** a) Tubos de medio OF inoculados y b) detalle de los tubos inoculados con tapón de vaselina.

- Fermentación de carbohidratos (glucosa, lactosa y sacarosa)

Se determinó la capacidad de los microorganismos para fermentar un carbohidrato en particular (glucosa, lactosa o sacarosa) por la producción de ácido acompañado o no de gas. Para tal fin, se prepararon tubos con caldo base con indicador rojo de fenol y el carbohidrato en estudio (1% p/v) y se colocó una campana de Durham invertida en cada tubo. Los tubos se inocularon e incubaron a 35-37°C por 7-14 días. Se consideró positivo cuando el medio viró del rojo al amarillo debido a la acidificación y se registró cuando se evidenció la formación de gas (Fig. 2.6) (Mc Faddin, 1980).



**Figura 2.6:** Resultados positivos (+), negativos (-) y control sin inóculo microbiano para la prueba de fermentación de carbohidratos.

### 2.3.1.1. Pruebas fenotípicas de interés tecnológico

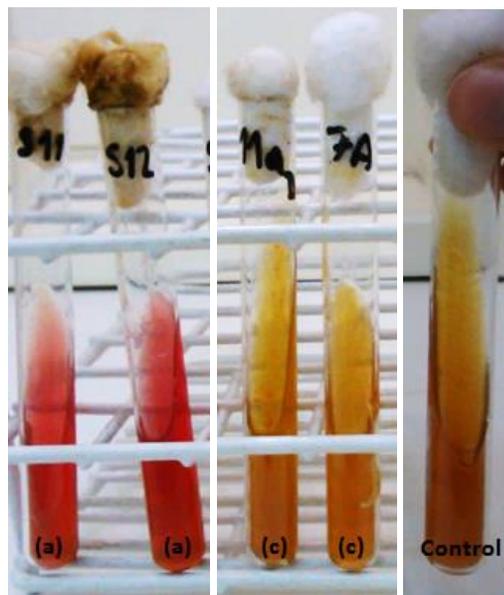
Además de las características anteriormente mencionadas, se realizaron ensayos fenotípicos para determinar las características microbianas que tienen importancia tecnológica ya que podrían influir en el proceso de maduración. Las cepas aisladas se analizaron por sus capacidades de producción de  $H_2S$  e indol y por sus actividades proteolíticas, lipolíticas y actividad de la enzima histidina-descarboxilasa. Los medios de cultivo utilizados para estas pruebas se suplementaron con las sales minerales requeridas por los microorganismos halófilos (150-200 g/L NaCl, según corresponda, y  $K^+$  (10 ppm) y  $Mg^{2+}$  (0,1 ppm)). Todos los análisis se realizaron por duplicado.

- Producción de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) en medio TSI

La producción de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) se ensayó mediante inoculación en agar hierro triple azúcar (TSI, Britania) que permite investigar la producción de  $H_2S$  a partir de sustancias orgánicas que contengan azufre (tiosulfato de sodio) y también la producción de ácido y gas de glucosa, lactosa y sacarosa. La fermentación de los azúcares da lugar a la formación de ácido, el cual se detecta por medio del viraje del

indicador (rojo de fenol) al amarillo (Fig. 2.7). La producción de  $H_2S$  se detecta por la combinación de este compuesto con  $Fe^{3+}$ , formando sulfuro de hierro, de color negro. Para la determinación se prepararon tubos inclinados conteniendo el medio TSI (Britania), los cuales se inocularon por punción y estría en superficie. Los tubos fueron incubados a  $35-37^{\circ}C$ . Los resultados se interpretaron de la siguiente forma:

- a) Pico alcalino/fondo alcalino (pico rojo/fondo rojo): no hay fermentación de azúcares
- b) Pico alcalino/fondo ácido (pico rojo/fondo amarillo): fermentación de glucosa
- c) Pico ácido/fondo ácido (pico amarillo/fondo amarillo): Glucosa y lactosa y/o sacarosa fermentadas
- d) La presencia de burbujas, o ruptura del medio de cultivo, indica que el microorganismo produce gas.
- e) El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfhídrico.



**Figura 2.7:** Ejemplo de resultados en medio TSI.

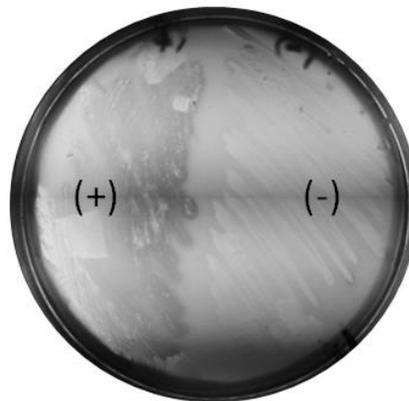
- Producción de indol

Se determina la presencia de triptofanasa que es una enzima que hidroliza el triptófano en indol y alanina. La producción de indol se estudió mediante la

inoculación en caldo de peptona, incubación hasta observar turbidez a 35-37°C y adición de reactivo de Kovacs. Se considera positivo si se presenta un anillo rosa-rojizo en la superficie que indica que se ha formado un complejo coloreado entre el indol y el p-dimetilamino benzaldehído (Mc Faddin, 1980).

- Actividad proteolítica

La capacidad de producir proteólisis se determinó por estriado del cultivo puro en agar de leche (extracto de levadura, 3 g/L, peptona de carne, 5 g/L, agar, 15 g/L, leche, 10 ml/L). Las placas se incubaron a 35-37 ° C durante 10 días. Resultaron positivas las cepas que evidenciaron zonas translúcidas alrededor de las colonias (Fig. 2.8) (FIL IDF 73, 1974).



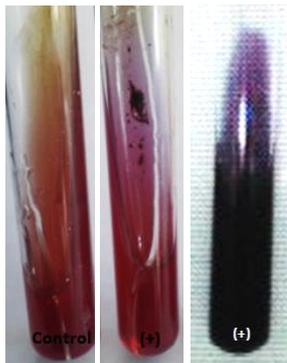
**Figura 2.8:** Capacidad proteolítica positiva (+) y negativa (-).

- Actividad lipolítica

La capacidad lipolítica se estudió en un medio sólido con tributirina. Las placas inoculadas se incubaron a 35-37°C durante 10 días. La reacción positiva se determinó por la aparición de zonas claras alrededor de las colonias (FIL IDF 73, 1974).

- Actividad histidina-descarboxilasa

Esta determinación tiene como objetivo diferenciar las cepas presuntamente productoras de histamina de las que no lo son. Para ello se utilizó un medio selectivo compuesto por 0,5% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, 2,7% de L-histidina, 0,1% de  $\text{CaCO}_3$ , 2,0% de agar y 0,006% de púrpura de bromocresol, pH 5.3). Se preparon tubos en pico de flauta que se inocularon con las cepas puras en superficie y se incubaron a 35-36°C por 14 días. Se consideró positiva la colonia que produjo un viraje del medio hacia el violeta (Fig. 2.9) (Niven et al., 1981; Ramírez et al., 1994).



**Figura 2.9:** Test de actividad histidina-descarboxilasa, comparación de control sin inóculo microbiano con una cepa que produjo resultado positivo débil (leve viraje hacia el violeta) y otra que produjo resultado positivo fuerte (viraje al violeta de todo el agar).

### 2.3.1.2. Ensayo de quimiotaxis hacia histidina y/o histamina

Se realizó una primer selección de cepas motiles quimiotácticas en placa de agar blando (*swimming*) con tripteína y extracto de levadura como atrayentes (agar, 0,4% p/v; tripteína, 0,1% p/v; extracto de levadura, 0,1% p/v; NaCl, 175 g/L;  $\text{SO}_4\text{Mg}(7\text{H}_2\text{O})$ , 20 g/L; KCl, 5 g/L;  $\text{CaCl}(6\text{H}_2\text{O})$ , 0,2 g/L). Se efectuó la siembra por punción en superficie a partir de stocks microbianos y se incubó 7 días a 35°C.

Posteriormente, las cepas que resultaron positivas se estudiaron en placa de agar blando hacia diferentes sustratos: histidina y/o histamina. El medio de cultivo base para este ensayo se constituyó de 0,4% p/v de agar y sales minerales (NaCl, 175 g/L; SO<sub>4</sub>Mg(7H<sub>2</sub>O), 20 g/L; KCl, 5 g/L; CaCl(6H<sub>2</sub>O), 0,2 g/L). En este ensayo se estudió un rango de 0,01-0,1% p/v de la fuente de carbono (histidina o histamina). Asimismo, se utilizó como control negativo el medio de cultivo base sin el suplemento de nutrientes adicionales y como control positivo con 0,025% p/v de tripteína y 0,025% p/v de extracto de levadura. Se efectuó la inoculación de una alícuota de 5 µL de los cultivos líquidos en fase exponencial de crecimiento (densidad óptica (600 nm) ~ 0,7) en la superficie del agar blando en el centro de la placa y se incubó 21 días a 35°C. Se consideró respuesta quimiotáctica positiva cuando las cepas formaron un anillo concéntrico alrededor del punto de sembrado esparciéndose con el crecimiento y desplazamiento microbiano hacia los bordes de la placa, siguiendo el gradiente de concentración generado por el consumo (Englert, 2009; Wolfe y Berg, 1989). Estos estudios se efectuaron por duplicado.

### **2.3.2. Pruebas moleculares de identificación microbiana**

Para la identificación molecular se utilizaron diferentes técnicas moleculares genotípicas y proteómicas:

- Protocolo 1

El ADN genómico se extrajo de las células mediante la preparación de templados a partir de las cepas puras en agar (técnica de Colony PCR, Sheu et al. (2000)). Para ello se tomó material de una colonia con un asa de siembra y se suspendió en un eppendorf con 50 µL de agua destilada estéril que se homogenizó con el uso de una micropipeta. Posteriormente se llevó a hervor durante 5 minutos en un baño de agua y 5 µL de cada suspensión se utilizaron como templados para las reacciones de PCR (*Polymerase Chain Reaction*: reacción en cadena de la polimerasa). Las PCR se llevaron a cabo en un termociclador *BIOMETRA UNO-Thermoblok* con los siguientes componentes (µL):

templado 5, buffer 1X 2,5, MgCl<sub>2</sub> 50 mM 1,5, dimetil-sulfóxido (DMSO) 1,25, dNTPs 10 mM 1,25, iniciadores 0,8, Taq polimerasa 0,25, en un volumen final de 25 µL. Se utilizaron los siguientes cebadores seleccionados en función de las características fenotípicas de las cepas:

Bacterias

F43Eco 5'-CGGAATTCCAGGCCTAACACATGCAAGTC-3''

R1387Eco 5'-CGGAATTCGGGCGGWGTGTACAAGGC-3

Arqueas

21F 5' (TTCCGGTTGATCCTGCCGGA) 3' y

1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3

Los programas utilizados en la PCR se describen en la Tabla 2.1:

**Tabla 2.1.** Programas utilizados para la PCR del Protocolo 1

	Número de ciclos	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión
	1	94° C, 3 minutos		
Bacterias	30	94° C, 1 minuto	55° C, 1 minuto	72° C, 1 min. 30 seg.
	1			72° C, 10 minutos
	1	94°C, 3 minutos		
Arqueas	29	94°C, 30 segundos	56°C, 45 segundos	72°C, 3 minutos
	1			72°C, 30 minutos

Los productos de amplificación fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa 0,8% (p/v) para verificar la amplificación de secuencias de DNA. Se utilizó un buffer de corrida TBE 10X (Tris Base 108 g/L; ácido bórico 55 g/L; EDTA 0,5M 40 mL/L; pH 8) y buffer de siembra con bromofenol blue 0,25% (v/v); glicerol 50% (v/v). Se corrió a 120 V por 25 minutos. Los productos de PCR fueron purificados usando el kit *QIAquick PCR Purification kit* (Qiagen, Alemania), siguiendo las indicaciones del mismo. Luego fueron secuenciados en ambas direcciones por la compañía MCLAB ([www.mclab.com](http://www.mclab.com)), usando los siguientes cebadores:

F43Eco 5'-CGGAATTCCAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'

357F 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'  
518R 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGG-3'  
1000R 5'-GGCCATGCACYWCYTCTC-3'  
R1387Eco 5'-GCCTTGACACWCCGCCCGAATTCCG-3'

Las secuencias fueron inspeccionadas individualmente y ensambladas manualmente usando el programa Bioedit (Hall, 1999). Las secuencias del 16S rADN resultante para cada aislado fueron examinadas ([www.ezbiocloud.net/identify](http://www.ezbiocloud.net/identify)) para determinar su afiliación taxonómica (Yoon et al., 2017). Las secuencias con los valores de corte (e-value) más bajos fueron seleccionadas como los aislados más cercanos filogenéticamente para el aislado analizado. Debido a que las secuencias de 16S rADN fueron solamente parciales, el nivel alto de confianza fue establecido al nivel de género (Clote y Backofen, 2000). Este procedimiento se llevó a cabo con la colaboración del Dr. Narjol González Escalona en el Center for Food Safety and Applied Nutrition, Division of Microbiology, MD, College Park, Estados Unidos.

- Protocolo 2

El ADN genómico se obtuvo usando el kit QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, Alemania). La PCR se realizó con los siguientes cebadores:

Bacterias

27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'

1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Arqueas

21F 5' (TTCCGGTTGATCCTGCCGGA) 3' y

1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

La PCR se efectuó en un termociclador *DNA Engine Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler* (BIO-RAD) con 20 ng de ADN genómico en 30 µL de reacción empleando a EF-Taq (SolGent, Korea) utilizando los programas descritos en la Tabla 2.2:

**Tabla 2.2:** Programas utilizados para la PCR del Protocolo 2

	Número de ciclos	Desnaturalización	Anillamiento	Extensión
	1	95° C, 2 minutos		
Bacterias	35	95° C, 1 minuto	55° C, 1 minuto	72° C, 1 min
	1			72° C, 10 minutos
	1	94°C, 5 minutos		
Arqueas	35	94°C, 30 segundos	Temperatura variable, 30 segundos	72°C, 40 segundos
	1			72°C, 7 minutos

La reacción de secuenciación se realizó empleando el kit: *PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit* y los cebadores 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') y 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'). La secuencia de nucleótidos se determinó en ambas cadenas de los productos de amplificación de PCR. Las muestras de ADN que contenían los productos de extensión se agregaron a *Hi-Di formamide* (Applied Biosystems, Foster City, CA). La mezcla se incubó a 95 °C durante 5 minutos, luego se pusieron 5 minutos en hielo y se analizaron por *ABI Prism 3730XL DNA analyser* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Este procedimiento fue llevado por la compañía Macrogen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)). Las secuencias fueron examinadas del mismo modo que en el Protocolo 1.

### - Protocolo 3

Se analizaron cepas halófilas para su identificación por genotipado. El ADN se extrajo a partir del cultivo microbiano mediante lisis con SDS al 1%, proteinasa K y mutanolisina. Seguido de la purificación de este se efectuó la precipitación del ADN total con etanol absoluto y acetato sódico. A partir de allí se amplificó el gen ARNr 16S con los cebadores F27 (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') y R1492 (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3)'), y se hicieron diferentes reacciones de secuenciación para tener la máxima secuencia posible. En caso de dificultades por esta metodología, se efectuaron análisis por proteotipado. Este procedimiento fue llevado por la CCUG (Culture Collection, University of Göteborg, Suecia). Las cepas fueron depositadas en el cepario y analizadas

mediante la colaboración de la Dra. Margarita Gomila, Universitat de les Illes Balears, Palma, Islas Baleares, España.

## **2.4. Análisis efectuados en relación a la degradación de histamina**

### **2.4.1. Medición de la biomasa en medios de cultivo líquidos**

La medición de la biomasa en los medios de cultivo líquidos se realizó por medida directa de las unidades formadoras de colonias a partir de la siembra en placas con medio de cultivo Gibbons con 17,5% de NaCl (por duplicado), como así también se realizó por la medición de la turbidez a 600 nm (densidad óptica) de la suspensión de células (por triplicado), corrigiendo por la densidad óptica del mismo medio de cultivo sin inocular.

### **2.4.2. Investigación de cepas degradadoras de histamina**

En primera instancia se realizó la aclimatación de las cepas (cultivos puros) a la presencia de histamina a fin que las mismas se habitúen a la alta concentración de este compuesto. Para ello, los cultivos stock se resuspendieron en 5 mL de caldo halofílico (triptona, 5 g/L;  $\text{SO}_4\text{Mg}(7\text{H}_2\text{O})$  20 g/L; extracto de levadura 4 g/L; KCl 5 g/L;  $\text{CaCl}(6\text{H}_2\text{O})$  0.2 g/L; pH 7.0-7.2) (IRAM, 1988) suplementado con 17,5% NaCl p/v y se incubó en agitación (160 rpm) hasta observar crecimiento. A continuación se repicaron en 5 mL de caldo halofílico con agregado de histamina diclorhidrato -para llegar a una concentración de histamina aprox. 800 ppm- y 17,5% NaCl p/v y se incubó en agitación (160 rpm) durante 7 días a 25°C.

Para evaluar la degradación de histamina, cada cepa aclimatada se inoculó mediante ansa calibrada (Britania) en 5 ml de caldo halofílico con agregado de histamina (aprox. 800 ppm) y 17,5% NaCl p/v y se incubó en agitación (160 rpm) durante 14 días a 25°C.

Al finalizar el periodo de incubación, se tomaron muestras de 3 ml y se agregó igual cantidad de HCl 1 M. Se centrifugó a 9000g por 10 min y el sobrenadante se mantuvo a -20°C hasta el análisis de histamina. Se realizó el mismo procedimiento con un control sin inóculo microbiano. Los experimentos se realizaron por duplicado.

### **2.4.3. Investigación de la degradación de histamina por un cultivo mixto**

Se desarrolló un cultivo mixto (consorcio microbiano de cepas aislables) a partir de la inoculación de 57 cepas halófilas aisladas de sal (Experiencia III), anchoíta durante la etapa de salado húmedo (Experiencia II) y anchoíta salada-madurada (Experiencia III). El fin de crear este consorcio microbiano es las condiciones naturales donde los microorganismos compiten, y a su vez, que los microorganismos intervinientes sean cultivables para que sus resultados puedan ser de utilidad para la selección de un *starter* o un mix de cepas *starters*.

Este consorcio microbiano fue estudiado en diferentes condiciones para determinar su capacidad de degradar histamina. En primera instancia se efectuó una etapa de aclimatación en biorreactor discontinuo en el cual la histamina fue adicionada gradualmente al renovar el medio para evitar que pudiera generar un efecto tóxico por el shock de una alta concentración de la misma y luego se estudió la degradación en biorreactor discontinuo en condiciones de nutrientes limitadas con histamina como única fuente de carbono. Posteriormente se utilizó como inóculo el consorcio microbiano sometido a condiciones de nutrientes limitadas y se analizó en las mismas condiciones del ensayo de la Sección 2.4.2.

## **2.4.4. Estudios de degradación de histamina en biorreactor discontinuo**

### **2.4.4.1. Aclimatación a la presencia de alta concentración de histamina**

A fin de aclimatar a los microorganismos a la presencia de histamina, las cepas se inocularon en 50 mL de caldo halofílico (triptona, 5 g/L;  $\text{SO}_4\text{Mg}(7\text{H}_2\text{O})$  20 g/L; extracto de levadura 4 g/L; KCl 5 g/L;  $\text{CaCl}(6\text{H}_2\text{O})$  0.2 g/L; pH 7.0-7.2) (IRAM, 1988) suplementado con 17,5% NaCl p/v y se incubó a 25°C en agitación (120 rpm). Luego de cada ciclo de crecimiento, en la fase estacionaria se renovó el 50% del medio de cultivo por caldo halofílico con la concentración de nutrientes duplicada sin alterar la concentración de las sales (tripteína, 10 g/L;  $\text{SO}_4\text{Mg}(7\text{H}_2\text{O})$  20 g/L; extracto de levadura 8 g/L; KCl 5 g/L;  $\text{CaCl}(6\text{H}_2\text{O})$  0.2 g/L; pH 7.0-7.2) a fin de reponer los nutrientes consumidos en el volumen total. Todos los ensayos comenzaron con el mismo inóculo microbiano inicial (densidad óptica (600 nm)  $\sim 3$ ). Asimismo, en cada nuevo ciclo se adicionó histamina sucesivamente en cantidades crecientes y los consorcios microbianos de cada ciclo se utilizaron como inóculo del ciclo siguiente. De este modo, las perturbaciones por la presencia de histamina fueron paulatinas estimando llegar hasta aprox. 1000 ppm.

Se estudió el crecimiento mediante medición constante de la densidad óptica (600 nm) y recuentos en placas de Agar Gibbons con 17,5% p/p de NaCl. Se tomaron muestras del medio de cultivo a diferentes tiempos para evaluar la posible degradación de histamina. Para ello, se tomaron 3 ml de sobrenadante y se agregó igual cantidad de HCl 1 M. Se centrifugó a 9000g por 10 min y el sobrenadante se mantuvo a -20°C hasta el análisis de histamina. Se realizaron los mismos procedimientos con un control sin inóculo microbiano. Los experimentos se realizaron por duplicado.

### **2.4.4.2. Degradación de histamina como única fuente de carbono**

Se estudió la degradación de histamina en un medio de cultivo diseñado con el objetivo de mantener la histamina como principal fuente de carbono ( $\sim 200$  ppm) y cantidades limitadas de otros nutrientes que pudieran ser necesarios para el desarrollo de

bacterias y/o arqueas halófilas. El medio de cultivo utilizado fue el siguiente: triptéina (0,05 g/L), extracto de levadura (0,1 g/L), glucosa (0,1 g/L), glicerol (0,1 g/L), NaCl (175 g/L),  $\text{SO}_4\text{Mg}(7\text{H}_2\text{O})$  (20 g/L), KCl (0,2 g/L),  $\text{CaCl}_2(6\text{H}_2\text{O})$  (0,2 g/L)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1 g/L),  $\text{Fe}^{2+}$  (10 ppm),  $\text{Mn}^{2+}$  (0,1 ppm), histamina diclorhidrato (0,34 g/L) (IRAM, 1988; Lee et al., 2015; Sehgal y Gibbons, 1960). Dado los cambios de la formulación del nuevo medio de cultivo, a fin de preparar al consorcio a las nuevas condiciones, se efectuaron tres ciclos de crecimiento del consorcio en este nuevo medio de cultivo renovando el 50% del medio de cultivo, hasta que en un cuarto ensayo se renovó el 95% del medio de cultivo y en ese caso se realizaron las mediciones. Se utilizó un volumen total de medio de cultivo de 80 mL y se incubó a 25°C en agitación (120 rpm) (Fig. 2.10). Se utilizó como control un medio de cultivo idéntico al descrito anteriormente sin el agregado de histamina, con el cual se procedió del mismo que se detalló anteriormente.



**Figura 2.10:** Incubación de los cultivos en agitación.

El crecimiento microbiano y la preparación de muestras para posterior cuantificación de histamina se realizaron de igual modo que en el apartado anterior (Sección 2.4.4.1).

#### **2.4.5. Cuantificación de histamina mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC)**

Se efectuó la cuantificación de histamina los sobrenadantes correspondientes a los cultivos y a los controles, mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC) según la técnica del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Para ello, se trasvasaron 5 g de muestra (sobrenadante de cada cultivo con ácido) a un tubo graduado de 50 ml y se llevaron a volumen con solución Metanol:Agua (70:30). Se homogenizó y centrifugó a 3000 rpm a 5 °C durante 15 minutos. El sobrenadante se filtró por papel y por filtros de jeringa y se colocó en viales para inyección (Columna C18; Detector UV: Longitud de onda 215 nm; Fase móvil de buffer fosfato, decanosulfonato y acetonitrilo). Los ensayos se realizaron por duplicado. Estas determinaciones fueron realizadas en las dependencias del SENASA - Laboratorio Regional Mar del Plata.

#### **2.5. Índices utilizados para evaluar eficiencia del procesamiento**

A fin de analizar la performance del procesamiento de salado-madurado (Experiencias I y II), se estimó la concentración de sal en la fase líquida del músculo en la etapa de salado húmedo y se evaluaron diversos índices microbiológicos (Sección 2.5.2 a 2.5.5) en las distintas etapas de procesamiento, así como se utilizó una estimación de la actividad degradadora de histamina (Sección 2.5.6) para evaluar los ensayos correspondientes.

##### **2.5.1. Concentración de sal en la fase líquida del músculo**

Durante la deshidratación osmótica, la concentración del soluto y de la humedad, y consecuentemente la masa, cambian, y finalmente habrá un estado de equilibrio (Corzo y Bracho, 2008). La concentración de cloruro de sodio (sal) en la fase líquida del músculo ( $Z^{NaCl}$ ) resulta de utilidad para el diseño de experiencias de salado, siendo utilizada, por ejemplo, para la estimación de la proporción pescado salmuera en función de la

concentración final de sal deseada. La misma se calcula a partir de las fracciones másicas de agua ( $x^w$ ) y cloruro de sodio ( $x^{NaCl}$ ), según la Ec. 2.1:

$$Z^{NaCl} = \left( \frac{x^{NaCl}}{x^{NaCl} + x^w} \right) \times 100 \text{ (\%)} \quad (2.1)$$

Cuando se llega al equilibrio en el proceso de salmuereado, se asume que la concentración de sal en la fase líquida del músculo ( $Z_e^{NaCl}$ ) es igual al contenido de sal en la salmuera ( $y_e^{NaCl}$ ). Estos valores se calculan usando un balance de masa (Ec. 2.2) a partir de los valores iniciales de la relación másica de pescado/salmuera ( $M_0^P/M_0^S$ ), las fracciones másicas de agua y sal en el pescado ( $x_0^w$  y  $x_0^{NaCl}$ , respectivamente) y en la salmuera ( $y_0^w$  y  $y_0^{NaCl}$ , respectivamente) (Barat et al., 2004, Nguyen et al., 2010).

$$Z_e^{NaCl} = y_e^{NaCl} = \frac{\frac{M_0^P}{M_0^S} \cdot x_0^{NaCl} + y_0^{NaCl}}{\frac{M_0^P}{M_0^S} (x_0^w + x_0^{NaCl}) + (y_0^w + y_0^{NaCl})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (2.2)$$

### 2.5.2. Índice de abundancia relativa de especies

Este índice ( $\%A_i$ , Ec. 2.3) relaciona la proporción de colonias de una cepa respecto al recuento de colonias totales en cada muestra (Gotelli y Colwell, 2001).

$$\%A_i = \left( \frac{N_i}{N_t} \right) \cdot 100 \quad (2.3)$$

Donde  $N_i$  es el recuento de cada cepa  $i$  [UFC/g o UFC/mL] en la muestra y  $N_t$  es el número total de microorganismos [UFC/g o UFC/mL] contados en la muestra.

### 2.5.3. Índice de diversidad de Shannon

Shannon (1948) desarrolló un índice de diversidad ( $H$ ) que considera la diversidad de colonias y la proporción de cada una de ellas en la comunidad estudiada. Se calcula para cada condición en estudio según la Ec. 2.4 (Dunbar et al., 2000).

$$H = - \sum_{i=1}^s \left( \frac{N_i}{N_t} \right) \ln \left( \frac{N_i}{N_t} \right) \quad (2.4)$$

Donde  $N_i$  es el conteo de cada cepa  $i$  [UFC/g o UFC/mL] en la muestra,  $N_t$  es el número total de microorganismos [UFC/g o UFC/mL] en la muestra y  $s$  es la riqueza (número de cepas diferentes en la muestra).

### 2.5.4. Porcentaje de ocurrencia

El porcentaje de ocurrencia ( $\%C_i$ , Ec. 2.5) relaciona la cantidad de muestras colonizadas por un determinado microorganismo ( $M_c$ ) con el número total de muestras analizadas ( $M_t$ ).

$$\%C_i = \left( \frac{M_c}{M_t} \right) \cdot 100 \quad (2.5)$$

### 2.5.5. Tasa de supervivencia

En los tratamientos de inactivación microbiana es posible estimar la tasa de supervivencia ( $S$ ) (Ec. 2.6)

$$S = \frac{N_f}{N_0} \quad (2.6)$$

donde  $N_0$  [UFC/g] representa el número inicial de microorganismos y  $N_f$  [UFC/g] el número de microorganismos al finalizar el tratamiento (Huang et al., 2012).

### 2.5.6. Actividad degradadora de histamina

La actividad degradadora de histamina se expresó como porcentaje de degradación en el sobrenadante acidificado sobre el cual se realizó la cuantificación de la amina biógena. La misma se calculó según la ecuación 2.7 (Nisenbaum et al., 2013b):

$$D(\%) = \frac{x_c^H - x_m^H}{x_c^H} \cdot 100 \quad (2.7)$$

donde,

$x_c^H$  es la concentración de histamina (ppm) en el sobrenadante acidificado del control sin inóculo microbiano,

$x_m^H$  es la concentración de histamina (ppm) en el sobrenadante acidificado de las muestras tratadas con inóculos microbianos.

## 2.6. Modelos matemáticos

### 2.6.1. Modelos matemáticos de crecimiento microbiano

#### 2.6.1.1. Modelo de Gompertz (modificado)

La ecuación de Gompertz modificada por Zwietering et al. (1990) para que contenga parámetros biológicamente relevantes (Ec. 2.8) describe la curva sigmoidea característica del crecimiento microbiano para casos de crecimiento asimétrico:

$$\log(N) = \log(N_0) + A e^{\left\{-e^{\left[\frac{\mu_m}{A}(L-t)\right]+1}\right\}} \quad (2.8)$$

donde  $\log(N)$  es el logaritmo decimal del número de microorganismos [ $\log(\text{UFC/g})$  o  $\log(\text{UFC/mL})$ ] en el tiempo  $t$  y  $\log(N_0)$  el logaritmo del recuento inicial de microorganismos [ $\log(\text{UFC/g})$  o  $\log(\text{UFC/mL})$ ],  $\mu_m$  [ $\log(\text{UFC/g})/\text{h}$  o  $\log(\text{UFC/mL})/\text{h}$ ] es la velocidad máxima específica de crecimiento definida como la tangente en el punto de inflexión,  $L$  es la duración de la fase de demora en el crecimiento [horas],  $A$  [ $\log(\text{UFC/g})$  o  $\log(\text{UFC/mL})$ ] es la diferencia entre la asíntota superior - cuando el tiempo  $t$  tiende a infinito - y los recuentos iniciales (de  $\log(N/N_0)$  vs  $t$ ), y siendo  $e$ , el número de Euler (2,7182 aproximadamente). Los parámetros  $A$ ,  $\mu_m$  y  $L$  están representados en la Fig. 2.10.

### 2.6.1.2. Modelo Logístico (modificado)

El modelo Logístico fue modificado por Zwietering et al. (1990) a fin que la ecuación contenga parámetros de relevancia biológica (Ec. 2.9) y se utiliza para describir la curva sigmoidea del crecimiento microbiano simétrico.

$$\log(N) = \log(N_0) + \frac{A}{1 + e^{\left\{ \frac{\mu_m}{A} (L-t) + 2 \right\}}} \quad (2.9)$$

donde  $\log(N)$  es el logaritmo decimal del número de microorganismos [ $\log(\text{UFC/g})$  o  $\log(\text{UFC/mL})$ ] en el tiempo  $t$  y  $\log(N_0)$  el recuento inicial de microorganismos [ $\log(\text{UFC/g})$  o  $\log(\text{UFC/mL})$ ],  $\mu_m$  [ $\log(\text{UFC/g})/\text{h}$  o  $\log(\text{UFC/mL})/\text{h}$ ] es la velocidad máxima específica de crecimiento,  $L$  [h] es la duración de la fase de demora en el crecimiento,  $A$  [ $\log(\text{UFC/g})$  o  $\log(\text{UFC/mL})$ ] es el logaritmo del aumento de la población microbiana (diferencia de  $\log(N/N_0)$  entre la asíntota superior - cuando el tiempo  $t$  tiende a infinito - y los recuentos iniciales). Estos parámetros están representados en la Fig. 2.11.

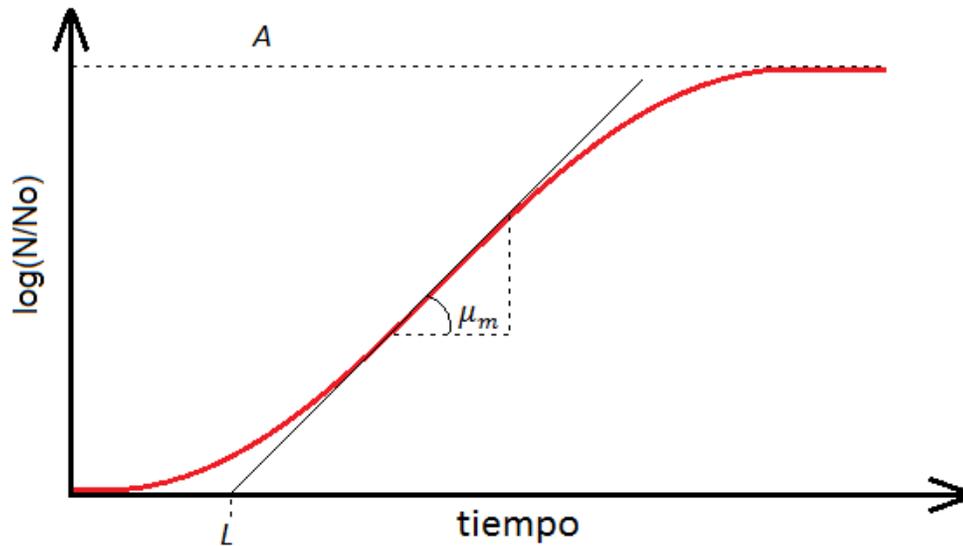


Figura 2.11. Representación gráfica de una curva de crecimiento microbiano con los parámetros  $A$ ,  $\mu_m$  y  $L$  de los modelo de Gompertz y Logístico modificadas por Zwietering et al. (1990)

### 2.6.1.3. Parámetros derivados

- Tiempo de duplicación

El tiempo de duplicación o generación ( $t_d$ ) es el tiempo requerido para que una célula se divida o su población se duplique. Su ecuación (Ec. 2.10) se obtiene a partir de integrar la Ec. 1.3 entre un valor inicial de biomasa y el doble del mismo.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Ec. 2.10})$$

Donde  $t_d$  [h] es el tiempo de duplicación y  $\mu$  es la velocidad específica de crecimiento [ $\log(\text{UFC/g})/\text{h}$ ].

- Máxima densidad poblacional

La máxima densidad poblacional (MPD) corresponde al valor máximo alcanzado de biomasa y se puede estimar a partir de la ecuación 2.11 (Crettaz Minagilia et al., 2017).

$$MPD = \log(N_0) + A \quad (2.11)$$

donde  $N_0$  [UFC/mL o UFC/g] corresponde al recuento microbiano inicial y  $A$  [log (UFC/mL) o log(UFC/g)] al logaritmo del incremento poblacional, es decir, la diferencia entre los recuentos iniciales y la asíntota superior. Este valor concierne al estimado mediante los modelos de crecimiento microbiano de Gompertz o Logístico modificados por Zwietering et al. (1990).

## 2.6.2. Modelos matemáticos de inactivación microbiana

### 2.6.2.1. Modelo de Gompertz

Los datos experimentales de la fase de declinación de diferentes microorganismos se ajustaron al modelo de Gompertz para inactivación microbiana (Ec. 2.12):

$$\log(N) = \log(N_0) + C e^{-e^{\left(\frac{\mu_d e}{C} M\right)}} - C e^{-e^{\left[\frac{\mu_d e}{C} (t-M)\right]}} \quad (2.12)$$

donde  $\log(N)$  es el logaritmo decimal del número de microorganismos [log(UFC/g)] en el tiempo  $t$  y  $\log(N_0)$  el recuento inicial de microorganismos [log(UFC/g)],  $\mu_d$  [log(UFC/g)/h] es la velocidad específica de inactivación,  $M$  [h] es el tiempo al cual la velocidad de muerte es máxima,  $C$  [log(UFC/g)] es la diferencia entre los valores de la asíntota superior e inferior y siendo  $e$ , el número de Euler (2,7182 aproximadamente) (Gibson et al., 1988; Linton et al., 1996; Possas et al., 2017; Xiong et al., 1996). En la Fig. 2.12 se puede observar una representación gráfica de los predictores del modelo.

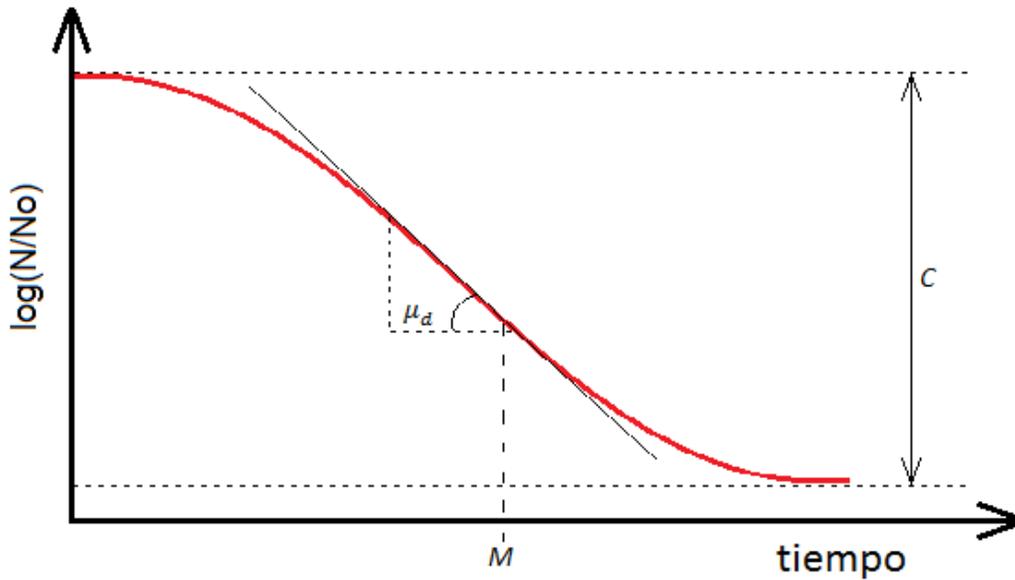


Figura 2.12. Representación gráfica de una curva de inhibición microbiana con los parámetros  $\mu_d$ ,  $C$  y  $M$  del modelo de Gompertz

### 2.6.2.2. Modelo de Weibull para inactivación microbiana

El modelo de Weibull representado como una relación semilogarítmica es útil para describir la inactivación microbiana (Ec. 2.13) (Peleg y Cole, 1988; Possas et al., 2017).

$$\log(N) = \log(N_0) - \left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta \quad (2.13)$$

donde  $\alpha$  [h] es el parámetro de escala y  $\beta$  [adimensional] es el parámetro de forma. El parámetro  $\alpha$  puede considerarse una medida de la resistencia microbiana al tratamiento (parámetro cinético) cuyo valor disminuye al aumentar la intensidad del mismo y  $\beta$  describe las formas de la curva de supervivencia, de modo que cuando  $\beta < 1$ , la curva de supervivencia es cóncava hacia arriba, cuando  $\beta > 1$ , es cóncava hacia abajo, y cuando  $\beta = 1$ , es una línea recta en una escala logarítmica (igual al modelo de Bigelow) (Huang et al., 2012; Peleg y Cole, 1988; Possas et al., 2017).

### 2.6.3. Modelo matemático para la estimación de $a_w$ en pescado

Lupín et al. (1981) establecieron una relación lineal entre la actividad de agua ( $a_w$ ) de distintos productos pesqueros salados y la molalidad de NaCl en el producto (Ec. 2.14) considerando que el NaCl está en solución en el contenido de agua total del producto. Para ello utilizaron datos encontrados en la literatura sobre bacalao salado (*Gadus rnorhua*) en el intervalo correspondiente a la salazón húmeda, anchoíta en salazón (*Engraulis encrasicolus*) y botarga (huevas de pescado saladas y secas) (*Mugil cephalus*).

$$(a_w)_{sf} = a_w^0 - b.m = 1.002 - 0.042.m \quad (2.14)$$

donde:

$(a_w)_{sf}$ : actividad de agua del producto de pescado salado

m: molalidad del soluto

$a_w^0$ : actividad de agua a molalidad cero

b: alcance de línea recta (Lupín et al., 1981)

### 2.6.4. Modelos matemáticos de la cinética de transferencia de masa

#### 2.6.4.1. Modelo de Peleg

Peleg (1988) propuso una ecuación de sorción de dos predictores:

$$x_t = x_0 \pm \frac{t}{k_{p1} + k_{p2}.t} \quad (2.15)$$

donde:

$x_t$  corresponde a la fracción másica de agua o sal (base seca, g/gbs) al tiempo de deshidratación  $t$  (h)

$x_0$  es la fracción másica de agua o sal (base seca, g/gbs) inicial ( $t = 0$ )

$k_{P1}$  es la constante de velocidad de Peleg (h/(g/gbs)) y  $k_{P2}$  es la constante de capacidad de Peleg (1/(g/gbs)).

En la Ec. 2.15 el signo “±” corresponde a “+” para ganancia de NaCl y a “-“ para la pérdida de agua. La constante de velocidad ( $k_{P1}$ ) se relaciona con la velocidad de transferencia de masa al inicio del proceso ( $t = t_0$ ) (Ec. 2.16). La constante de capacidad  $k_{P2}$  se correlaciona con los valores de humedad y sal alcanzables a  $t \rightarrow \infty$ , donde  $x_t = x_e$  (Ec. 2.17).

$$\frac{dx}{dt} = \pm \frac{1}{k_{P1}} \quad (2.16)$$

$$x_e = x_0 \pm \frac{1}{k_{P2}} \quad (2.17)$$

#### 2.6.4.2. Modelo de Zugarramurdi y Lupín (ZyL)

Zugarramurdi y Lupín (1977 y 1980) propusieron un modelo matemático (Ec. 2.18) para explicar la dinámica de salado de pescado, con una aproximación exponencial a los valores de sal y agua de equilibrio.

$$\frac{dx_t}{dt} = k_{ZL}(x_e - x_t) \quad (2.18)$$

donde:

$x_t$  es la fracción másica de agua o sal (base seca, g/gbs) al tiempo de deshidratación  $t$  (h)

$x_e$  corresponde a los valores de equilibrio (base seca, g/gbs)

$k_{ZL}$  es la constante de velocidad específica ( $h^{-1}$ ).

Integrando la Ec. 2.18 con la condición inicial  $x_{t=0} = x_0$  se obtiene (Ec. 2.19):

$$x_t = x_0 \cdot e^{-k_{ZL} \cdot t} + x_e \cdot (1 - e^{-k_{ZL} \cdot t}) \quad (2.19)$$

### 2.6.4.3. Modelo de Weibull

El modelo probabilístico de Weibull (Ec. 2.20) describe el comportamiento de sistemas o eventos que tienen algún grado de variabilidad y es utilizado para describir diversas cinéticas, entre ellas, la deshidratación osmótica. La función de densidad de la distribución de probabilidad de Weibull se puede escribir como (Cunha et al., 1998; Corzo y Bracho, 2008):

$$f(t) = \begin{cases} \frac{\beta}{\alpha} \left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta-1} e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta}, & t > 0 \\ 0, & t < 0 \end{cases} \quad (2.20)$$

Si se considera que  $n_t$  corresponde a la fracción de un componente dado  $x$ , que cambia desde un valor inicial ( $x_0$ ) hasta un valor de equilibrio ( $x_e$ ) y que el tiempo requerido para alcanzar un cierto valor de  $n_t$  está representado por la variable continua y aleatoria  $G$ , con una función de densidad de la probabilidad  $f(t)$ , donde  $f(t)$  es la función de distribución de Weibull, luego  $n_t$  se puede definir como la probabilidad de tener una cierta fracción de  $x$  en, al menos, un tiempo especificado  $t$ , bajo condiciones experimentales específicas (Cunha et al., 1998). Por lo tanto:

$$n_t = P(G > t) = \int_t^\infty f(u)du = 1 - F(t) = e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta} \quad (2.21)$$

siendo  $F(t)$  la distribución acumulativa correspondiente.

La fracción del contenido de agua o sal durante la deshidratación osmótica se puede expresar como

$$n_t = \frac{x_t - x_e}{x_0 - x_e} = e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta} \quad (2.22)$$

siendo  $\alpha$  (h) el parámetro de escala del modelo de Weibull,  $\beta$  el parámetro de forma (adimensional) y  $t$  (h) el tiempo de muestreo (Corzo y Bracho, 2008).

#### 2.6.4.4. Modelo de Crank para cilindro infinito

El modelo de Crank se basa en un conjunto de soluciones de la ley de difusión de Fick para diferentes geometrías (Crank, 1975). La difusión de cloruro de sodio y agua a través de los ejemplares de anchoíta entera puede ser considerada como difusión a través de un cilindro infinito de radio  $R$  en el cual la difusión es únicamente radial. La concentración es entonces una función del radio  $r$  y el tiempo  $t$ , y la ecuación de difusión resulta (Crank, 1975):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( rD \frac{\partial C}{\partial r} \right) \quad (2.23)$$

La solución analítica de la Ec. 2.23 se obtiene asumiendo lo siguiente:

- Concentraciones iniciales uniformes de agua y cloruro de sodio:  $C(r, 0) = C_0$
- Simetría de concentración en el centro:  $\frac{\partial C}{\partial r} = 0$  para  $r = 0$
- Concentraciones constantes de agua y cloruro de sodio de la superficie en el equilibrio (resistencia externa despreciable para la transferencia de masa):  $C(r, t) = C_e$  para  $r = R$
- Concentración de la solución constante

La Ecuación 2.23 y las condiciones de contorno pueden ser escritas en forma adimensional

$$\frac{\partial \varphi}{\partial \tau} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( rD \frac{\partial C}{\partial r} \right); \quad \varphi = \varphi(x, t); \quad 0 \leq x \leq 1; \quad \tau \geq 0 \quad (2.24)$$

$$\varphi(x, 0) = 1 \quad (2.25)$$

$$\frac{\partial \varphi}{\partial x} = 0 \quad x = 0, \tau > 0 \quad (2.26)$$

$$\varphi(x, \tau) = 0 \quad x = 0, \tau > 0 \quad (2.27)$$

Siendo

$$\varphi = \frac{c - c_e}{c_0 - c_e}; \quad x = \frac{r}{R}; \quad \tau = \frac{Dt}{R^2}$$

La solución de la Ec. 2.24 para la relación media de pérdida de agua y ganancia de cloruro de sodio está dada por:

$$\frac{x_t - x_e}{x_0 - x_e} = \sum \frac{4}{\delta_n^2} \exp\left(-\delta_n^2 \frac{Dt}{R^2}\right) \quad (2.28)$$

donde  $x_t$  es la pérdida de agua o la ganancia de solutos (expresado como g en base seca, g/gbs) a tiempo  $t$ ,  $x_e$  el valor de equilibrio y  $x_0$  el valor inicial,  $\delta_n$  son las raíces de la ecuación de Bessel de primer clase de orden cero:  $J_0(\delta_n) = 0$ .

El coeficiente efectivo de difusión fue calculado usando 1, 3 y 5 términos de la Ec. 2.28.

## 2.7. Análisis estadísticos

Dado que los resultados de los diferentes análisis se expresan en unos casos como variables cualitativas y en otros como cuantitativas, se emplean diferentes técnicas estadísticas para determinar diferencias significativas o relaciones entre resultados hallados (Sección 2.7.1 y 2.7.2). Por otro lado, se describen los análisis estadísticos efectuados para evaluar la bondad de ajuste de los modelos (Sección 2.7.3).

### **2.7.1. Análisis estadístico para variables cuantitativas**

A fin de determinar si los resultados (cuantitativos) obtenidos presentaban diferencias significativas se utilizaron distintas pruebas estadísticas. Para la comparación de dos medias se utilizó el test t de Student para dos muestras independientes y para dos muestras pareadas, que compara las medias de dos grupos de casos, con un nivel de significación del 5%. En caso de más de dos medias, las mismas se analizaron mediante ANOVA de un factor (tratamiento), y cuando fue necesario se incorporó la variable Bloque. Se utilizó un nivel de significación del 5%. Se aplicó el test de Tukey para comparación de medias con un nivel de significación del 5 y 10%. Los análisis se llevaron a cabo mediante el Software R project (R Development Core Team, 2008).

### **2.7.2. Análisis estadístico para variables categóricas nominales (univariado, bivariado y multivariado)**

Dado que los resultados de la caracterización fenotípica de los microorganismos provee resultados cualitativos de categorías, para analizarlos se utilizaron diferentes pruebas estadísticas para variables categóricas nominales. Los resultados de la caracterización fenotípica de las cepas representativas aisladas de muestras de sal y de muestras extraídas durante la etapa de salado húmedo (deshidratación osmótica) de anchoíta, se complementaron con resultados inéditos obtenidos por la Dra. Ing. Marina Czerner en la etapa de madurado de anchoíta. Los datos se organizaron en una tabla donde cada columna representó a cada prueba y cada fila a cada cepa representativa. De este modo, se analizó un conjunto de cepas representativas del proceso completo de salado-madurado con un total de 29 variables.

Se llevó a cabo un Análisis Univariado (distribución de frecuencia) para explorar el patrón de respuesta de cada variable. La relación entre las variables se evaluó mediante Análisis Bivariados, realizados mediante tablas de contingencia y sus correspondientes pruebas de independencia (prueba de Chi-cuadrado).

Para explorar las asociaciones entre la caracterización microbiana (pruebas bioquímicas) de las colonias representativas y la etapa del proceso de elaboración (origen de aislamiento) se realizó un Análisis de Correspondencias Múltiples (ACM). El ACM es una técnica de reducción de datos que transforma los resultados de las variables en dimensiones (la cantidad de dimensiones corresponde a la diferencia entre la suma de categorías de variables y el número de variables) que luego son reducidas (Soares Costa et al., 2013). Para este análisis, el origen de aislamiento se estableció como una variable suplementaria. En primera instancia se aplicó la prueba de Chi-cuadrado al conjunto de datos para seleccionar las variables significativas ( $p < 0.05$ ) para el ACM y posteriormente se realizó el análisis.

El ACM fue seguido por un Análisis de Cluster para agrupar las observaciones, dado que estos dos análisis se consideran complementarios. El ACM mediante la reducción de variables contribuye a que el Análisis de Cluster sea más robusto (Escofier y Pagès, 1998; Soares Costa et al., 2013). Para esta determinación se aplicó un Agrupamiento Jerárquico de Componentes Principales (AJCP) para clasificar los aislamientos de acuerdo con características comunes y no comunes. Para medir distancias se utilizó el método K-Means. Las pruebas estadísticas se utilizaron para medir la especificidad de la clase (grupo) y la homogeneidad a través de la proporción de cada modalidad (respuesta para cada variable) en la clase (Cla/Mod) y la proporción de cada clase en la modalidad (Mod/Cla), respectivamente. El criterio para indicar las variables que describen cada grupo fue Cla/Mod y Mod/Cla mayor que 50% (Escofier y Pagès, 1998; Lebart et al., 1995).

Para todos los análisis estadísticos, se utilizó el lenguaje R (R Core Team, 2014).

### **2.7.3. Análisis estadístico de bondad de ajuste de los modelos**

El ajuste y la precisión los ajustes de los modelos a los datos experimentales se realizó con el programa OriginPro 9.1. La bondad de ajuste de los modelos se analizó mediante la evaluación de diversos factores: el coeficiente de determinación ajustado ( $\bar{R}^2$ ,

Ec. 2.29); la raíz del error cuadrático medio (*RMSE*, Ec. 2.31) (Alzamora et al., 2005), el error estándar de los estadísticos del modelo (OriginLab, 2017) y el error relativo de las predicciones (*E*, Ec. 2.32) según corresponda.

$$\bar{R}^2 = 1 - (1 - R^2) \left[ \frac{N-1}{N-(P+1)} \right] \quad (2.29)$$

$$R^2 = 1 - \frac{RSS}{TSS} = 1 - \frac{\sum(y_{observado} - y_{predicho})^2}{\sum(y_{observado} - \bar{y}_{observado})^2} \quad (2.30)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum(y_{observado} - y_{predicho})^2}{N}} \quad (2.31)$$

$$E = \left| \frac{y_{observado} - y_{predicho}}{y_{observado}} \right| \cdot 100 (\%) \quad (2.32)$$

donde  $y_{observado}$  es el valor experimental,  $\bar{y}_{observado}$  es el promedio de los valores experimentales,  $y_{predicho}$  es el valor calculado por el modelo,  $N$  es el número de observaciones (tamaño de la muestra) y  $P$  es el número de predictores del modelo. *TSS* (total sum of squares) es la suma de cuadrados total y *RSS* (residual sum of square) es la suma de cuadrados residual.

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se puede utilizar para cuantificar qué tan bien un modelo se ajusta a los datos. Cuanto más cercano es el valor de  $R^2$  a la unidad, mejor es el ajuste del modelo.  $R^2$  siempre aumentará cuando se agrega un nuevo predictor sin que este hecho esté necesariamente indicando un mejor ajuste. Cuando se evalúan modelos con diferente número de predictores se puede utilizar el  $R^2$  ajustado ( $\bar{R}^2$ ). El  $\bar{R}^2$  es una versión modificada de  $R^2$ , que se ajusta para el número de predictores en la línea ajustada que mide el porcentaje de variación de la variable dependiente teniendo en cuenta el número de predictores incluidos en el modelo (Huang et al., 2012; Tellinghuisen y Bolster, 2011).

Para medir la desviación promedio entre los valores observados y predichos se suele utilizar el *RMSE* (menor *RMSE*, menor es la varianza residual y mayor es el ajuste del

modelo) (Huang et al., 2012). Por otro lado, el error estándar de un estadístico (desviación estándar de la distribución muestral de un estadístico) determina el intervalo de confianza de la medida correspondiente y puede dar una idea de la precisión de los valores ajustados. Típicamente, la magnitud de los valores de error estándar debe ser mucho menor que los valores ajustados. Si los valores de error estándar son elevados, el modelo de ajuste podría estar sobreparametrizado (OriginLab, 2017; Torres et al., 2012).

**CAPÍTULO 3: Evaluación de la dinámica  
microbiana y transferencia de masa durante el  
proceso de salado-madurado de *E. anchoíta***

---

### 3.1. Introducción

El proceso de salado-madurado de anchoíta sigue dos etapas principales: 1) la deshidratación osmótica por vía húmeda (salado húmedo, salmuereado o presalado), en el cual los ejemplares enteros de anchoíta se colocan en contenedores de plástico con salmuera saturada, en una relación próxima a 1:1 de pescado a salmuera, lo que conduce a una reducción de la actividad del agua de 0,99 a 0,80-0,84 con el objetivo de limitar el desarrollo eventual de microorganismos patógenos o deteriorantes; y 2) maduración, donde las anchoítas saladas, descabezadas y parcialmente evisceradas se colocan en barriles alternando capas de pescado y sal (salado por vía mixta o piclado) y se almacenan, según lo establecido por el Código Alimentario Argentino, por un período mínimo de 5 meses, permitiendo que se lleven a cabo transformaciones físico-químicas y enzimáticas para lograr las características sensoriales deseadas (Czerner y Yeannes, 2013, Zugarramundi y Lupín, 1977).

Para obtener un producto inocuo y de características sensoriales típicas, son importantes todos los cambios que ocurren desde la captura hasta obtener producto final. El principal factor que limita la durabilidad del pescado fresco es la actividad microbiana. En pescado se pueden encontrar *Clostridium* spp y *Pseudomonas* spp., entre otros, que son considerados la microbiota autóctona, o *Salmonella* spp, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y otros considerados no autóctonos. La presencia de estos microorganismos y sus pueden inferir calidad de la materia prima y del agua de la zona de captura, así como también pueden indicar posibles contaminaciones durante la manipulación. Algunos de ellos están presentes durante el deterioro sin ser causantes del mismo. En pescado fresco almacenado en refrigeración las Bacterias Específicas del Deterioro (BED) son *Shewanella putrefaciens* y *Photobacterium phosphorium* (Huss,1994 y 1999; Pons-Sánchez-Cascado, 2005; Hozbor et al., 2006; Vergaray et al., 2007).

La preservación de la anchoíta salada-madurada se debe a su alto contenido de NaCl (14-20% p/p) y baja actividad de agua ( $a_w \sim 0,75$ ) (Filsinger et al., 1987) que impide el crecimiento de bacterias patógenas y deteriorantes típicas del pescado fresco (Yeannes,

2006). La fermentación de alimentos madurados con alto contenido de sal, conduce al crecimiento de gran diversidad de bacterias y arqueas halófilas o halotolerantes (Ventosa et al., 1998; Czerner y Yeannes, 2014). Estos microorganismos pueden proceder tanto de la anchoíta como de la sal (Fuselli et al., 2003; Yeannes, 2006). Durante el salado-madurado de anchoíta, los principales cambios en la microbiota se dan en las etapas de salado húmedo y maduración (Ramírez et al., 1994; Hernández-Herrero et al., 1999; Czerner y Yeannes, 2014; Pons-Sánchez-Cascado, 2005). El salado húmedo es una etapa crítica a fin de garantizar un producto inocuo, mientras que la maduración tiene como objetivo lograr los cambios físico-químicos que le dan las características típicas al producto. Por ello, resulta de particular interés evaluar los cambios microbiológicos durante el salado húmedo desde un punto de vista cinético. Para tal fin, son ampliamente utilizados los modelos matemáticos empíricos de crecimiento e inhibición microbiana a partir de los cuales es posible estimar diversos parámetros, como la velocidad específica de crecimiento y tiempo de la fase *lag* o, en caso de evidenciarse inhibición, la velocidad específica de muerte (Huang et al., 2012; McMeekin et al., 1993; López et al., 2004). Dado que los cambios microbiológicos se deben al aumento del contenido de sal y consecuente disminución de la actividad de agua (Czerner y Yeannes, 2014), cobra importancia el estudio microbiológico en simultáneo a la cinética transferencia de masa (sal y agua) y evolución de la actividad de agua.

Para el diseño de la experiencia de evaluación de la etapa de salado húmedo se tuvo en cuenta que la FDA (*Food and Drug Administration*) viene solicitando a los saladeros marplatenses la adecuación a sus normas de exportación en su totalidad y que una de las últimas solicitudes corresponde a la necesidad de refrigeración de la etapa de salado húmedo, no aceptando predicciones por modelos para determinar si el proceso tradicional en el que se efectúa esta etapa a temperatura ambiente es suficiente.

Por ello, se efectuó el seguimiento de esta etapa en una empresa marplatense mediante evaluaciones físico-químicas y microbiológicas a fin de analizar la evolución de la transferencia de masa (sal y agua) y actividad de agua en los ejemplares de anchoíta

parcialmente descamada en condiciones ambiente y de refrigeración, así como también la evolución microbiológica en el proceso tradicional (ambiente).

A fin de determinar el acercamiento de los datos reales a los modelos, los análisis fisicoquímicos y microbiológicos se complementaron con modelos cinéticos a fin de explicar mejor los factores controlantes en los procesos. Para ello se utilizaron modelos cinéticos de transferencia de masa empíricos (modelos de Weibull, de Peleg y de Zugarramurdi y Lupín) y difusivos (modelo de Crank para cilindro infinito) (Corzo y Bracho, 2008; Crank, 1975; Czerner y Yeannes, 2013; Gómez-Salazar et al., 2015; Peleg, 1988; Zugarramurdi y Lupín, 1977 y 1980), así como también modelos cinéticos de crecimiento microbiano (modelo de Gompertz y Lógico) e inhibición microbiana (modelos de Gompertz y de Weibull) (Crettaz Minagilia et al., 2017; Linton et al., 1996; Peleg y Cole, 1988; Zwietering et al., 1990). Además, se utilizó el modelo propuesto por Lupín et al. (1981) para la estimación de la actividad de agua en pescado salado y se efectuaron evaluaciones de la biodiversidad en el transcurso de la etapa (índice de abundancia relativa e índice de Shannon) (Gotelli y Colwell, 2001; Shannon, 1948).

Asimismo, debido a que los estudios enfocados en la influencia de la microbiota autóctona del pescado y no autóctona durante el proceso de salado-madurado de *E. anchoíta* son escasos, en este capítulo se realiza un análisis integral de la microbiota de la *E. anchoíta* de diferentes estadios del proceso de elaboración de anchoíta-salada madurada, así como también de muestras provenientes de diversos saladeros de la ciudad de Mar del Plata. En este sentido, se realiza una evaluación del comportamiento microbiano durante el procesamiento mediante estimaciones de porcentajes de ocurrencia y biodiversidad por el índice de Shannon (Gotelli y Colwell, 2001; Shannon, 1948).

## **3.2. Resultados y discusión**

### **3.2.1. Evaluación microbiológica de anchoíta de diferentes etapas y plantas elaboradoras de la ciudad de Mar del Plata**

Los resultados de los análisis microbiológicos se presentan a continuación. En primera instancia se explican según el estadio del proceso (anchoíta fresca, anchoíta durante el salado-húmedo, anchoíta durante la maduración) y luego en conjunto, así como también se presentan estimaciones de la biodiversidad.

#### **3.2.1.1. Análisis microbiológicos de anchoíta fresca**

Para identificar las muestras analizadas se asignó la nomenclatura definida en la Sección 2.2.1, la cual se describe en la Tabla 3.1. En las muestras de anchoíta fresca no fueron detectadas *Salmonella* spp., enterococos, coliformes fecales, *E. coli* ni *Clostridium* sulfito-reductores (CSR). Se hallaron *S. aureus* en la muestra A-AF1/p y *Pseudomonas* spp. en las muestras A-AF1 (branquias, piel e intestino) y E-AF1. En las muestras A-AF1/p y D-AF1 se encontraron microorganismos halófilos, hallando BH15 en la primera y BH15 y BH20 en la segunda. En todas las muestras analizadas se detectaron mohos y levaduras se hallaron.

Como se puede observar en la Tabla 3.1, se encontraron enterobacterias y coliformes totales en recuentos menores a  $10^4$  UFC/g ( $<4 \log(\text{UFC/g})$ ). Los recuentos de bacterias aerobias encontrados fueron del orden de  $10^2$ - $10^7$  UFC/g (2,36-7,62  $\log(\text{UFC/g})$ ), correspondiendo los más elevados a los efectuados a 7 y 25°C. De acuerdo a Huss (1997) y Mossel et al. (2003) en pescado fresco los recuentos de psicrótrofos del orden de  $10^7$  UFC/g ( $\sim 7 \log(\text{UFC/g})$ ) se consideran elevados.

**Tabla 3.1:** Análisis de bacterias aerobias, enterobacterias, coliformes totales y halófilas de anchoíta fresca

Lote	Descripción de la muestra	Código	Bacterias aerobias			EB [log(UFC/g)]	CT [log(UFC/g)]
			[log(UFC/g)]				
			BA35	BA25	BA7		
A	AF1: fresca (branquias, piel, intestino)	A-AF1/b	2,36 (0,02)	4,62 (0,07)	4,26 (0,05)	1,18 (0,08)	2,49 (0,07)
		A-AF1/p	2,71 (0,08)	4,57 (0,08)	4,34 (0,09)	2,02 (0,07)	2,28 (0,03)
		A-AF1/i	2,69 (0,08)	2,86 (0,06)	2,83 (0,06)	1,81 (0,07)	2,79 (0,09)
B	AF1: fresca (branquias, piel, músculo)	B-AF1/b	2,43 (0,10)	6,64 (0,07)	6,80 (0,26)	3,28 (0,09)	2,72 (0,01)
		B-AF1/p	5,20 (0,03)	7,15 (0,03)	7,36 (0,07)	3,59 (0,04)	2,00 (0,06)
		B-AF1/m	5,59 (0,09)	7,17 (0,08)	7,62 (0,06)	2,48 (0,07)	2,53 (0,02)
C	AF1, AF2, AF3: fresca (3 muestras)	C-AF1	3,43 (0,03)	NA	4,38 (0,03)	2,57 (0,08)	2,42 (0,03)
		C-AF2	3,70 (0,05)	NA	5,46 (0,09)	3,57 (0,09)	3,44 (0,08)
		C-AF3	3,73 (0,03)	NA	4,86 (0,04)	2,08 (0,03)	1,95 (0,04)
D	AF1: fresca	D-AF1	3,58 (0,06)	4,53 (0,11)	NA	1,66 (0,09)	1,58 (0,01)
E	AF1: fresca	E-AF1	4,46 (0,09)	NA	4,97 (0,02)	3,88 (0,03)	3,81 (0,02)

NA: No analizado. BA35: Bacterias Aerobias a 35°C; BA25: Bacterias Aerobias a 25°C; BA7: Bacterias Aerobias a 7°C; EB: enterobacterias; CT: Coliformes totales.  
Valor medio (desviación estándar)

### 3.2.1.2. Análisis microbiológicos de anchoíta salada

En las muestras de anchoíta correspondientes a la etapa de salado húmedo (muestras identificadas según nomenclatura definida en la Sección 2.2.1 y descrita en la Tabla 3.2), no se detectaron *Salmonella* spp., enterococos, coliformes fecales, *E. coli*, *Pseudomonas* spp., *S. aureus* ni mohos y levaduras. *Clostridium* sulfito-reductores CSR (1 log(UFC/g)) se encontraron en la muestra G-AS1. Como se observa en la Tabla 3.2, los recuentos de bacterias aerobias se hallaron en valores de  $10^2$ - $10^4$  UFC/g (2,8-4,9 log(UFC/g)). Considerando las muestras independientemente del tiempo de salado, el porcentaje de ocurrencia (% $C_i$ ) de enterobacterias y coliformes totales fue de 22,2% y 44,4%, respectivamente. Las bacterias halófilas se encontraron en todas las muestras analizadas ( $\sim 10^3$ - $10^4$  UFC/g).

**Tabla 3.2:** Análisis de bacterias aerobias, enterobacterias, coliformes totales y microorganismos halófilos de anchoíta de la etapa de salado húmedo

Lote	Descripción de la muestra	Código	Bacterias aerobias			EB [log(UFC/g)]	CT [log(UFC/g)]	Halófilas	
			[log(UFC/g)]					BH15	BH20
			BA35	BA25	BA7				
D	AS1: salada (30 h)	D-AS1	3,30 (0,08)	4,15 (0,031)	NA	ND	ND	+	+
	AS2: salada (30 h)	D-AS2	3,08 (0,03)	3,80 (0,13)	NA	ND	ND	+	+
E	AS1: salada (1 h)	E-AS1	3,16 (0,08)	NA	4,29 (0,04)	ND	ND	+	+
	AS2: salada (30 h)	E-AS2	ND	NA	2,80 (0,02)	ND	ND	+	+
F	AS1: salada (1 h)	F-AS1	3,93 (0,09)	3,92 (0,04)	NA	3,82 (0,04)	3,48 (0,08)	+	+
G	AS1: salada (12 h)	G-AS1	3,08 (0,03)	NA	3,90 (0,09)	ND	ND	+	+
H	AS1, AS2, AS3: salada (3 muestras, 12 h)	H-AS1	3,65 (0,09)	NA	2,95 (0,05)	ND	3,51 (0,01)	+	+
		H-AS2	3,04 (0,04)	NA	4,34 (0,08)	ND	2,46 (0,06)	+	+
		H-AS3	3,98 (0,05)	NA	4,85 (0,09)	1,00 (0,02)	3,64 (0,03)	+	+

+: detectado; ND: no detectado; NA: No analizado. BA35: Bacterias Aerobias a 35°C; BA25: Bacterias Aerobias a 25°C; BA7: Bacterias Aerobias a 7°C; EB: enterobacterias; CT: Coliformes totales; BH15: Microorganismos halófilos con 15% NaCl p/v; BH20: Microorganismos halófilos con 20% NaCl p/v. Valor medio (desviación estándar)

### 3.2.1.3. Análisis microbiológicos de anchoíta madurada

En las muestras con diferentes tiempos de maduración (identificadas según nomenclatura de la Sección 2.2.1 y Tabla 3.3), no se detectaron *Salmonella* spp.,

enterococos, coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli*, *S. aureus*, enterobacterias ni mohos y levaduras. CSR se detectaron en las muestras J-AM1 y I-AM1. Esta última corresponde al primer día de maduración, dando ausencia al tercer y sexto día. La investigación para *C. perfringens* resultó negativa. Como se puede ver en la Tabla 3.3, las determinaciones de bacterias aerobias variaron desde ND hasta  $\sim 10^5$  UFC/g (4,56 log(UFC/g)), mientras que en la totalidad de las muestras se hallaron bacterias halófilas ( $\sim 10^3$ - $10^4$  UFC/g).

**Tabla 3.3:** Análisis de bacterias aerobias, enterobacterias y coliformes totales de anchoíta de la etapa de maduración

Lote	Descripción de la muestra	Código	Bacterias aerobias [log(UFC/g)]	
			BA35	BA25
I	AM1: en maduración (día 1)	I-AM1	2,76 (0,09)	3,46 (0,04)
	AM2: en maduración (día 3)	I-AM2	2,80 (0,01)	3,70 (0,09)
	AM3: en maduración (día 6)	I-AM3	2,83 (0,09)	3,94 (0,04)
J	AM1, AM2: maduración completa	J-AM1	1,48 (0,02)	1,70 (0,089)
		J-AM2	2,32 (0,04)	2,40 (0,03)
K	AM1: maduración completa	K-AM1	ND	ND
L	AM1, AM2, AM3: maduración completa	L-AM1	2,30 (0,09)	3,20 (0,047)
		L-AM2	3,15 (0,01)	3,58 (0,06)
		L-AM3	3,23 (0,08)	4,56 (0,04)

ND: no detectado. BA35: Bacterias Aerobias a 35°C; BA25: Bacterias Aerobias a 25°C.  
Valor medio (desviación estándar)

### 3.2.1.4. Evaluación del comportamiento microbiano durante el procesamiento

A fin de analizar los cambios al completar cada tratamiento, se estimaron los porcentajes de ocurrencia ( $\%C_i$ ) de los microorganismos según la etapa de procedencia de la muestra (Tabla 3.4), así como los índices de Shannon ( $H$ ) por etapa. Para los cálculos se ponderaron los resultados de las muestras cuyo tratamiento se había completado (tiempo de salado húmedo mayor a 12 h y de maduración mayor a 5 meses).

**Tabla 3.4:** Porcentajes de ocurrencia ( $\%C_i$ ) de los microorganismos según cada etapa de proceso

	$\%C_i$		
	Anchoíta fresca	Anchoíta salada	Anchoíta madurada
Bacterias Aerobias a 35°C	100	88,9	83,3
Bacterias Aerobias a 25°C	100	100	83,3
Bacterias Aerobias a 7°C	100	100	NA
Enterobacterias	100	28,6	0
Coliformes totales	100	57,1	0
Coliformes fecales	0	0	0
<i>E. coli</i>	0	0	0
<i>S. aureus</i>	11,1	0	0
<i>Pseudomonas</i> spp.	40,0	0	NA
<i>Salmonella</i> spp.	0	0	0
Enterococos	0	0	0
<i>Clostridium</i> aulfito-reductores	0	14,3	0
Mohos y levaduras	100	0	0
Microorganismos halófilos con 15 % NaCl p/v	33,3	100	100
Microorganismos halófilos con 20 % NaCl p/v	16,7	100	100

NA: no analizado.

Como se puede observar en la tabla 3.4, tanto en anchoíta fresca como durante el salado y el madurado se encontraron bacterias aerobias totales. En anchoíta fresca la ocurrencia ( $\%C_i$ ) fue 100% para los diferentes microorganismos aerobios estudiados

(BA35, BA25 y BA7). Al avanzar en el proceso, se observó la tendencia decreciente de la ocurrencia de microorganismos aerobios así como también la disminución de los recuentos (Tablas 3.1, 3.2 y 3.3). En ejemplares frescos se encontraron mayores recuentos que en aquellos salados y madurados, lo que se corresponde con la inhibición bacteriana dada por el aumento del contenido de NaCl y consecuente disminución de  $a_w$  (Huss, 1994; Mateus et al., 2016; Yeannes, 2006). En productos pesqueros los recuentos de microorganismos a 20-25°C son importantes como indicadores de alteración incipiente y a esta temperatura se registran mayores recuentos microbianos que a 35°C (ICMSF, 1981). En el 93% de las muestras se hallaron menores recuentos a 35°C que a 25°C o 7°C (Tablas 3.1, 3.2 y 3.3). Para determinar si estas diferencias observadas eran significativas, se realizaron diferentes test estadísticos. En primera instancia se recurrió a realizar un ANOVA de dos factores, pero el modelo no fue válido por no cumplirse los supuestos. Por tal motivo, para las muestras que se disponía de resultados para BA35, BA25 y BA7, se efectuó el ANOVA de un factor (BA35, BA25 y BA7) con bloques (muestra) encontrando que había diferencias significativas ( $p=0,001$ ), y mediante el test de Tukey se determinó que BA35 resultó significativamente diferente de BA25 y BA7. Por otro lado, las muestras restantes sobre las cuales se determinó el crecimiento de bacterias aerobias a dos temperaturas (BA35 y BA25 o BA7), se analizaron mediante test-t de comparación de medias para muestras dependientes (pareadas). Los resultados a los que se arribó fueron a que había diferencias significativas entre BA35 y la otra temperatura de incubación (25 o 7°C) (BA35 y BA25:  $p=0,000$ ; BA35 y BA7:  $p=0,005$ ). De este modo, se analizó la totalidad de los datos disponibles encontrando que los recuentos efectuados a 35°C fueron significativamente menores que los realizados a 25°C o 7°C.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con los encontrados en la literatura en cuanto a que aerobios psicrófilos y psicrótrofos constituyen la microbiota típica de los pescados de agua fría y de alimentos almacenados en refrigeración. Cabe destacar que los aerobios mesófilos se relacionan con la contaminación de la materia prima y dentro de este grupo se encuentran habitualmente los patogénicos, mientras que el número total de aerobios psicrófilos y psicrótrofos en el pescado se relaciona con la flora típica de los mismos y están relacionados con su deterioro. Dentro de esta microbiota deteriorante se

encuentran las Bacterias Específicas del Deterioro (BED) que son aquellas con capacidad reductora del Óxido de trimetilamina (OTMA) a trimetilamina (TMA) y las formadoras de H<sub>2</sub>S (Huss, 1999; ICMSF, 1981 y 1983).

Se hallaron coliformes totales con un porcentaje de ocurrencia (%C<sub>i</sub>) del 100% en anchoíta fresca, 57,1% en anchoíta salada y ausentes en todas las muestras de anchoíta madurada (Tabla 3.4), lo que indicaría la efectividad del proceso de conservación (Pierson y Smoot, 2001).

En ningún caso se detectó *Salmonella* spp., enterococos, coliformes fecales ni *E. coli*, en anchoíta fresca o salada y/o madurada (%C<sub>i</sub> = 0) (Tabla 3.4). En anchoíta fresca (Tabla 3.1), se encontraron enterobacterias en el orden de 10<sup>1</sup>-10<sup>3</sup> UFC/g, estando estos dentro de los valores de referencia para filetes de pescado fresco (Mossel et al., 2003), lo que indicaría que la captura se realizó en aguas no contaminadas (Huss, 1999; Vergaray et al., 2007) y que durante el proceso de elaboración no hubo contaminación de origen entérico. Al cabo del tratamiento de salado, la ocurrencia (%C<sub>i</sub>) de enterobacterias fue de 28,6% y mientras que en ejemplares madurados fue nulo, lo que podría deberse a que estos microorganismos requieren *a<sub>w</sub>* elevadas (Gutiérrez, 2008). *S. aureus* se detectó sólo en un caso en piel de anchoíta fresca (%C<sub>i</sub> = 11,1), pudiendo indicar la presencia de contaminación por manipulación. No se halló en especímenes salados ni madurados, en concordancia con la literatura dado que usualmente no se desarrolla a *a<sub>w</sub>* < 0,83 y resulta ser un microorganismo de escasa competencia frente a otros (Huss, 1997). Se hallaron mohos y levaduras en las muestras de anchoíta fresca pero no en las de salada y/o madurada. Estos microorganismos son frecuentes en la microbiota habitual de muchos alimentos y suelen asociarse a condiciones de deficiencia de manipuleo y/o proceso en alimentos. Su ausencia en muestras tratadas podría asociarse a la eficiencia del proceso y al hecho que son poco competitivos por lo que el crecimiento bacteriano podría estar inhibiendo la presencia de hongos y levaduras (Pierson y Smoot, 2001). Cabe destacar que las levaduras no son deseables durante la maduración de anchoíta dado recuentos de 10<sup>5</sup> UFC/g se han asociado a la generación de *off-odor* frutado, no característico del producto (Gram y Huss, 1996).

El porcentaje de ocurrencia (% $C_i$ ) de *Pseudomonas* spp. fue de 40% para anchoíta fresca y nulo para ejemplares salados o madurados (Tabla 3.4). Estos microorganismos constituyen parte de la microbiota habitual de pescados y son considerados específicos del deterioro de los mismos (Huss, 1999), por lo tanto su ausencia indicaría efectividad de estas etapas como proceso de conservación.

No se hallaron CSR en las muestras analizadas de anchoíta fresca y al final de la maduración, siendo de 14,3% el porcentaje de ocurrencia (% $C_i$ ) en anchoíta salada. Cabe destacar que en muestras de los comienzos de la maduración (Tabla 3.3) se encontraron CSR (*C. perfringens* negativo) en una muestra el primer día de la etapa, dando ausencia al tercer y sexto día. Dado que para anchoíta salada-madurada no se establecen criterios microbiológicos específicos en las reglamentaciones actuales del Código Alimentario Argentino (Capítulo VI, Alimentos cárneos y afines) ni en el Reglamento de la Comisión Europea (CE, 2005), se utilizan como orientativos los criterios microbiológicos para salazones crudas (CAA, 2017), encontrando que los hallazgos se encuentran dentro de los recuentos permitidos.

El porcentaje de ocurrencia de las bacterias halófilas en anchoíta fresca fue de 33,3 y 16,7% para BH15 y BH20 respectivamente, mientras que en anchoíta salada y en madurada se hallaron en todas las muestras. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores que concluyeron que los microorganismos halófilos constituyen la microbiota típica de la anchoíta salada-madurada (Czerner y Yeannes, 2014).

La biodiversidad analizada mediante el índice de Shannon a partir de los datos obtenidos resultó ser menor en anchoíta fresca ( $H = 0,09$ ) que en anchoíta salada ( $H=1,38$ ) o madurada ( $H=1,04$ ). Este hecho podría deberse a que en anchoíta fresca los microorganismos aerobios resultaron ser la microbiota dominante con recuentos de hasta  $\sim 10^7$  UFC/g, mientras que para el resto de los microorganismos los recuentos no superan las  $10^4$  UFC/g (Tabla 3.1), por ello el aporte que hacen a este índice los otros microorganismos es muy baja. Sin embargo, para los ejemplares de anchoíta salada o

madurada, la diferencia entre los recuentos para aerobios y otros microorganismos no es tan grande, resultando en un valor mayor del Índice de Shannon ( $H$ ).

### **3.2.2. Transferencia de masa durante la deshidratación osmótica por vía húmeda**

#### **3.2.2.1. Composición química proximal**

La composición química proximal de la anchoíta fresca (sin tratamiento), proveniente de capturas de septiembre de 2013 se puede ver en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5: Composición química proximal de anchoíta**

	<b>% p/p (base húmeda)</b>
Humedad	77,58 (0,29)
Proteínas	18,02 (0,51)
Lípidos	2,92 (0,24)
Cenizas	1,51 (0,02)
NaCl	0,18 (0,01)

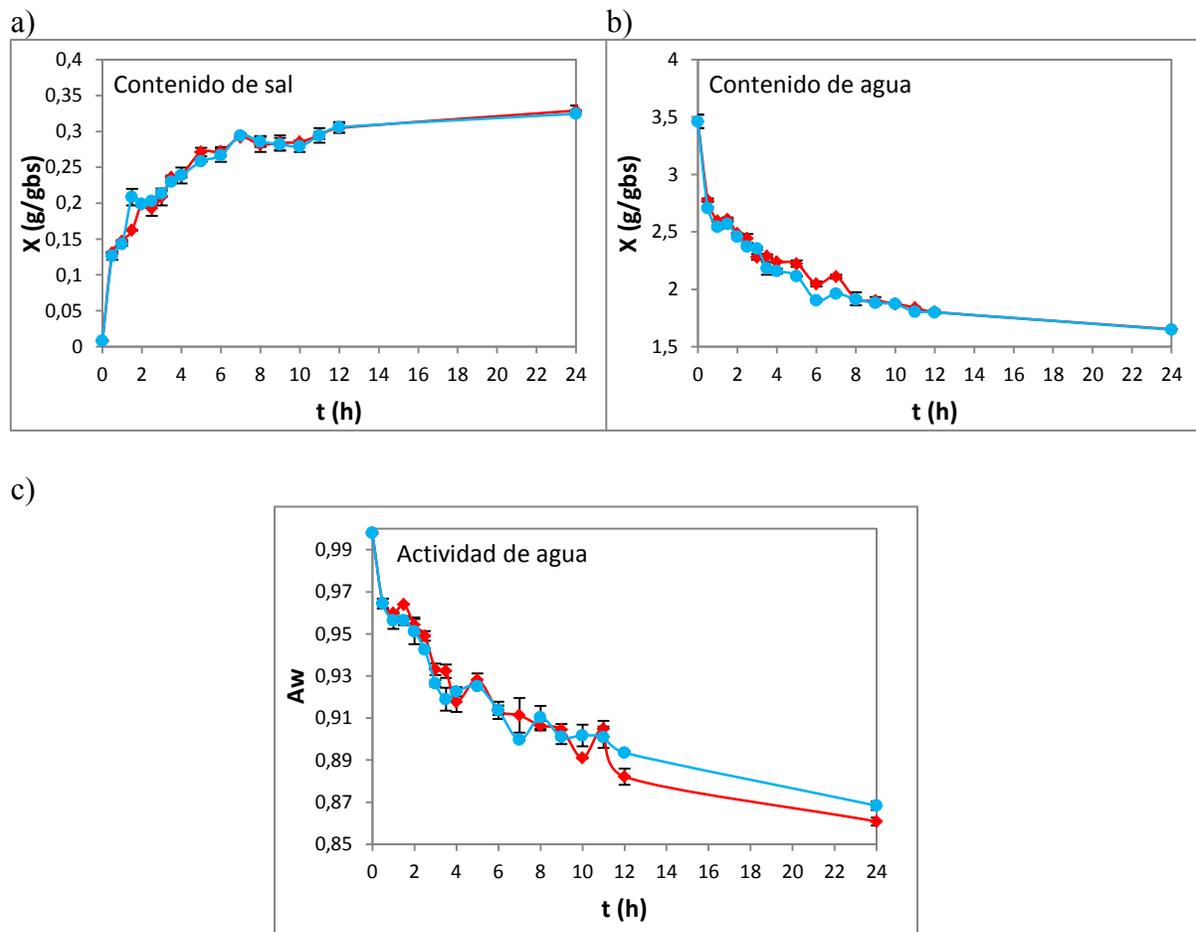
Valor medio (desviación estándar)

Cabe destacar que el contenido de lípidos y agua varía estacionalmente. Los resultados hallados concuerdan con los valores reportados para anchoíta capturada en el período de primavera, época en que el contenido de lípidos es menor (Czerner y Yeannes, 2013, Pastour Madureira et al., 2009).

#### **3.2.2.2. Cinética de la deshidratación osmótica de anchoíta entera**

Se analizó el efecto sobre el contenido de agua, la ganancia de cloruro de sodio (sal) y la actividad de agua de dos temperaturas diferentes durante la deshidratación osmótica de ejemplares de anchoíta enteros por el método de salado húmedo. Por un lado se analizó la

deshidratación en un ambiente climatizado de la planta elaboradora destinado al salado húmedo, donde se monitoreó la temperatura de la salmuera con un promedio ponderado y desviación de  $14\pm 2^{\circ}\text{C}$  y por otro lado en una cámara frigorífica donde las condiciones fueron  $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Los contenidos de cloruro de sodio y agua y la actividad de agua durante la DO se muestran en la Figura 3.1.



**Figura 3.1:** Evolución del contenido de sal (a), de agua (b) y actividad de agua (c) durante el salado húmedo de anchoíta entera parcialmente descamada a  $5\pm 1^{\circ}\text{C}$  (—●—) y  $14\pm 2^{\circ}\text{C}$  (—●—).

Tanto la evolución del contenido de sal como de agua mostraron el comportamiento característico de un proceso de absorción de sal y simultánea pérdida de agua, con una aproximación exponencial al valor de equilibrio. La  $a_w$  de los ejemplares disminuyó

durante el tratamiento. La sal se transfiere desde la solución hacia el alimento y el agua desde el alimento hacia la solución.

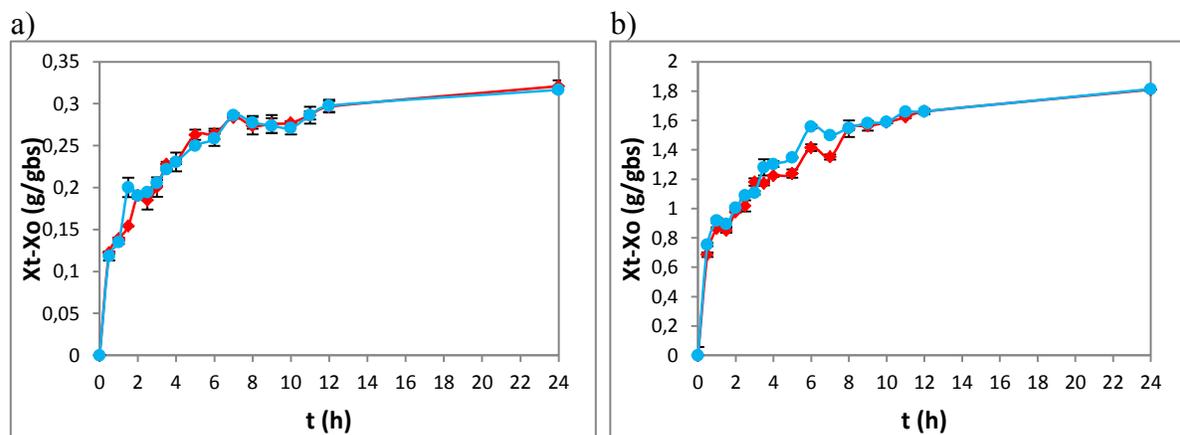
En cuanto al comportamiento del contenido de agua, no se evidenció el fenómeno de *swelling* (hinchamiento de la carne) que se define como la absorción espontánea de agua de cualquier líquido circundante, lo que resulta en un aumento de peso y volumen de las fibras musculares, lo que está correlacionado con un aumento de la capacidad de retención de agua (Hamm, 1961 y 1986).

El *swelling* es generado por la inmersión del músculo en soluciones salinas con contenidos de NaCl mayores a la fuerza iónica del músculo (Hamm, 1961; Schmidt et al., 2009) y está dado por la unión del anión cloruro (Cl<sup>-</sup>) a los filamentos de actina y de miosina, provocando un incremento en las cargas negativas y seguidamente, un aumento en las fuerzas de repulsión electrostáticas entre las moléculas de proteína adyacentes, lo cual lleva al hinchamiento del músculo (Hamm, 1986). Durante los tratamientos de salado, en el músculo se incrementa paulatinamente concentración de NaCl y cuando supera valores del 6 % (1 M), el músculo se encoge y reduce su capacidad de retención de agua (*salting out*) debido a la despolimerización de los filamentos gruesos de la miosina (Hamm, 1986; Schmidt et al., 2008). El contenido de lípidos y la temperatura han sido reportados como factores que afectan la velocidad de transferencia de masa. El efecto del contenido de lípidos se debe a que forman parte del músculo y de una capa subcutánea (Huss, 1999; Casales et al., 1992), constituyendo así un factor limitante para la penetración de la sal, ya sea debido a que ésta reemplaza la fase acuosa -que sirve de vector para la transferencia de masa- o debido a que puede representar una barrera física (Gallart-Jornet et al., 2007). Por ello, un mayor contenido de lípidos retrasa la penetración de sal. Por otra parte, el incremento de la temperatura puede acelerar la velocidad de difusión del agua y de la sal, producir ablandamiento de la estructura de la matriz sólida y reducir la viscosidad de la solución osmótica, favoreciendo la difusión de los soluto (Chiralt et al., 2001; Corzo y Bracho, 2004 y 2007; Nguyen et al., 2010). La ausencia de *swelling* en los ensayos realizados concuerdan con los resultados hallados por Czerner y Yeannes (2013), quienes observaron que el fenómeno de *swelling* en anchoíta se presenta en ejemplares de mayor

tenor graso (6-7%) a bajas temperaturas, mientras que en los ejemplares de menor contenido de lípidos no se manifestó este fenómeno ya que los mismos alcanzan más rápidamente una concentración de NaCl en el músculo superior a 1 M, concentración a la cual se reduce abruptamente su capacidad de retención de agua.

En la figura 3.2 se puede observar la pérdida de agua (expresada como la diferencia del contenido inicial de agua con el contenido de agua a tiempo  $t$ ,  $x_0 - x_t$ ) y la ganancia de sal (diferencia de contenido de sal a tiempo  $t$  con el contenido de sal inicial,  $x_t - x_0$ ) durante la DO.

El aumento en el contenido de cloruro de sodio (sal) y la disminución del contenido de agua presentaron una velocidad máxima al comienzo del proceso debido a una mayor fuerza impulsora, es decir, mayor gradiente de concentración de agua y solutos existente a ambos lados de las membranas que constituyen el alimento. Luego, se observó una disminución de la velocidad de transferencia de masa indicando la aproximación al equilibrio. Este comportamiento concuerda con el comportamiento típico descrito por diversos autores (Czerner y Yeannes, 2013; Gómez-Salazar et al., 2015; Gravier et al., 2006; Nguyen et al., 2010; Zugarramurdi y Lupín, 1980).



**Figura 3.2:** Evolución de la ganancia de sal (a) (diferencia del contenido de sal a tiempo  $t$  y el inicial,  $x_t - x_0$ ) y pérdida de agua (b) (diferencia del contenido de agua inicial y a tiempo  $t$ ,  $x_0 - x_t$ ) a  $5\pm 1^\circ\text{C}$  (●) y  $14\pm 2^\circ\text{C}$  (◆).

### 3.2.2.3. Concentración de sal en la fase líquida del músculo

Los resultados obtenidos de la concentración de sal en la fase líquida del músculo esperada en el equilibrio y la obtenida experimentalmente al cabo de 24 hs, así como también el error relativo, se muestran a continuación:

$$Z_e^{NaCl} = 16,81\%$$

$$Z_e^{NaCl} (EXPERIM) = 16,64\%$$

$$E = 1,04\%$$

En función de los resultados obtenidos, se podría asumir que durante la experiencia se llegó al equilibrio en cuanto al contenido de sal y, en consecuencia, de agua. Las  $x_e$  experimentales obtenidas se detallan en la Tabla 3.6.

**Tabla 3.6:** Concentraciones de sal y agua en el equilibrio

	T (°C)	$x_e$ [g/gbs]
Sal	14±2	0,329 ± 0,007
	5±1	0,325 ± 0,001
Agua	14±2	1,651 ± 0,011
	5±1	1,648 ± 0,008

Valor medio ± error estándar

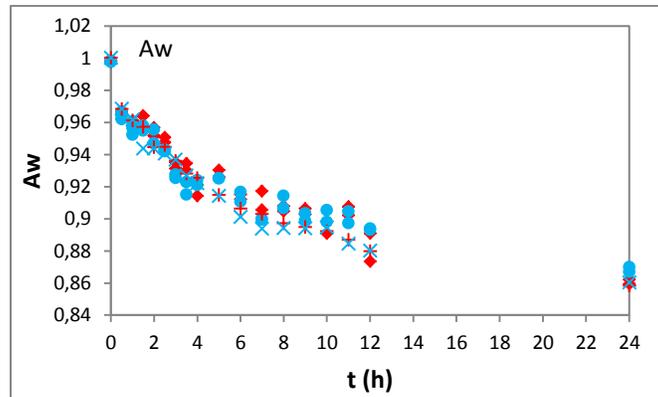
Las  $x_e$  experimentales de sal y agua para las condiciones de temperatura resultaron similares, lo que se corresponde con lo reportado por Czerner y Yeannes (2013). Dichos autores encontraron que la  $x_e$  de la sal no se veía afectada por el contenido de lípidos de la anchoíta. Además, encontraron que la  $x_e$  de la sal era 0,309-0,360 (base seca, g/gbs) en el tratamiento de salado; y la de agua ~ 2 (base seca, g/gbs) para ejemplares con un contenido

de lípidos cercano. El valor de equilibrio para el contenido de sal se correspondió con el rango mencionado, mientras que el contenido de agua en el equilibrio fue levemente menor. En cuanto al tiempo requerido para alcanzar el equilibrio, en la Fig. 3.2 se puede observar que próximo a las 24 hs de tratamiento, los cambios en la ganancia de sal y pérdida de agua se ven considerablemente disminuidos. Esto indicaría que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en las condiciones analizadas es alrededor de 1 día, en concordancia con el tiempo estimado por Czerner y Yeannes (2013).

#### **3.2.2.4. Ajuste de actividad de agua**

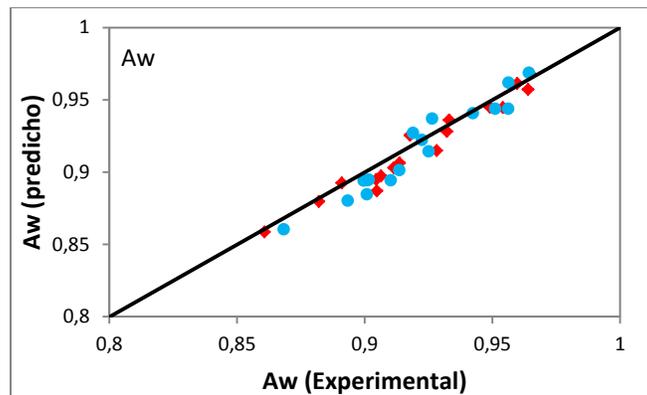
A fin de determinar la bondad de ajuste del modelo de Lupín et al. (1981) para predecir la  $a_w$  en *Engraulis anchoita* en el rango de contenido de sal de esta especie durante el tratamiento de salado húmedo, se estimó la  $a_w$  esperada según la molalidad del pescado a cada tiempo de muestreo, abarcando así un amplio contenido de sal que va desde 0,18 hasta 12,4 % NaCl p/p (base húmeda), es decir, a molalidades de 0,04 a 3,45 respectivamente. Cabe destacar que el modelo se desarrolló para molalidades de 0 a 8. Sin embargo, en el rango de 0 a 4 se utilizaron principalmente datos de botarga y en menor cantidad de bacalao salado. A molalidades mayores (entre 6 y 8) se ubicaron los datos de *E. encrasicolus*. Sin embargo, según las búsquedas bibliográficas realizadas, el modelo no ha sido validado para *E. anchoita* en ningún rango de concentración como así tampoco para especies pertenecientes al género *Engraulis* en el rango de 0 a 4 molal.

Los valores obtenidos experimentalmente y los predichos por el modelo se pueden observar en la Fig. 3.3.



**Figura 3.3:** Actividad de agua experimental a  $5\pm 1^{\circ}\text{C}$  ( ● ) y  $14\pm 2^{\circ}\text{C}$  ( ◆ ) y estimada a  $5\pm 1^{\circ}\text{C}$  ( × ) y  $14\pm 2^{\circ}\text{C}$  ( + ).

Como se puede observar en la Fig. 3.3, los valores estimados por el modelo de Lupín et al. (1981) pueden ser de utilidad para predecir la  $a_w$  de la anchoíta en el rango analizado. Esto se verifica mediante la comparación de las concentraciones experimentales y las estimadas expuestas en la Fig. 3.4, donde se observa que el modelo tiene un buen ajuste dado que los puntos tienen una tendencia lineal manteniéndose próximos a la recta de  $45^{\circ}$ .



**Figura 3.4:** Correlación entre actividad de agua experimental y estimada de las experiencias a  $5\pm 1^{\circ}\text{C}$  ( ● ) y  $14\pm 2^{\circ}\text{C}$  ( ◆ ). Recta a  $45^{\circ}$  ( — ).

En base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que el modelo resulta confiable para predecir la  $a_w$  de *E. anchoita* durante el salado húmedo.

### 3.2.2.5. Modelo de Peleg

El modelo de Peleg descrito en la Sección 2.6.4 se utilizó para evaluar las constantes de velocidad de Peleg ( $k_{p1}$ ) y de capacidad de Peleg ( $k_{p2}$ ). Los estadísticos y los valores de equilibrio para agua y sal estimados con el modelo de Peleg a diferentes temperaturas se muestran en la Tabla 3.7, así como también los estimadores del ajuste ( $RMSE$ ,  $\bar{R}^2$  y el error relativo de la  $x_e$  ( $E$ ))

**Tabla 3.7:** Parámetros de la evolución del contenido de agua y sal estimados con el modelo de Peleg

	T (°C)	$k_{p1}$ [h/(g/gbs)]	$k_{p2}$ [1/(g/gbs)]	$RMSE$	$\bar{R}^2$	$x_e$ [g/gbs]	$E$ [%]
Sal	14±2	4,540 ± 0,297	3,054 ± 0,061	0,014	0,97	0,336	2,00
	5±1	3,954 ± 0,276	3,152 ± 0,060	0,015	0,96	0,325	0,12
Agua	14±2	0,867 ± 0,058	0,555 ± 0,016	0,010	0,95	1,739	5,34
	5±1	0,750 ± 0,049	0,552 ± 0,010	0,097	0,95	1,729	4,94

Valor medio ± error estándar

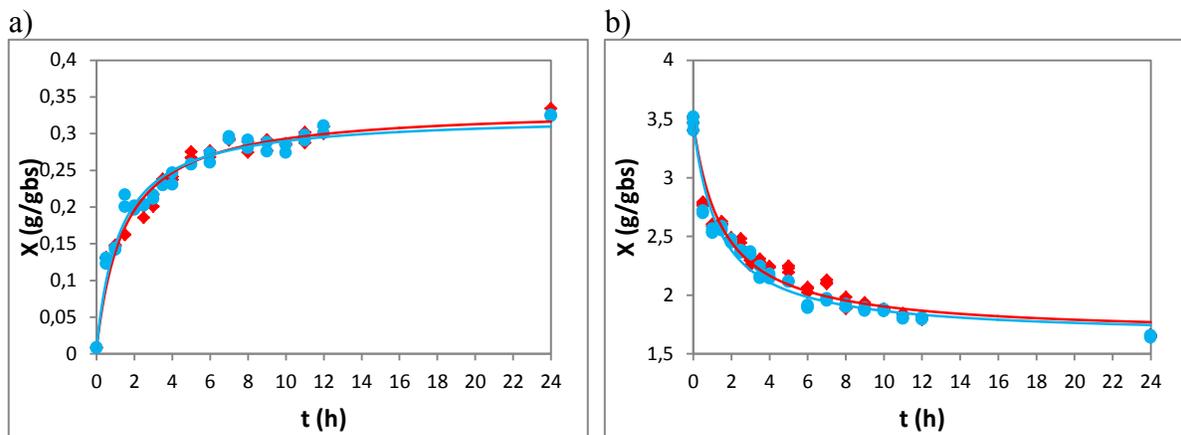
Tanto la constante de velocidad de Peleg ( $k_{p1}$ ) resultó levemente mayor para la experiencia a 14±2°C que a 5±1°C, mientras que la constante de capacidad de Peleg ( $k_{p2}$ ) se mantuvo en valores del mismo orden para las dos condiciones estudiadas. La constante de velocidad  $k_{p1}$  obtenida resultó ~ 4 h/(g/gbs) para la ganancia de sal y ~ 0,8 h/(g/gbs) para la pérdida de agua. La constante de capacidad  $k_{p2}$  estimada fue ~ 3 (1/(g/gbs)) para la ganancia de sal y ~ 0,5 (1/(g/gbs)) para la pérdida de agua. Resultados análogos fueron reportados por Czerner y Yeannes (2013) para anchoíta de contenido de lípidos similar.

Los valores de equilibrio obtenidos a partir de la Ec. 2.17 se muestran en la Tabla 3.7. Los valores de la pérdida de agua en el equilibrio para tiempos de inmersión largos estimados por el modelo de Peleg fueron mayores que los valores experimentales. Esto puede deberse al hecho que la proporción de pescado/salmuera fue aproximadamente 1:1 para el presente trabajo, mientras que en las experiencias de salado ideales se utiliza una proporción mucho mayor de salmuera que de pescado. Los valores de equilibrio de sal

obtenidos con el modelo de Peleg para tiempos de inmersión largos fueron similares a los valores experimentales.

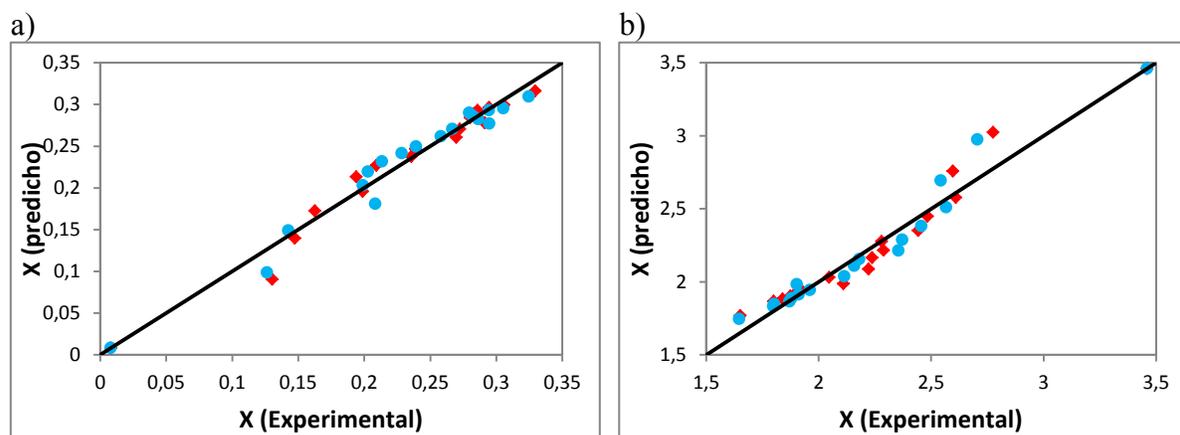
Los valores del coeficiente de determinación ajustado ( $\bar{R}^2$ ) fueron mayores a 0,95 y los de  $RMSE$  fueron menores a 0,015 en todos los casos. De acuerdo a los parámetros estadísticos utilizados para analizar la bondad de ajuste ( $RMSE$  y  $\bar{R}^2$ ), el modelo de Peleg describe adecuadamente la cinética de la transferencia de masa durante la DO de ejemplares de anchoíta enteros parcialmente descamados.

El ajuste de los datos experimentales al modelo de Peleg se puede ver en la Figura 3.5.



**Figura 3.5:** Ajuste del modelo de Peleg a la cinética del contenido de sal (a) y agua (b): valores experimentales a  $5\pm 1^\circ\text{C}$  (●) y  $14\pm 2^\circ\text{C}$  (◆) y estimados a  $5\pm 1^\circ\text{C}$  (—) y  $14\pm 2^\circ\text{C}$  (—).

Las concentraciones experimentales y las estimadas para la transferencia de agua y sal son comparadas en la Figura 3.6. Se puede observar que el modelo tiene un buen ajuste pero no es óptimo dado que se desvía de la recta de  $45^\circ$  en los extremos, pese a los resultados obtenidos de los parámetros estadísticos  $RMSE$  y  $\bar{R}^2$  (Tabla 3.7)



**Figura 3.6:** Correlación entre los valores experimentales y predichos por el modelo de Peleg para el contenido de sal (a) y agua (b) a  $5\pm 1^\circ\text{C}$  (●) y  $14\pm 2^\circ\text{C}$  (◆). Recta a  $45^\circ$  (—).

### 3.2.2.6. Modelo de Zugarramurdi y Lupín

El modelo de Zugarramurdi y Lupín (ZyL) (Sección 2.6.4) se utilizó para evaluar la constante de velocidad específica  $k_{ZL}$  [ $\text{h}^{-1}$ ] y la fracción másica de agua o sal (base seca, g/gbs) en el equilibrio  $x_e$  [g/gbs]. Los parámetros estadísticos del ajuste realizado con este modelo se presentan en la Tabla 3.8.

**Tabla 3.8:** Parámetros de la evolución del contenido de agua y sal estimados con el modelo de ZyL

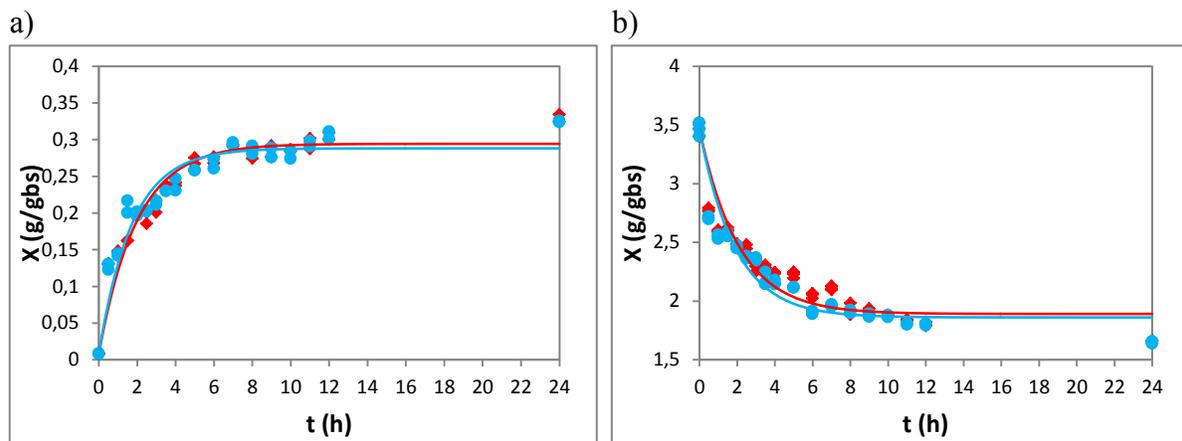
	T ( $^\circ\text{C}$ )	$x_e$ (ZL) [g/gbs]	$k_{ZL}$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	RMSE	$\bar{R}^2$	E [%]
Sal	$14\pm 2$	$0,294 \pm 0,006$	$0,504 \pm 0,038$	0,021	0,93	10,64
	$5\pm 1$	$0,288 \pm 0,006$	$0,578 \pm 0,048$	0,022	0,92	11,38
Agua	$14\pm 2$	$1,890 \pm 0,034$	$0,478 \pm 0,037$	0,147	0,88	14,48
	$5\pm 1$	$1,861 \pm 0,031$	$0,524 \pm 0,039$	0,142	0,89	12,92

Valor medio  $\pm$  error estándar

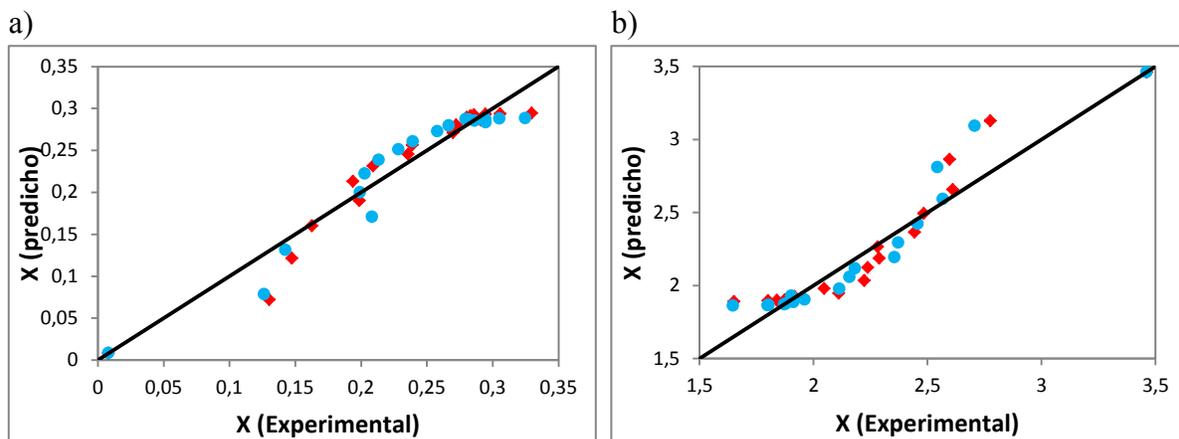
No se observaron diferencias apreciables en la constante de velocidad específica ( $k_{ZL}$ ) al cambiar la temperatura de proceso. Los valores de equilibrio estimados por el modelo resultaron similares entre sí en las dos condiciones analizadas.

Los valores del coeficiente de determinación ajustado ( $\bar{R}^2$ ) se encuentran alejados de 1 y los de  $RMSE$  fueron bajos para el ajuste de sal ( $\sim 0,02$ ) para el ajuste de sal y más elevados para el ajuste de agua ( $\sim 0,15$ ). Por otro lado, las estimaciones de los valores de equilibrio ( $x_e$ ) presentan un error relativo ( $E$ ) mayor al 10%. De acuerdo a los parámetros estadísticos utilizados para analizar la bondad de ajuste ( $RMSE$  y  $\bar{R}^2$ ), el modelo de ZyL no describe adecuadamente la cinética de la transferencia de sal y agua durante la DO de ejemplares de anchoíta enteros parcialmente descamados, especialmente a tiempos largos dado que subestima el valor de equilibrio para el contenido de sal y sobreestima el valor del equilibrio para el contenido de agua.

El ajuste de los datos experimentales al modelo de ZyL se puede observar en la Figura 3.7, donde se evidencia que a tiempos cortos y largos hay se aleja la predicción de los valores experimentales. Esto también se puede observar al correlacionar los contenidos de agua y sal experimentales y predichos (Fig. 3.8) donde se evidencia que este modelo no presenta un buen ajuste dado que hay un marcado alejamiento de la linealidad, presentando una tendencia parabólica.



**Figura 3.7:** Ajuste del modelo de ZyL a la cinética del contenido de sal (a) y agua (b): valores experimentales a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  (  $\bullet$  ) y  $14 \pm 2^\circ\text{C}$  (  $\blacklozenge$  ) y estimados a  $5 \pm 1^\circ\text{C}$  ( — ) y  $14 \pm 2^\circ\text{C}$  ( — ).



**Figura 3.8:** Correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo de ZyL para sal (a) y agua (b) a  $5\pm 1^\circ\text{C}$  (●) y  $14\pm 2^\circ\text{C}$  (◆). Recta a  $45^\circ$ (—).

### 3.2.2.7. Modelo de Weibull

El parámetro de escala ( $\alpha$ ) y el de forma ( $\beta$ ) del modelo de Weibull se ajustaron manteniendo la  $x_e$  como parámetro estadístico así como ingresando la  $x_e$  como dato ( $x_e$  (EXPERIM)).

En cuanto al ajuste del modelo con los parámetros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $x_e$ , los valores de  $RMSE$  menores a 0,07 y  $\bar{R}^2$  mayores de 0,98 parecían indicar que se predecía adecuadamente la cinética de la transferencia de sal y agua durante la DO de ejemplares de anchoíta enteros parcialmente descamados. Sin embargo, al continuar analizando otros factores se evidenció que esto no sucedía dado que el parámetro de escala ( $\alpha$ ) presentó un error estándar muy elevado para el agua y relativamente elevado para la sal dado que sus valores se aproximan a los del parámetro. Cabe destacar que el error estándar se relaciona con la bondad de ajuste del parámetro y que elevados valores (próximos al valor del parámetro) indicarían que el modelo está sobreparametrizado. Asimismo, se encontró un elevado error relativo para la predicción de la  $x_e$  ( $E$  próximo a 10% para la sal y 20-30% para el agua), indicando que el ajuste no resultó adecuado.

El modelo de Weibull presenta tres predictores a modelar mientras que los modelos de Peleg y de ZyL poseen dos predictores. Dado que el análisis estadístico del modelo de

Weibull indicaría que con tres predictores se encuentra sobreparametrizado (elevados errores estándar de predictores), se efectuó el cálculo del modelo manteniendo fija la  $x_e$ . Los parámetros del modelo se muestran en la Tabla 3.9:

**Tabla 3.9:** Parámetros de la evolución del contenido de agua y sal estimados con el modelo de Weibull

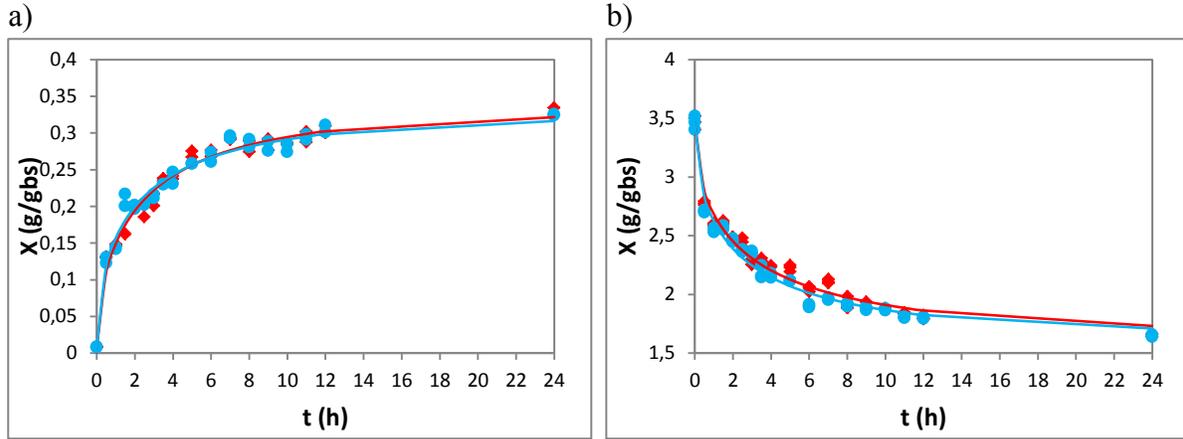
	T (°C)	$\alpha$ (h)	$\beta$ (adim.)	RMSE	$\bar{R}^2$
Sal	10	2,557 ± 0,092	0,582 ± 0,025	0,011	0,98
	5	2,293 ± 0,096	0,549 ± 0,025	0,012	0,98
Agua	10	2,920 ± 0,092	0,540 ± 0,020	0,067	0,98
	5	2,476 ± 0,083	0,535 ± 0,020	0,066	0,98

Valor medio ± error estándar

Tanto el parámetro de escala ( $\alpha$ ) como el parámetro de forma ( $\beta$ ) no mostraron diferencias con respecto a la temperatura de proceso ni para el agua ni para la sal.

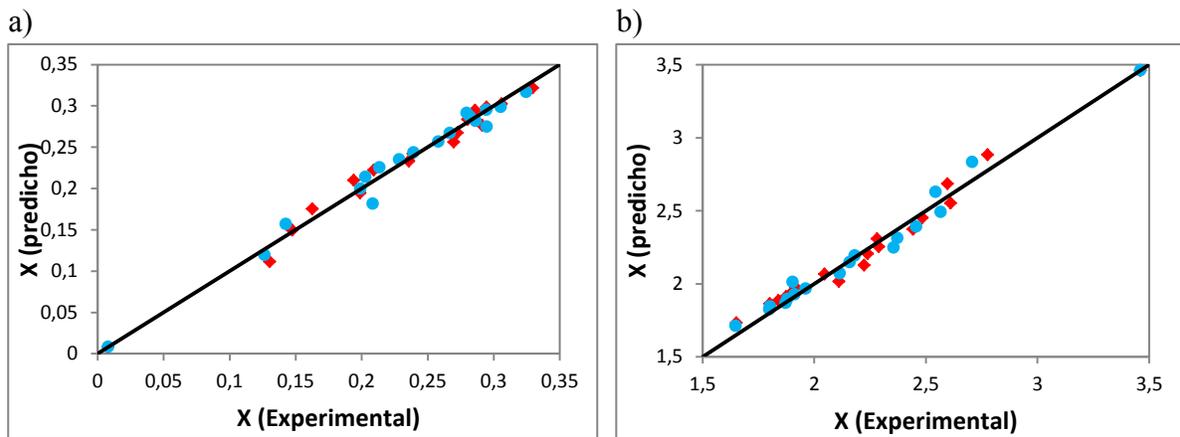
Los valores del coeficiente de determinación ( $\bar{R}^2$ ) fueron mayores de 0,98 y los de *RMSE* fueron menores a 0,012 para el ajuste de sal y próximos a 0,07 para el ajuste de agua. De acuerdo a los parámetros estadísticos *RMSE* y  $\bar{R}^2$ , el modelo de Weibull describe adecuadamente la cinética de la transferencia de sal y agua durante la DO de ejemplares de anchoíta enteros parcialmente descamados al mantener fija la  $x_e$  (ingresada como dato). De este modo, se determinaron los valores de los parámetros  $\alpha$  y  $\beta$  con errores estándar adecuados (mucho menores al valor del parámetro).

El ajuste de los datos experimentales al modelo de Weibull se presenta en la Figura 3.9, donde se puede observar que los modelos tienen un buen ajuste:



**Figura 3.9:** Ajuste del modelo de Weibull a la cinética del contenido de sal (a) y agua (b): valores experimentales a  $5\pm 1^\circ\text{C}$  (●) y  $14\pm 2^\circ\text{C}$  (◆) y estimados a  $5\pm 1^\circ\text{C}$  (—) y  $14\pm 2^\circ\text{C}$  (—).

Los datos experimentales y los estimados para la transferencia de agua y sal son comparados en la Figura 3.10. Se distingue que el modelo presenta un buen ajuste tanto para la predicción del contenido de sal como de agua, en concordancia con los otros factores estadísticos analizados, lo que indicaría que el modelo resulta adecuado para predecir el contenido de sal y agua.



**Figura 3.10:** Correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo de Weibull para sal (A) y agua (B) a  $5\pm 1^\circ\text{C}$  (●) y  $14\pm 2^\circ\text{C}$  (◆).

### 3.2.2.8. Modelo Difusivo Cilindro Infinito

El coeficiente de difusión de sal en pescados depende de la especie, la temperatura de proceso, la orientación del músculo, el contenido de grasa, la presencia o ausencia de piel, entre otros factores (Zugarramurdi y Lupín, 1980).

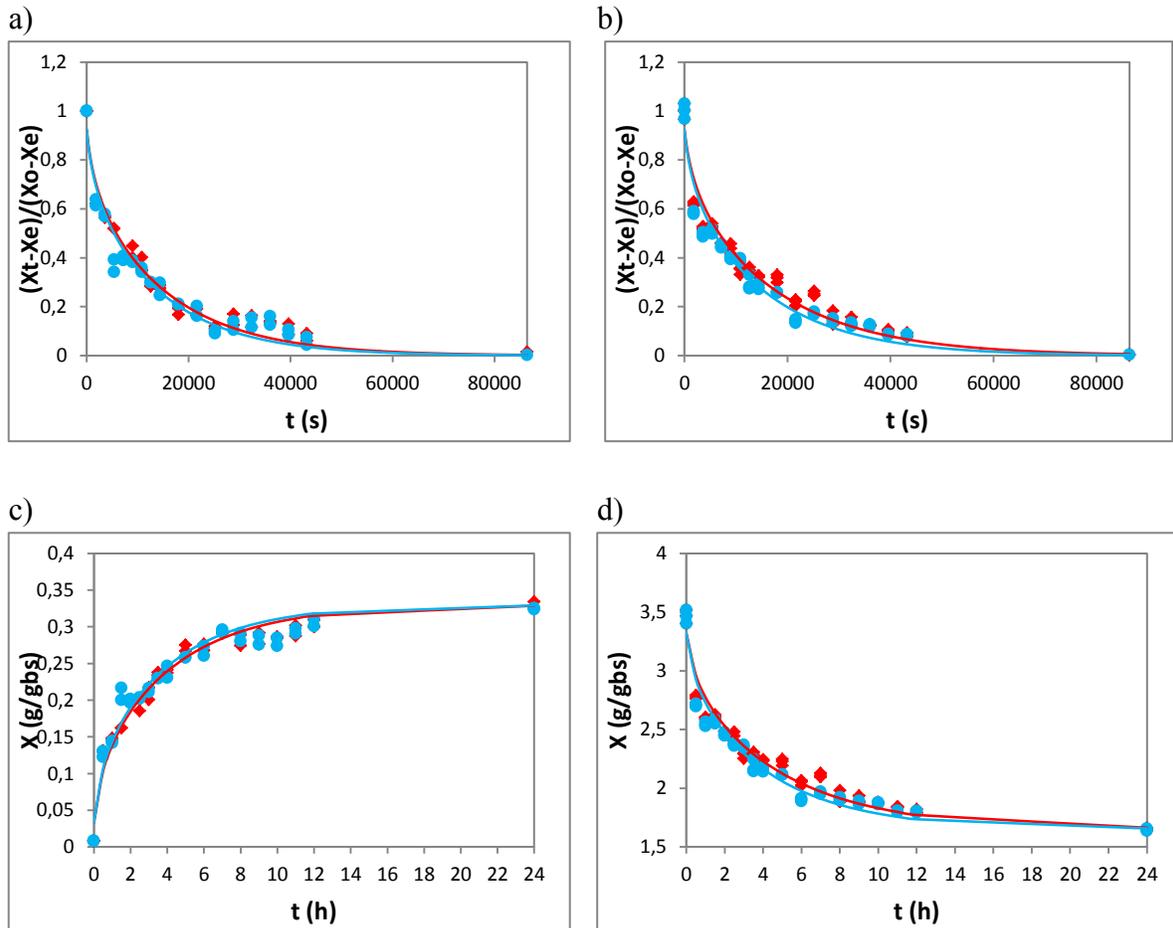
Los valores de los coeficientes de difusión ( $D$ ) de agua y sal obtenidos para el salado húmedo de anchoíta entera parcialmente descamada se muestran en la Tabla 3.10. Los datos experimentales mejoraron el ajuste del modelo de Crank a medida que se aumentó la cantidad de términos de la serie, obteniendo con 3 y 5 términos altos valores de los coeficientes de determinación ajustado ( $\bar{R}^2 \geq 0,94$ ) y bajos valores de  $RMSE (\leq 0,057)$ .

**Tabla 3.10:** Parámetros de la evolución del contenido de agua y sal estimados con el modelo de Crank

T (°C)	1 término			3 términos			5 términos			
	<i>D</i> (m/s <sup>2</sup> )	<i>RMSE</i>	$\bar{R}^2$	<i>D</i> (m/s <sup>2</sup> )	<i>RMSE</i>	$\bar{R}^2$	<i>D</i> (m/s <sup>2</sup> )	<i>RMSE</i>	$\bar{R}^2$	
Sal	14±2	9,59.10 <sup>-10</sup> ± 0,58.10 <sup>-10</sup>	0,081	0,89	10,05.10 <sup>-10</sup> ± 0,43.10 <sup>-10</sup>	0,050	0,96	10,06.10 <sup>-10</sup> ± 0,38.10 <sup>-10</sup>	0,045	0,97
	5±1	10,33.10 <sup>-10</sup> ± 0,79.10 <sup>-10</sup>	0,085	0,88	10,88.10 <sup>-10</sup> ± 0,53.10 <sup>-10</sup>	0,057	0,94	10,89.10 <sup>-10</sup> ± 0,49.10 <sup>-10</sup>	0,052	0,95
Agua	14±2	8,13.10 <sup>-10</sup> ± 0,45.10 <sup>-10</sup>	0,079	0,89	8,63.10 <sup>-10</sup> ± 0,31.10 <sup>-10</sup>	0,053	0,95	8,65.10 <sup>-10</sup> ± 0,29.10 <sup>-10</sup>	0,049	0,96
	5±1	9,42.10 <sup>-10</sup> ± 0,54.10 <sup>-10</sup>	0,080	0,89	9,97.10 <sup>-10</sup> ± 0,38.10 <sup>-10</sup>	0,055	0,95	9,98.10 <sup>-10</sup> ± 0,25.10 <sup>-10</sup>	0,050	0,95

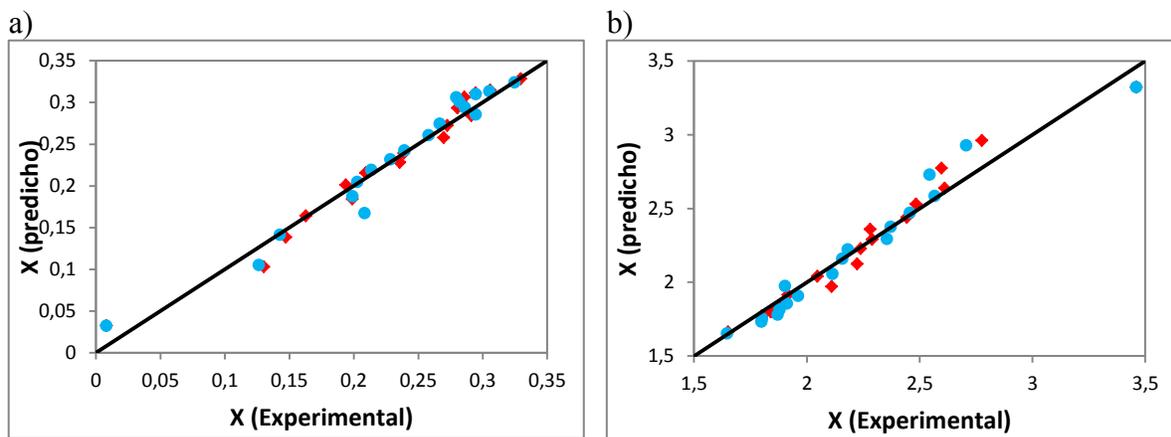
Valor medio ± error estándar

En la figura 3.11 se puede observar el ajuste de los datos experimentales de  $(x_t - x_e)/(x_0 - x_e)$  al modelo de Crank para un cilindro infinito utilizando 5 términos de la serie.



**Figura 3.11:** Ajuste del modelo de Crank a la cinética del contenido de sal (a) y agua (b) expresado en concentración adimensional (a y b, respectivamente) y en base seca (c y d, respectivamente): valores experimentales a  $5\pm 1^\circ\text{C}$  (●) y  $14\pm 2^\circ\text{C}$  (◆) y estimados a  $5\pm 1^\circ\text{C}$  (—) y  $14\pm 2^\circ\text{C}$  (—).

La comparación de los valores experimentales de agua y sal con los valores estimados por el modelo de Crank se muestra en la Figura 3.12. Se puede observar que el ajuste es adecuado, en concordancia con los parámetros estadísticos analizados.



**Figura 3.12:** Correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo de Crank para sal (A) y agua (B) a  $5\pm 1^\circ\text{C}$  (●) y  $14\pm 2^\circ\text{C}$  (◆). Recta a  $45^\circ$  (—).

Los valores hallados para los coeficientes de difusión ( $D$ ) de agua y sal en las condiciones analizadas se mantuvieron en el mismo orden de magnitud, resultando para ambos compuestos del orden de  $\sim 1.10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ . Estos resultados concuerdan con los hallados por Zugarramurdi y Lupín (1977).

### 3.2.3. Evaluación microbiológica durante la deshidratación osmótica de anchoíta entera por vía húmeda

#### 3.2.3.1. Cinética microbiana durante la deshidratación osmótica de anchoíta entera

Se analizó el efecto de la deshidratación osmótica por salado húmedo en la cinética microbiana de diferentes microorganismos. Como puede distinguirse en la tabla 3.11, los resultados obtenidos revelaron que en el pescado fresco (muestra tomada antes de la inmersión en salmuera) y en los ejemplares extraídos en diferentes tiempos del salado húmedo estuvieron ausentes *E. coli*, *S. aureus*, *Clostridium* sulfito-reductores (CSR) y *Lactobacillus* spp.

En la muestra fresca estuvieron presentes coliformes totales, enterobacterias, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. y mohos y levaduras. A partir de la media hora de tratamiento - que corresponde a un contenido de sal de aprox. 2,5 % p/p - no se detectaron estos microorganismos indicadores de higiene y deteriorantes naturales del pescado,

excepto por *Staphylococcus* spp. que requirió 3 hs de salado para su inhibición. Las bacterias aerobias mesófilas (BA35) estuvieron presentes durante las primeras 9 hs de tratamiento, no detectándose a partir de las 10 hs. Estos microorganismos presentaron al final del tratamiento una tasa de supervivencia tendiente a cero.

Las bacterias aerobias psicrótrofas (crecimiento a 7°C, BA7) y los microorganismos halófilos que se desarrollaron en medios de cultivo con 15 y 20 % p/V de sal (BH15 y BH20, respectivamente) estuvieron presentes durante todo el tratamiento. Al final del tratamiento, las BA7 se vieron significativamente reducidas, con una tasa de supervivencia muy baja, mientras que las BH15 y BH20 se vieron incrementadas. La evolución de las bacterias aerobias a 35°C (BA35) y a 7°C (BA7), como así también los microorganismos halófilos con 15 y 20 % p/V de sal (BH15 y BH20, respectivamente) puede observarse en detalle en la figura 3.13.

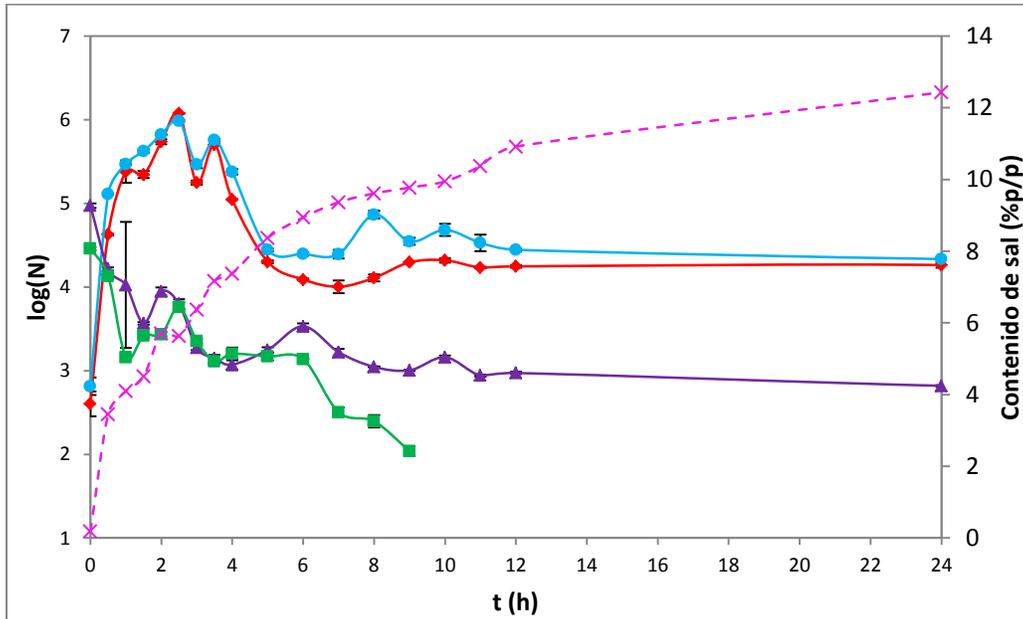
**Tabla 3.11:** Resumen de resultados más relevantes obtenidos para los diferentes microorganismos durante el tratamiento de salado húmedo de anchoíta entera

	Detección		Inhibición total		Tasa de supervivencia (S)
	Tiempo [h]	Recuentos [log(UFC/g)]	Tiempo [h]	Contenido de NaCl [% p/p]	
Bacterias Aerobias a 35°C	0-9	Mín: 2,040 (0,056) – Máx: 4,461 (0,019)	10	9,944 (0,075)	$< 3,46 \cdot 10^{-4}$
Bacterias Aerobias a 7°C	0-30	Mín: 4,973 (0,026) – Máx: 2,796 (0,005)	-	-	$6,65 \cdot 10^{-3}$
Coliformes totales	0	3,777 (0,041)	0,5	3,451 (0,020)	$< 1,67 \cdot 10^{-3}$
<i>E. coli</i>	0-30	ND	-	-	-
Enterobacterias	0	3,875 (0,025)	0,5	3,451 (0,020)	$< 1,33 \cdot 10^{-3}$
<i>Pseudomonas</i> spp.	0	2,113 (0,047)	0,5	3,451 (0,020)	$< 7,69 \cdot 10^{-2}$
<i>Staphylococcus</i> spp.	0-2,5	Prom: 3,485 (0,147)	3	6,376 (0,301)	$< 2,78 \cdot 10^{-3}$
<i>S. aureus</i>	0-30	ND	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> spp.	0-30	ND	-	-	-
<i>Clostridium</i> sulfito-reductores	0-30	ND	-	-	-
Microorganismos halófilos con 15 % NaCl p/v	0-30	Mín: 2,604 (0,148) – Máx: 6,076 (0,004)	-	-	32,3
Microorganismos halófilos con 20 % NaCl p/v	0-30	Mín: 2,814 (0,106) – Máx: 5,988 (0,012)	-	-	32,5
Mohos y levaduras	0	4,471 (0,103)	0,5	3,451 (0,020)	$< 3,33 \cdot 10^{-4}$

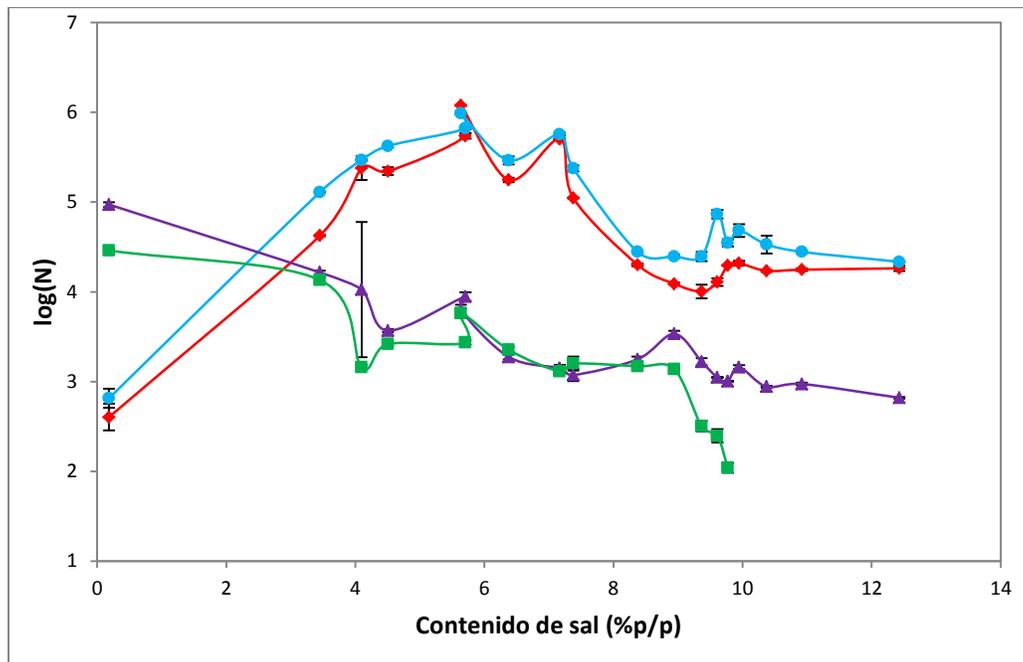
ND: No detectado. Mín: mínimo. Máx: Máximo. Prom: Promedio.

Valor medio (desviación estándar)

Las tasas de supervivencia indicadas como < (valor) corresponden a la estimación a partir de  $N_f < 10$  UFC/g (límite de detección)



**Figura 3.13:** Evolución microbiana ( $\log(N)$ , siendo  $N$  las UFC/g) y contenido de sal durante el salado húmedo de anchoíta entera. Bacterias aerobias a  $7^{\circ}\text{C}$  ( $\blacktriangle$ ) y  $35^{\circ}\text{C}$  ( $\blacksquare$ ); microorganismos halófilos con 15% NaCl p/v ( $\blacklozenge$ ) y 20% NaCl p/v ( $\bullet$ ); contenido de NaCl (% p/p) ( $-\times-$ ).



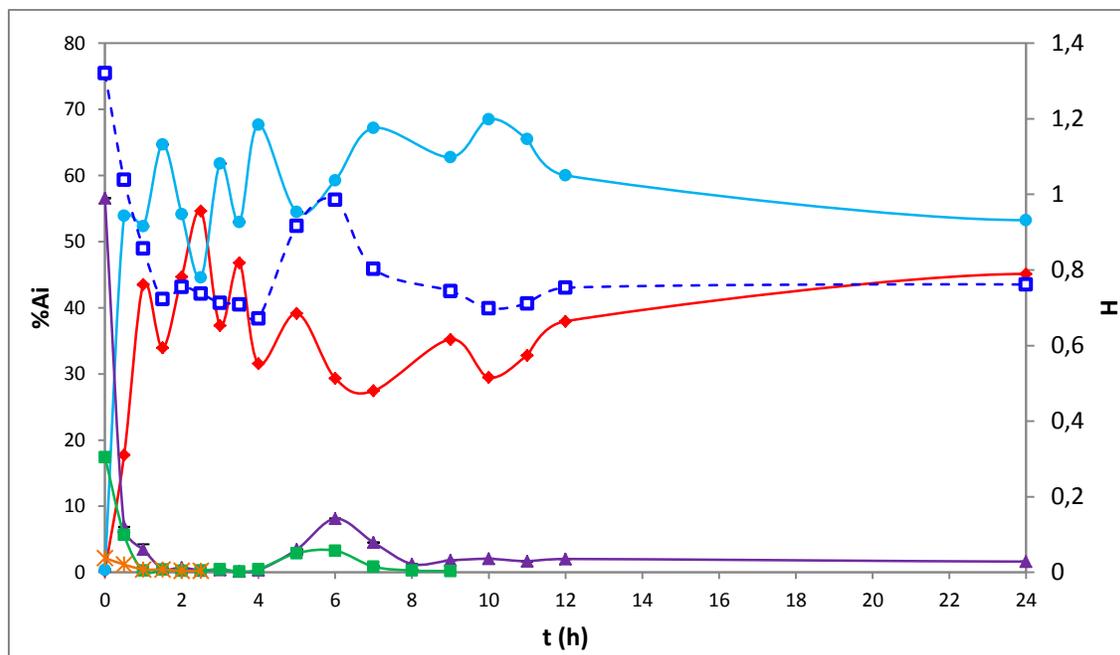
**Figura 3.14:** Evolución microbiana ( $\log(N)$ , siendo  $N$  las UFC/g) en función del contenido de sal durante el salado húmedo de anchoíta entera para bacterias aerobias a  $7^{\circ}\text{C}$  ( $\blacktriangle$ ) y  $35^{\circ}\text{C}$  ( $\blacksquare$ ) y microorganismos halófilos con 15% NaCl p/v ( $\blacklozenge$ ) y 20% NaCl p/v ( $\bullet$ ).

Tanto el crecimiento como la inhibición microbiana varían en el tiempo según las condiciones intrínsecas (pH,  $a_w$ , etc.) y extrínsecas (temperatura, atmósfera, etc.). Durante la etapa de salado húmedo, las condiciones intrínsecas son variables, aumentando el contenido de sal y disminuyendo el contenido de agua y la actividad de agua. En las Fig. 3.13 y 3.14, puede observarse tanto la evolución de los microorganismos aerobios y halófilos estudiados como del contenido de sal [NaCl % p/p, base húmeda].

Las bacterias aerobias mesófilas (BA35) disminuyen continuamente desde el inicio del tratamiento hasta valores no detectables desde las 10 hs en adelante ( $\sim 10\%$  NaCl p/p) (Fig. 3.13 y 3.14). En la Fig. 3.14 se distingue un abrupto decrecimiento de estos microorganismos a partir de haberse alcanzado un contenido de sal del  $9\%$  NaCl p/p, y no detectándose desde  $\sim 10\%$  NaCl p/p. Los psicrótrofos disminuyeron desde el inicio hasta llegar a un valor que se mantiene estable hasta el fin del tratamiento ( $\sim 10^3$  UFC/g para  $t > 2,5$  h).

Los microorganismos halófilos exhibieron una curva que presentó primero una fase de crecimiento con un valor máximo ( $\sim 10^6$  UFC/g) a las 2,5 h. Los recuentos más elevados se hallaron en el período en que el contenido de NaCl fue de  $5-8\%$  p/p aprox. Al aumentar el tiempo de tratamiento y el contenido de NaCl, se observó claramente la inhibición microbiana hasta recuentos estables de BH15 y BH20 ( $\log(\text{UFC/g}) \sim 4,5$  para  $t > 5$  h). La presencia de microorganismos halófilos coincide con lo reportado por otros autores que concluyeron que constituyen la microbiota típica de la anchoíta salada-madurada (Czerner y Yeannes, 2014).

La biodiversidad microbiana puede analizarse también desde un punto de vista cinético, relacionando los índices de Shannon ( $H$ ) y de abundancia relativa ( $\%A_i$ ) con el tiempo transcurrido en la etapa de salado, y por consiguiente, los cambios intrínsecos del pescado. Esta evolución puede observarse en la Fig. 3.15.



**Figura 3.15:** Análisis cinético de la biodiversidad según los índices de Shannon ( $H$ ) y de abundancia relativa ( $\%A_i$ ) de los microorganismos analizados. Bacterias aerobias a  $7^{\circ}\text{C}$  ( $\text{---}\blacktriangle$ ) y  $35^{\circ}\text{C}$  ( $\text{---}\blacksquare$ ); microorganismos halófilos con 15% NaCl p/v ( $\text{---}\blacklozenge$ ) y 20% NaCl p/v ( $\text{---}\bullet$ ); *Staphylococcus* spp. ( $\text{---}\ast$ ); Índice de Shannon ( $\text{---}\square$ ).

En función de los resultados obtenidos durante el procesamiento de salado húmedo de anchoíta (Tabla 3.11), se observa que la principal reducción en cuanto a la biodiversidad, medida por el índice de Shannon ( $H$ ), se da al principio del tratamiento, durante aproximadamente la primer hora y media del mismo. Posteriormente se observan algunas fluctuaciones hasta llegar a un valor estable. Según se observa que en la muestra de anchoíta inicial los microorganismos dominantes, es decir con mayor abundancia relativa, fueron las bacterias aerobias psicrótrofas, seguidas de las mesófilas. Al cabo de media hora de tratamiento, las bacterias y arqueas halófilas (BH15 y BH20) dominaron el proceso, manteniendo una diferencia media de  $\sim 45\%$  en el porcentaje de abundancia relativa con respecto a las bacterias aerobias psicrótrofas, las cuales corresponden a los microorganismos subsiguientes en cuanto a este índice. La abundancia de bacterias aerobias mesófilas y psicrótrofas, así como de *Staphylococcus* spp., puede parecer poco relevante desde el punto de vista de biodiversidad. Sin embargo, cabe destacar que en el campo de alimentos su importancia no es menor. *Staphylococcus* spp. ha sido relacionado con brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (Espinosa et al., 2014), por ello el hecho que se

vean inhibidos por el tratamiento se relacionaría con la eficiencia del proceso. Por otro lado, los microorganismos psicrófilos y psicrótrofos constituyen la microbiota típica del pescado (Huss et al., 1999 y 2000; ICMSF, 1981) y pese a que sus recuentos disminuyeron, se encontraron durante toda la etapa de salado húmedo. Los aerobios mesófilos resultaron totalmente inhibidos en este tratamiento. Sin embargo, en las muestras saladas del muestreo de plantas procesadoras (Sección 3.2.1) se observaron conteos menores en ejemplares del salado húmedo que en anchoíta fresca, mientras que el porcentaje de ocurrencia ( $\%C_i$ ) fue del ~90%.

### 3.2.3.2. Modelos de crecimiento microbiano

Los modelos de crecimiento microbiano de Gompertz modificado y Logístico modificado (Zwietering et al.; 1990) se ajustaron entre el tiempo inicial y 2,5 hs para la microbiota halófila. Los resultados de los parámetros ( $A$ ,  $\mu_m$  y  $L$ ) como también los estimadores del ajuste ( $RMSE$  y  $\bar{R}^2$ ) se muestran en la Tabla 3.12.

**Tabla 3.12:** Parámetros de los modelos de Gompertz y Logístico ( $A$ ,  $\mu_m$  y  $L$ ),  $RMSE$  y  $\bar{R}^2$  de los ajustes para el crecimiento de los microorganismos halófilos con 15 y 20% p/V de NaCl.

		$A$ [log(UFC/g)/h]	$\mu_m$ [log(UFC/g)/h]	$L$ [h]	$RMSE$	$\bar{R}^2$
Gompertz mod.	BH15	3,104±0,106	4,449±1,061	0,050±0,104*	0,261	0,952
	BH20	2,934±0,065	5,859±1,285	0,070±0,088*	0,176	0,975
Logístico mod.	BH15	3,037±0,103	6,768±4,599*	0,200±0,203*	0,288	0,942
	BH20	2,913±0,067	9,251±10,537*	0,239±0,294*	0,188	0,972

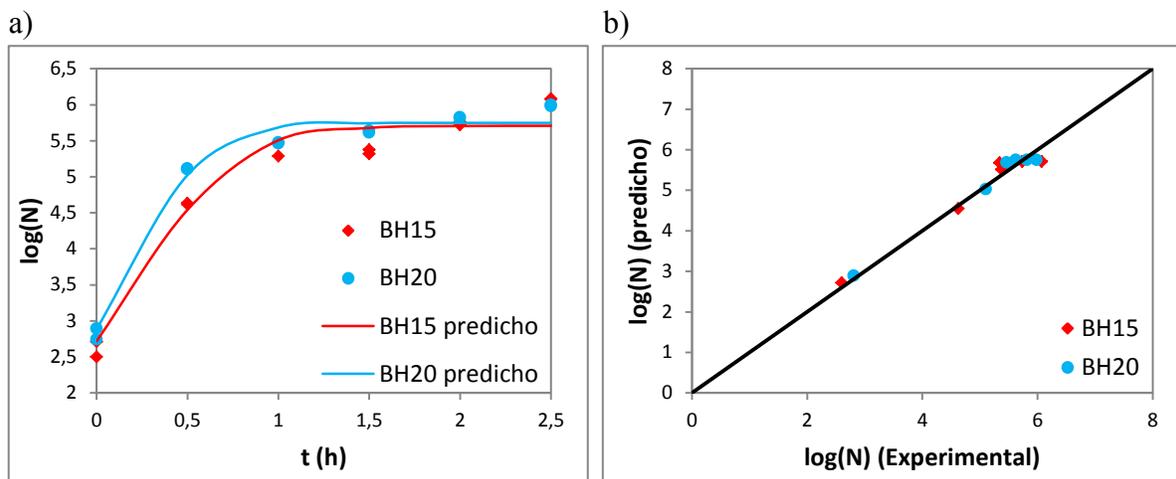
Valor estimado  $\pm$  error estándar. BH15: microorganismos halófilos (15% p/V NaCl). BH20: microorganismos halófilos (20% p/V NaCl). \* Parámetros con elevado error estándar.

Los valores del coeficiente de determinación ajustado ( $\bar{R}^2$ ) fueron mayores a 0,94 y los de  $RMSE$  fueron pequeños (<0,2) tanto para BH15 como para BH20 por ambos

modelos. Sin embargo, el modelo Logístico presentó elevados errores estándar en la estimación de los predictores  $\mu_m$  y  $L$  por lo que este modelo no se considera apropiado para describir la cinética analizada. El hecho que los errores estándar sean similares o superiores al parámetro correspondiente podría deberse a que el modelo este sobreparametrizado (OriginLab, 2017). Una posible solución sería fijar el valor de alguno de los parámetros a ajustar. Sin embargo, en base a las fuentes consultadas, no se encontró que sea usual fijar alguno de estos parámetros predictores. Cabe destacar que el modelo Logístico se caracteriza por modelar curvas de crecimiento simétricas mientras que el de Gompertz lo hace para asimétricas y alcanza antes la  $\mu_m$  que el Logístico. Este hecho también puede contribuir a que la bondad de ajuste para el modelo Logístico sea menor que para el de Gompertz.

Los predictores estimados por el modelo de Gompertz (Tabla 3.12) mostraron similares resultados para BH15 y BH20. En ambos casos el valor  $A$  que corresponde a la diferencia entre la asíntota superior y los recuentos iniciales fue similar ( $\sim 3 \log(\text{UFC/g})$ ), mientras que la velocidad específica de crecimiento resultó ser superior para BH20 manteniéndose dentro del mismo orden de magnitud que para BH15. Tanto para BH15 como para BH20 el tiempo de demora correspondiente a la fase *lag* fue prácticamente despreciable, lo que puede apreciarse también en la Fig. 3.16a. La magnitud del error estándar fue similar al valor del predictor  $L$ . Situaciones análogas han sido reportadas para ajustes realizados sobre curvas de crecimiento con fase *lag* muy corta (Tomic et al., 2013).

El ajuste de los datos experimentales al modelo de Gompertz modificado y la correlación entre los valores experimentales y predichos se pueden ver en la Figura 3.16. Se puede observar una buena predicción del modelo a tiempos cortos con una leve desviación en la zona de la fase estacionaria, considerándose un buen ajuste dado que se está modelando una población mixta con condiciones intrínsecas variables.



**Figura 3.16:** (a) Ajuste del modelo de Gompertz modificado para el crecimiento de microorganismos halófilos ( $\log(N)$ , siendo  $N$  las UFC/g) y (b) Correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo de Gompertz modificado. Valores experimentales para 15% NaCl p/v (♦) y 20% NaCl p/v (●) y estimados para 15% NaCl p/v (—) y 20% NaCl p/v (—). Recta a 45° (—).

Por otro lado, en base a la  $\mu_m$  estimada por el modelo de Gompertz modificado, se calculó el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de los microorganismos halófilos, encontrando que  $t_d$  resultó 0,16 h (~10 min) y 0,12 h (~7 min) para BH15 y BH20, respectivamente. Estos valores indicarían que la población de los microorganismos halófilos se duplica en 7-10 minutos, siendo estos tiempos muy cortos considerando que las bacterias y arqueas halófilas son de lento crecimiento (Czerner y Yeannes, 2014; Holt, 1989; Sehgal y Gibbons, 1960).

### 3.2.3.3. Modelos de inhibición microbiana

Los modelos para inhibición microbiana de Gompertz y Weibull (Linton et al., 1996; Peleg y Cole, 1988; Xiong et al., 1996) se aplicaron desde las 2,5 hs en adelante para la microbiota halófila y con los sets de datos completos para la microbiota aerobia total. El modelo de Weibull ajustó los datos mencionados. Sin embargo, el modelo de Gompertz solo ajustó la cinética de inhibición de la microbiota halófila.

- **Modelo de Gompertz (inhibición microbiana)**

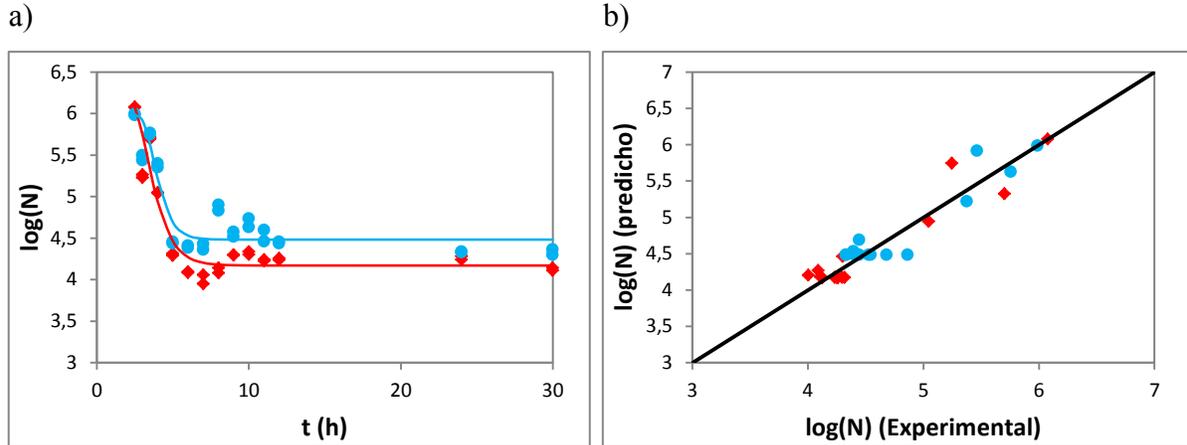
Los resultados de los predictores del modelo de Gompertz ( $C$ ,  $\mu_d$  y  $M$ ) así como también los estimadores del ajuste ( $RMSE$  y  $\bar{R}^2$ ) para la cinética de inhibición de los microorganismos halófilos ( $t \geq 2,5$  hs) se muestran en la Tabla 3.13.

**Tabla 3.13:** Parámetros del modelo de Gompertz para inhibición microbiana ( $C$ ,  $\mu_d$  y  $M$ ),  $RMSE$  y  $\bar{R}^2$  de los ajustes para el crecimiento de los microorganismos halófilos con 15 y 20% p/V de NaCl.

	$C$ [log(UFC/g)/h]	$\mu_d$ [1/h]	$M$ [h]	$RMSE$	$\bar{R}^2$
BH15	2,088±0,295	0,855±0,138	0,810±0,307	0,213	0,893
BH20	1,508±0,057	0,833±0,241	1,232±0,137	0,216	0,852

Valor estimado  $\pm$  error estándar. BH15: microorganismos halófilos (15% p/V NaCl). BH20: microorganismos halófilos (20% p/V NaCl)

No se observaron diferencias apreciables en la velocidad específica de inhibición ( $\mu_d$ ) de los microorganismos halófilos que se desarrollaron en medios de cultivo con 15 y 20 % de sal (BH15 y BH20, respectivamente). El parámetro  $C$  que corresponde a la diferencia entre los valores de la asíntota superior e inferior de  $\log(N/N_0)$  vs  $t$  resultó ser mayor para BH15 que para BH20. Esta diferencia puede observarse también en la Fig. 3.17 (a), lo que indicaría mayor inhibición para BH15 que para BH20. El parámetro  $M$  que indica el tiempo al cual la velocidad de muerte es máxima, teniendo en cuenta la bondad de ajuste indicada por el error estándar, se encontraría en valores similares para BH15 y BH20. Es decir, la máxima tasa de muerte ( $\mu_d$ ) se da aproximadamente 1 h después que comienza la etapa de declinación, esto es, aproximadamente al cabo de 3,5 hs de tratamiento.



**Figura 3.17:** (a) Ajuste del modelo de Gompertz para inhibición de microorganismos halófilos ( $\log(N)$ , siendo  $N$  las UFC/g) y (b) Correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo de Gompertz para inhibición. Valores experimentales para 15% NaCl p/v (  $\blacklozenge$  ) y 20% NaCl p/v (  $\bullet$  ) y estimados para 15% NaCl p/v (—) y 20% NaCl p/v (—). Recta a 45° (—).

Los valores del coeficiente de determinación ajustado ( $\bar{R}^2$ ) fueron moderados ( $\sim 0,9$ ) y los de  $RMSE$  fueron pequeños ( $\sim 0,2$ ) para ambos casos. De acuerdo a  $RMSE$ ,  $\bar{R}^2$  y la correlación entre valores experimentales y predichos (Fig. 3.17 (b)), el modelo describe adecuadamente la cinética de inhibición microbiana de la biota halófila estudiada (BH15 y BH20).

#### - Modelo de Weibull (inhibición microbiana)

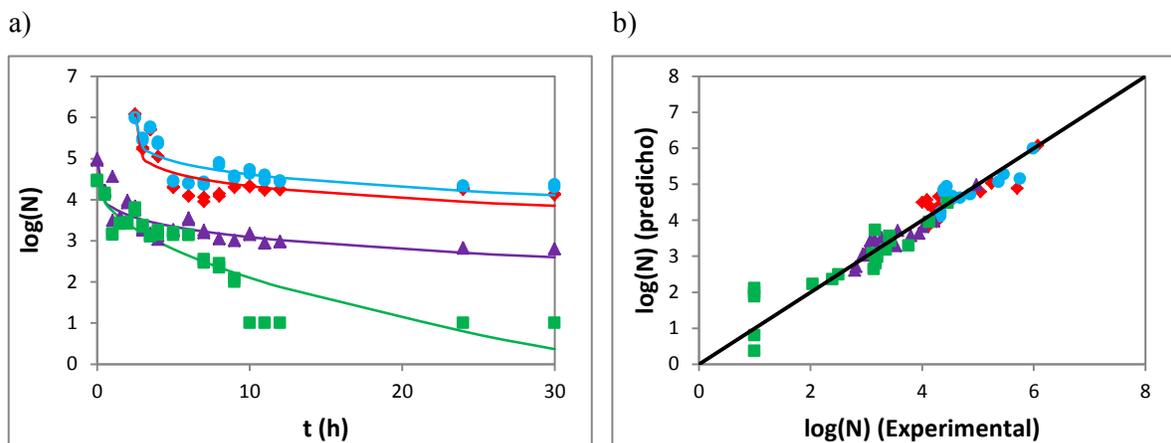
Los resultados del ajuste de los parámetros del modelo de Weibull ( $\alpha$  y  $\beta$ ) para las curvas de inhibición y los estimadores de la bondad de ajuste ( $RMSE$  y  $\bar{R}^2$ ), se muestran en la Tabla 3.14.

**Tabla 3.14:** Parámetros del modelo de Weibull para inhibición microbiana ( $\alpha$  y  $\beta$ ),  $RMSE$  y  $\bar{R}^2$  de los ajustes para el crecimiento de los microorganismos aerobios (7°C y 35°C) y halófilos (15 y 20% p/V de NaCl).

	$\alpha$ [h]	$\beta$ [adimensional]	$RMSE$	$\bar{R}^2$
BA35	1,774±0,319	0,500±0,048	0,359	0,697
BA7	0,487±0,165	0,210±0,025	0,307	0,702
BH15	0,386±0,266	0,187±0,042	0,427	0,818
BH20	2,033±0,662	0,242±0,047	0,238	0,825

Valor estimado  $\pm$  error estándar. BA7: bacterias aerobias psicrótrofas (7°C). BA35: bacterias aerobias mesófilas (35°C). BH15: microorganismos halófilos (15% p/V NaCl). BH20: microorganismos halófilos (20% p/V NaCl).

De acuerdo a los valores de  $RMSE$  y de  $\bar{R}^2$  (Tabla 3.14), el modelo describe la cinética de inhibición microbiana de los microorganismos halófilos (BH15 y BH20) mejor que de los microorganismos aerobios (BA35 y BA7). El modelo resultó útil para ajustar los sets de datos experimentales que con el modelo de Gompertz no fue posible (BA35 y BA7) pese a que los valores de  $\bar{R}^2$  para para estos sets de datos resultaron moderados. En la Fig. 4.18 (b) puede observarse que hay una buena relación entre los valores predichos y los experimentales, excepto para BA35 que a bajos recuentos (tiempos largos) se aleja de la recta a 45°. En este sentido, se halló concordancia con Possas et al. (2017) quienes describen que el modelo de Weibull es el más simple que describe las curvas cinéticas de inhibición no lineales, además de ser versátil.



**Figura 3.18:** (a) Ajuste del modelo de Weibull para la inhibición de microorganismos aerobios totales y halófilos ( $\log(N)$ , siendo  $N$  las UFC/g) y (b) Correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo de Weibull. Valores experimentales para bacterias aerobias a 7°C ( $\blacktriangle$ ) y 35°C ( $\blacksquare$ ) y microorganismos halófilos con 15% NaCl p/v ( $\blacklozenge$ ) y 20% NaCl p/v ( $\bullet$ ) y estimados para bacterias aerobias a 7°C (—) y 35°C (—) y microorganismos halófilos con 15% NaCl p/v (—) y 20% NaCl p/v (—). Recta a 45° (—).

El parámetro de forma  $\beta$  resultó en todos los casos  $< 1$  (Tabla 3.14). Este parámetro describe las formas de la curva de supervivencia y su valor indica que la curva de supervivencia es cóncava hacia arriba (Fig. 3.18 (a)). El hecho que el parámetro  $\beta$  no sea próximo a la unidad confirma que las curvas de inhibición estudiadas corresponden a modelos no lineales (Huang et al., 2012; Peleg y Cole, 1988). El parámetro de escala  $\alpha$  resultó ser mayor para BH20 y BA35 que para BH15 y BA7 (Tabla 3.14). Dado que  $\alpha$  es un parámetro cinético que puede considerarse una medida de la resistencia microbiana al tratamiento (Alvarez et al., 2003; Huang et al., 2012), el hecho que  $\alpha$  sea mayor para BH20 que para BH15 respectivamente, podría relacionarse con que BH20 hayan sido más resistentes al tratamiento que BH15 (para valores similares del parámetro de forma  $\beta$ ). Esto concuerda con los resultados del parámetro  $C$  (modelo de Gompertz para inactivación microbiana) que fue mayor para BH15 que para BH20, indicando mayor diferencia entre los valores de la asíntota superior e inferior de  $\log(N/N_0)$  vs  $t$ , lo que también se relacionaría con mayor inhibición de BH15. Sin embargo,  $\alpha$  resultó mayor para BA35 que para BA7 lo que no se correspondería con el efecto observado (Fig. 3.18a), dado que BA35 se mostró inhibida hasta valores no detectables desde las 10 hs, lo que podría deberse a que los valores de  $\beta$  de estos ajustes fueron diferentes y según Mafart et al. (2002) los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  no son independientes y están estrechamente relacionados.

### 3.3. CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados indican la presencia de bacterias típicas del pescado fresco en cantidades que mostrarían que la captura se realizó en aguas sin contaminación biótica. Las muestras saladas y maduradas presentaron microorganismos dentro de los límites microbiológicos considerados apropiados por la normativa vigente, mostrando la aceptabilidad del proceso y lote de productos analizados.

A partir del estudio general de la microbiota de anchoíta durante diferentes etapas del proceso y de la cinética de la microbiota durante el salado húmedo de anchoíta entera parcialmente descamada, se concluyó que el tratamiento tradicional es suficiente para lograr la inhibición microbiana de los microorganismos deteriorantes y patógenos potencialmente presentes en pescado, siendo la etapa de salado húmedo la responsable de reducir rápidamente la microbiota indeseada en un lapso de pocas horas ( $\leq 3$  hs).

En cuanto a la bondad de ajuste de los modelos para crecimiento (Gompertz y Logístico modificados) e inhibición microbiana (Gompertz y Weibull), la misma fue variable. El modelo de Gompertz resultó apropiado para describir el crecimiento de microorganismos halófilos que sucede durante las primeras horas del salado húmedo, mientras que el modelo Logístico tuvo una reducida bondad de ajuste. El modelo de Gompertz para inhibición microbiana solo resultó útil para describir la cinética de los microorganismos halófilos, no así de los aerobios totales. El modelo de Weibull para inhibición microbiana resultó más flexible que el modelo de Gompertz y logró ajustar los datos de inhibición de la biota halófila y la aerobia total a 7°C, sin embargo para los microorganismos aerobios totales a 35°C no hubo un buen ajuste a tiempos largos (asíntota inferior).

A partir del estudio de la cinética de transferencia de masa durante el salado húmedo de anchoíta entera parcialmente descamada que incluyó análisis de la evolución de la actividad de agua y del contenido de sal y agua, se concluyó que no se presentaron diferencias entre los tratamientos aplicados (temperaturas medias de 14 y 5°C). Por lo

tanto, desde el punto de vista de los modelos, no se justificaría un cambio a nivel industrial de las condiciones de proceso.

Se validó el modelo de estimación de actividad de agua a partir de la molalidad de cloruro de sodio de Lupín et al. (1981) para la especie *Engraulis anchoita* en el rango de 0-13 % de NaCl. Cabe destacar que este modelo no fue determinado considerando esta especie, así como tampoco otras especies de la familia *Engraulidae* en el rango aquí estudiado. Esta información resulta de especial interés para ensayos futuros a fin de poder predecir la actividad de agua para la familia *Engraulidae*, como así también para empresas locales que trabajan con la especie *E. anchoita*.

La bondad de ajuste de los modelos empíricos de Peleg, ZyL y Weibull fue variable. Los modelos de Peleg y Weibull fueron adecuados para predecir la cinética de transferencia de masa de sal y agua, mientras que el modelo de ZyL fue el que presentó menor bondad de ajuste. El modelo de Peleg brindó mayor información ya que también predijo el contenido de agua y sal en el equilibrio.

El modelo de Crank basado en la solución de la ley de Fick para cilindro infinito resultó la mejor opción para representar la pérdida de agua y la ganancia de solutos así como para determinar los coeficientes de difusión en el tejido.

Cabe destacar que las experiencias de salado húmedo se efectuaron en una planta elaboradora manteniendo las condiciones tradicionales de la elaboración de anchoíta salada-madurada lo que permite analizar la validez de los modelos predictivos en experiencias reales. Estas experiencias fueron impulsadas por una empresa (saladero de *E. anchoita* del Puerto de Mar del Plata) debido a que la FDA solicitó estudios específicos realizados en el proceso en condiciones reales a fin de validar el proceso tradicional de elaboración de anchoíta salada-madurada para exportación y para tal fin no aceptaba los resultados predichos por modelos.

En cuanto a la sugerencia de la FDA sobre efectuar el salado húmedo en cámaras frigoríficas, se observó que la cinética de ganancia de sal y pérdida de agua no se ve afectada por el cambio de procesamiento de condiciones ambiente a refrigeración. En cuanto al desarrollo microbiano, las bajas temperaturas podrían contribuir a un menor desarrollo de bacterias aerobias mesófilas y bacterias halófilas. Sin embargo, el porcentaje de ocurrencia y los recuentos de bacterias psicrótrofas durante el salado húmedo mostraron que estos microorganismos son de importancia en esta etapa y posiblemente se verían favorecidos por un descenso de la temperatura de proceso. Dado que la etapa de salado húmedo suele ser utilizada como reguladora de flujo de materia prima para las etapas siguientes, pudiendo durar hasta 10-12 días, se deduce que sería beneficioso reducir los tiempos de salado húmedo al mínimo necesario para lograr la actividad de agua requerida ( $\sim 0,86$ ), de modo tal de minimizar el efecto que la biota superviviente podría tener.

**CAPÍTULO 4: Caracterización de bacterias y arqueas halófilas y evaluación de su influencia en el salado-madurado de *E. anchoíta***

---

## 4.1. Introducción

Las fermentaciones espontáneas permiten el crecimiento de una gran diversidad de microorganismos (Jung et al., 2013). Para productos salados, se ha reportado la presencia tanto de bacterias como de arqueas halófilas (Czerner y Yeannes, 2014; Félix et al., 2016; Jung et al., 2013; Villar et al., 1985). Cabe destacar que las bacterias y arqueas son microorganismos unicelulares procariotas que han tenido una evolución diferente, por lo que se clasificaron en un dominio separado en el sistema de tres dominios: *Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*. Actualmente las bacterias y arqueas halófilas están siendo estudiadas por su potencial biotecnológico (Ramirez et al., 2004; Meseguer Soria, 2004).

Los estudios de la dinámica microbiana, así como las características de los microorganismos que crecen en las diferentes etapas, son de gran importancia para comprender los procesos de maduración del pescado salado. El conocimiento del ecosistema microbiano podría contribuir a un control más eficiente del proceso para regular el desarrollo de las características sensoriales. Además, podría permitir el desarrollo de un cultivo iniciador para acelerar el proceso o incluso mejorar algunas características de calidad, como Aponte et al. (2010) han sugerido.

El enfoque más clásico para este tipo de estudios se basa en microorganismos cultivables, aunque en investigaciones más recientes se analizan también microorganismos viables no cultivables (Lee et al., 2015; Ayrapetyan y Oliver, 2016; Roh et al., 2010).

El beneficio de trabajar con microorganismos cultivables es que permiten obtener información sobre la respuesta microbiana frente a diferentes componentes o condiciones de crecimiento mediante pruebas fenotípicas. Es interesante conocer la respuesta fenotípica dado que los metabolitos bacterianos podrían estar directamente relacionados con las características sensoriales de este producto (Campello, 1985; Czerner y Yeannes, 2014; Gram y Dalgaard, 2002; Hernández Herrero et al., 1999b; Huss y Valdimarsson, 1990).

Debido al conjunto de datos complejos y multidimensionales que resultan de las caracterizaciones fenotípicas, y para lograr una visión integral y globalizadora del proceso, se pueden utilizar técnicas de análisis estadístico multivariante. En este caso, las variables son del tipo categórico ya que los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas tienen un número limitado de posibles respuestas (modalidades). Para este tipo de conjuntos de datos, se puede utilizar el Análisis Factorial de Correspondencia Múltiple (ACM) como un método exploratorio que permite caracterizar las relaciones estadísticas de interdependencia entre variables cuantitativas y cualitativas y saber cómo está estructurada esta relación (Escofier y Pagès, 1998; Lebart et al., 1995). Para llevar a cabo el ACM, se construye y analiza la tabla de contingencia multidimensional (matriz de Burt) de todas las tabulaciones cruzadas bidireccionales en todas las variables. El ACM descompone la matriz de Burt para encontrar las asociaciones por pares que representan la mayor proporción de inercia (varianza) y las muestra en un número reducido de dimensiones. Los datos están representados en un sistema de ejes coordinados y estos ejes representan las dimensiones más importantes según la inercia que explican. Gráficamente, las observaciones están representadas por puntos y la proximidad entre ellos se relaciona con el nivel de asociación de las modalidades correspondientes a las variables evaluadas. Esta técnica multivariada es una extensión del Análisis de Correspondencias (AC) y también se puede ver como una generalización del Análisis de Componentes Principales (ACP) cuando las variables que se analizarán son categóricas en lugar de cuantitativas (Kudrats et al., 2014; Ramette, 2007). El ACM es una técnica prometedora para interpretar datos cualitativos de alta dimensión y se ha utilizado en diferentes campos científicos. En el área de alimentos, se ha aplicado, por ejemplo, para evaluar propiedades sensoriales del vino (Frost et al., 2018), productos de reacción de Maillard (Yu et al., 2012) o factores de riesgo para la seroprevalencia de brucelosis ovina y caprina (Coelho et al. al., 2008).

En este capítulo se presentan las evaluaciones sobre las principales características de la población microbiana halófila durante el proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada. Para este propósito, se realizan Análisis Univariados y Bivariados, así como también se utiliza el ACM seguido del Análisis de Cluster como estrategia para obtener conclusiones precisas del gran número de variables en el conjunto de datos (técnicas

estadísticas descritas en la Sección 2.7.2). Se espera discernir las características principales que mejor describen la dinámica de la microbiota halófila y cómo podría contribuir en el proceso de elaboración de la anchoíta salada-madurada. Asimismo, se contrastan los resultados de los análisis mencionados con un set de cepas diferentes a las utilizadas en dichos análisis.

## **4.2 Resultados y discusión**

### **4.2.1 Análisis de la contribución de los microorganismos halófilos al proceso**

Los microorganismos halófilos (recuentos y caracterización de cepas representativas) de las materias primas y etapas principales del proceso de salado-madurado de anchoíta se estudiaron a fin de analizar la contribución de los mismos en la maduración de anchoíta salada.

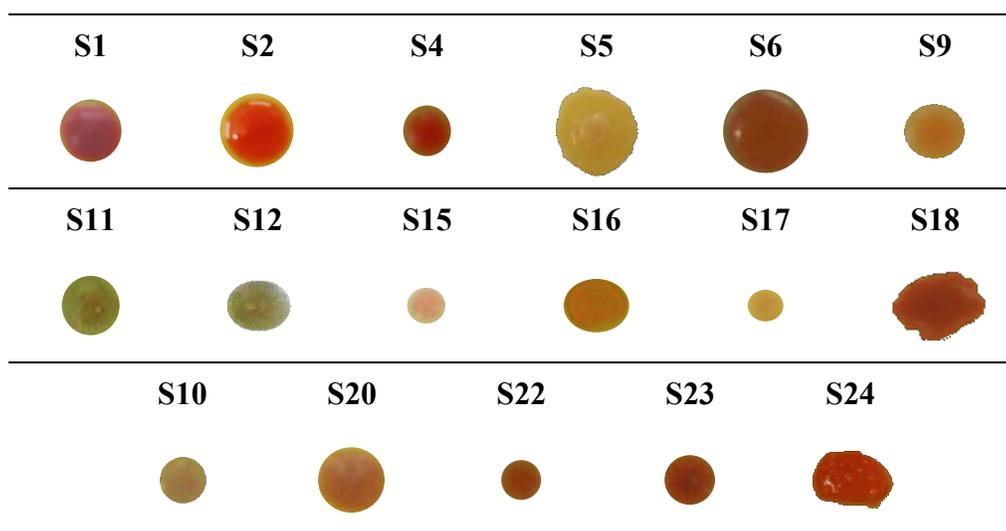
#### **4.2.1.1 Recuentos microbiológicos**

Se efectuaron las determinaciones en medios de cultivos con concentración salina similar a las del alimento del cual proceden (Onishi et al., 1979) considerando el rango típico de contenido de NaCl del producto en estudio (14-20% p/p) (Czerner y Yeannes, 2014). Asimismo, se tuvo en cuenta la clasificación de microorganismos halófilos de González-Hernández y Peña (2002) quienes establecieron que las bacterias halófilas que pueden crecer con 5-20% de NaCl corresponderían a las denominadas halófilas moderadas, mientras que las que se desarrollan con 20-30% de NaCl pertenecerían a las halófilas extremas. Por ello, se decidió efectuar los recuentos y aislamientos microbiológicos en medio de cultivo Gibbons con 15 y 20% de NaCl (denominado BH15 y BH20, respectivamente) a fin de obtener datos más representativos de los microorganismos que podrían desarrollarse.

Los resultados de recuentos microbiológicos para las diferentes muestras analizadas se muestran en la Tabla 4.1. A partir de la observación macroscópica de las colonias desarrolladas en las placas de cultivo, se encontró que las colonias presentaron diferentes características externas dependiendo de la muestra (sal o pescado) y también en la etapa del proceso (salmuera o maduración).

Se analizaron tres muestras de sal (A, B y C) de calidad alimentaria, entrefina y gruesa. Se encontró que en las sales A y B predominaron las colonias circulares coloreadas

en tonos rojizos/anaranjados (diámetro = 1-3 mm), seguidas por las colonias en forma de huevo frito en tonalidad beige (tamaño = 4-6 mm) y una pequeña cantidad de colonias circulares cremosas beige (diámetro = 1-2 mm). En la sal C, se desarrollaron colonias cremosas (diámetro = 1-2 mm) y también se detectaron algunas colonias pequeñas de color naranja (diámetro  $\leq 1$  mm). El recuento microbiano promedio en muestras de sal fue  $\sim 10^3$  UFC/g, con una riqueza (cepas representativas) de 7, 10 y 5 colonias en las sales A, B y C, respectivamente.



**Figura 4.1.** Diversas morfologías de las colonias desarrolladas a partir de las muestras de sal analizadas.

En ejemplares frescos de anchoíta, no se detectaron bacterias halófilas en medio Gibbons con diferente contenido de sal (G15 y G20) ( $< 10$  UFC / g), en concordancia con los resultados expuestos en la Sección 3.2.1.

Durante la etapa de salado húmedo, la mayoría de las colonias mostraron características morfológicas similares, prevaleciendo colonias cremosas de color beige (diámetro = 1-3 mm). También se observaron colonias coloreadas en tonos rojizos/anaranjados (diámetro = 1-2 mm). A lo largo de esta etapa, se encontró una riqueza de 30 colonias representativas. El tiempo de salado afectó directamente los recuentos de bacterias halófilas (Tabla 4.1). Se observó un fuerte aumento durante las primeras 2.5 h seguido de una tendencia decreciente hasta que se alcanzó un valor estable de  $\sim 10^4$  UFC/g

después de 5 h de salazón húmeda. Aunque es posible observar que los recuentos en BH20 son mayores que los determinados en BH15, la diferencia es menor que un ciclo logarítmico para todos los tiempos de muestreo del salado.

Con respecto a la etapa de maduración (Tabla 4.1), A partir del segundo mes de maduración, se detectó crecimiento bacteriano en BH15, no habiéndose detectado durante el primer mes ( $< 10$  UFC/g). La fase *lag* que se evidencia para BH15 de acuerdo por los resultados publicados por Lee y Choe (1974) en cuanto a la maduración de *Engraulis japonica* donde hallaron una fase *lag* de  $\sim 20$  días. El crecimiento desarrollado en BH15 constó de pequeñas colonias de color naranja brillante (diámetro = 1-2 mm) con apariencia translúcida, colonias coloreadas en tonos marrones y más grandes que las anteriores, y colonias blancas, planas y lisas también. Los recuentos de bacterias halófilas en el BH20 se detectaron desde el quinto mes hasta el final del proceso. Durante esta etapa prevalecieron colonias pequeñas en coloraciones rosa/coral.

En base a la clasificación de microorganismos halófilos según el requerimiento de sal (González-Hernández y Peña, 2002) y teniendo en cuenta las características de pigmentación y morfología (Holt, 1989), las colonias aisladas en BH15 y BH20 podrían clasificarse como halófilos moderados y extremos, respectivamente. Se debe tener en cuenta que una fracción de las bacterias contadas en BH15 y BH20 podría ser la misma cepa porque en realidad las bacterias halófilas crecen en un cierto rango de contenido de sal y no a una única concentración específica (Larsen, 1986).

En función de la detección de microorganismos halófilos extremos (Tabla 4.1), lo que evidencia un cambio en la microbiota de la etapa de maduración, se agruparon los datos de riqueza en dos sub-etapas: una primera parte de la maduración que abarca desde el inicio de la etapa hasta los cuatro meses inclusive (muestras de los días 4-98) y una segunda parte desde el quinto mes en adelante (muestras de los días 127-255). De este modo, se evidenció una menor riqueza de colonias en la maduración que en el período de salado húmedo.

Los recuentos microbiológicos por debajo del límite de detección al principio de la maduración se pueden explicar por una suma de causas. Previo a esta etapa se realiza el descabezado y eviscerado parcial lo que podría generar una disminución de la biota halófila. También se produce una abrupta modificación en las condiciones de crecimiento al empacar el pescado en barriles, dado que se colocan capas alternativas de anchoíta y sal que se mantienen presionadas para promover la expulsión de agua y grasa del tejido de los peces, así como para ayudar a desalojar el aire ocluido. La parte superior del barril queda cubierta por la solución de salmuera formada con el agua drenada y la sal añadida. Por lo tanto, el entorno para el desarrollo microbiológico cambia de aerófilo (salmuera) a microaerófilo (barriles). Además, se suma el aumento en el contenido de NaCl hasta valores del 14-20% p/p (Czerner y Yeannes, 2014). Estas modificaciones contribuirían al estrés y reducirían la biota halófila, lo que explicaría la falta de recuentos bacterianos durante el primer mes de maduración. Una vez que la microbiota se adapta a las nuevas condiciones ambientales, puede volver a crecer. Resulta interesante el hecho que los recuentos bacterianos obtenidos después del primer mes de maduración están en el mismo orden de magnitud que los determinados al final de la etapa de salado húmedo, lo que mostraría valores similares de biomasa en la fase estacionaria de crecimiento.

**Tabla 4.1:** Recuentos y riqueza de microorganismos halófilos aislados de sal, anchoita fresca y anchoíta durante las etapas de salado húmedo y madurado

	BH15 [log(CFU/g)]	BH20 [log(CFU/g)]	Riqueza
<u>Sal (IS1)</u>			
A	3,32±0,05	3,56±0,02	
B	3,53±0,02	3,71±0,05	22
C	3,45±0,06	3,62±0,03	
Anchoíta fresca	ND	ND	---
<u>Salado húmedo (IS2) [h]</u>			
0,5	4,63±0,01	5,11±0,01	
1,5	5,35±0,02	5,63±0,02	
2,5	6,08±0,02	5,99±0,02	
3,5	5,71±0,02	5,76±0,02	
5	4,31±0,02	4,45±0,02	30
8	4,11±0,05	4,87±0,05	
10	4,32±0,08	4,69±0,08	
12	4,25±0,02	4,45±0,02	
24	4,27±0,01	4,34±0,01	
30	4,13±0,05	4,34±0,05	
<u>Maduración [días]</u>			
1 <sup>era</sup> parte			
4	ND	ND	
10	ND	ND	
34	4,18±0,09	ND	12
69	3,97±0,17	ND	
73	4,08±0,15	ND	
2 <sup>da</sup> parte			
98	4,03±0,15	ND	
127	4,38±0,34	4,6±0,11	
134	4,14±0,12	3,30±0,09	15
198	4,38±0,15	4,41±0,10	
255	4,48±0,34	4,41±0,12	

ND (no detectado) corresponde a recuentos <10 UFC/g  
A, B, C: muestras de sal de calidad alimentaria

#### 4.2.1.2 Análisis estadístico

Todos los resultados del set de datos fueron variables categóricas. En la Tabla 4.2 se describen las categorías de cada test. Para el análisis estadístico se identificó cada origen de aislamiento con un código. La sal se identificó como IS1, la etapa de salado húmedo como IS2 y la maduración previamente dividida en dos sub-etapas (Tabla 4.1) se mantuvo de este modo denominando IS3 a la primera parte (inicio a cuatro meses inclusive) e IS4 a la segunda parte (quinto mes en adelante). La anchoíta fresca se omitió en esta clasificación ya que no se detectaron microorganismos halófilos de este origen (Tabla 4.1).

#### 4.2.1.3 Análisis Univariado y Bivariado

La Tabla 2 muestra los resultados del Análisis Univariado (distribución de frecuencia de respuestas) y Análisis Bivariados realizados. Los Análisis Bivariados se realizaron entre el origen del aislamiento y las otras variables observadas para explorar posibles relaciones entre las características de la población bacteriana y la etapa del proceso de donde se aislaron. Además, se exploró la relación entre variables con interés tecnológico.

Teniendo en cuenta que los halófilos rojos generalmente se asumen como responsables del deterioro de los productos de pescado salado (Gram y Huss, 1996), resulta interesante analizar si la pigmentación de la colonia tiene relación con las actividades que podrían conducir al desarrollo de *off-flavors* (lipólisis, proteólisis, indol y producción de H<sub>2</sub>S) y de la inocuidad del producto (actividad histidina-descarboxilasa) (Gram y Huss, 1996; Huss y Valdimarsson, 1990; Ramírez et al., 1994). Además, se incluyeron las pruebas de catalasa y oxidasa en base a sus implicaciones comprobadas en la mejora de la estabilidad del color y la disminución del desarrollo de la rancidez en productos cárnicos fermentados (Geisen et al., 1992). Por lo tanto, se llevaron a cabo análisis bivariados adicionales. El primero, entre la pigmentación y las siguientes variables: proteólisis, lipólisis, indol, H<sub>2</sub>S, oxidasa, catalasa y actividad histidina-descarboxilasa. La segunda, de la actividad proteolítica frente a la actividad lipolítica y la actividad histidina-

descarboxilasa. Los resultados obtenidos en cada caso para la prueba independiente se dan en la Tabla 4.2.

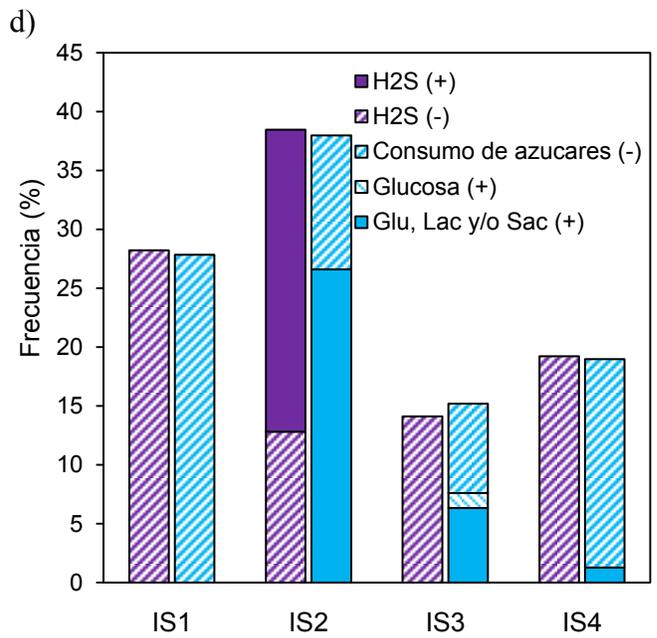
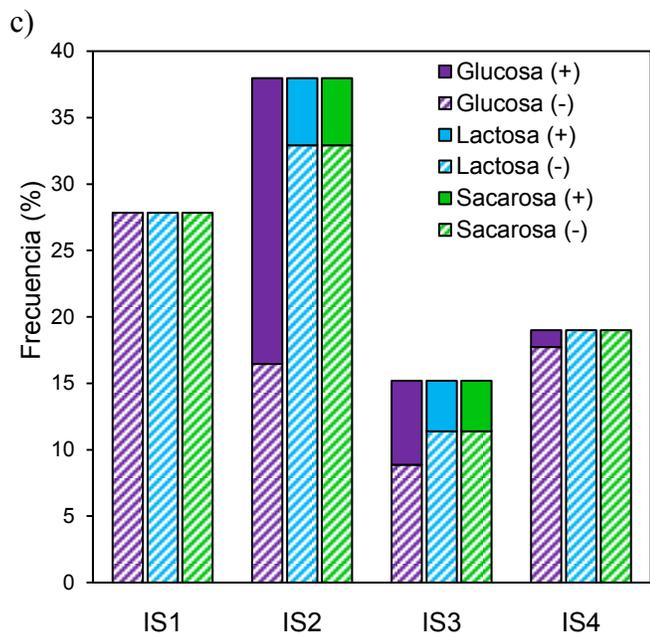
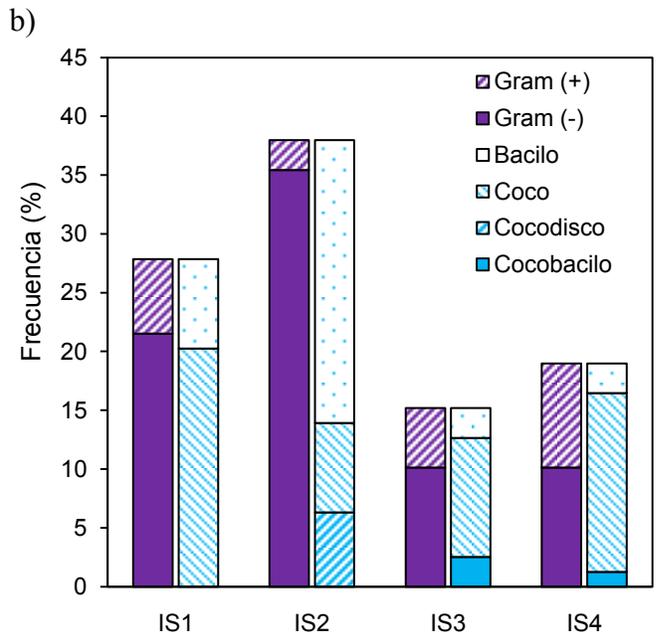
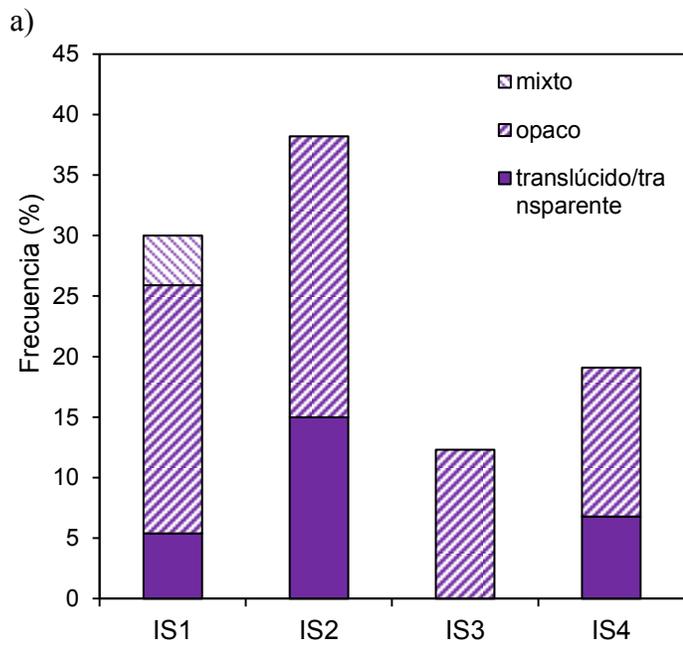
Las Figuras 4.2, 4.3 y 4.4 muestran los resultados obtenidos para aquellos casos en que las variables resultaron asociadas ( $p < 0.05$ ).

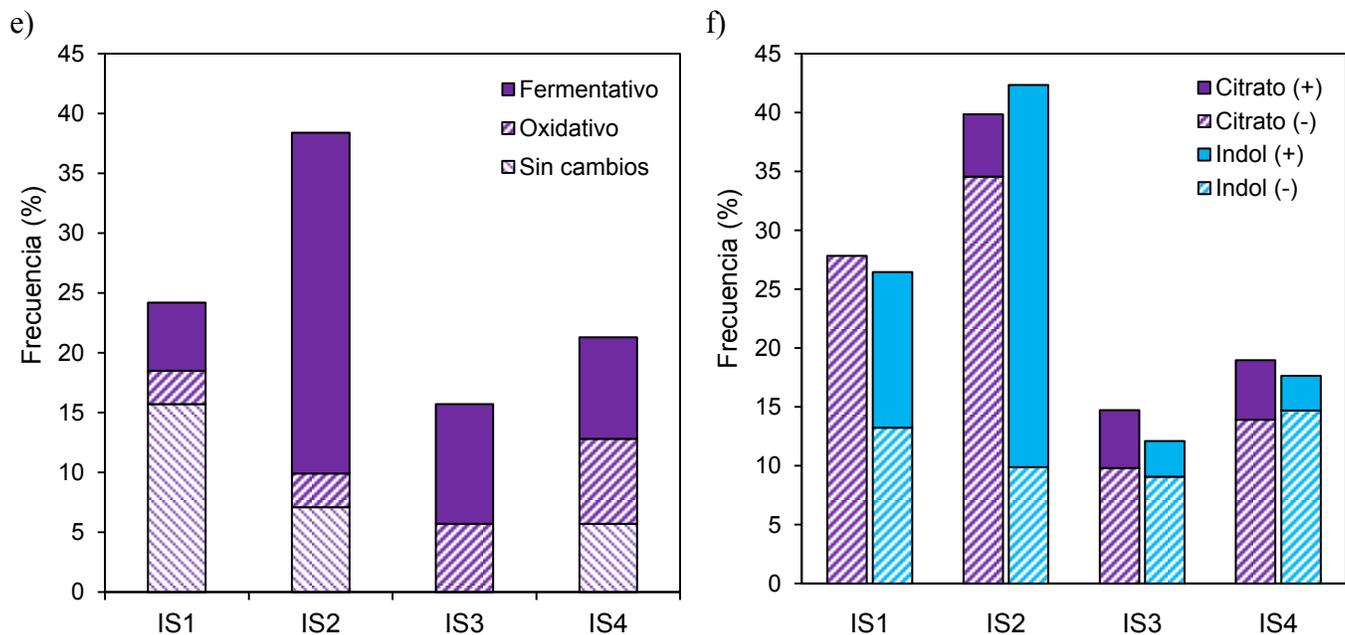
**Tabla 4.2:** Resultados de los Análisis Univariados y Bivariados

Variables		Categorías	Distribución de frecuencias	Test de independencia (valor p)*		
				Origen	Pigmentación	Proteólisis
Muestras	Origen	Sal (IS1)	27,85%	1,000	NA	NA
		Salado húmedo (IS2)	37,97%			
		Maduración hasta el cuarto mes (IS3)	15,19%			
		Maduración desde el quinto mes (IS4)	18,99%			
Apariencia de la colonia	Pigmentación (tonalidad rojiza/anaranjada)	Negativo	41,03%	0,067	1,000	NA
		Positivo	58,97%			
	Borde	Regular	77,61%	0,734	NA	NA
		Irregular	22,39%			
	Propiedades ópticas de la superficie	Mate	11,43%	1,000	NA	NA
		Brilloso	88,57%			
	Propiedades ópticas a través de la colonia	Translúcido/transparente	27,40%	0,045	NA	NA
		Ópaco	68,49%			
Mixto		4,11%				
Caracterización microscópica	Tinción de Gram	Negativo	77,22%	0,012	NA	NA
		Positivo	22,78%			
	Mofología celular	Bacilo	36,71%	0,000	NA	NA
		Coco	53,16%			
		Cocobacilo	3,80%			
		Cocodisco	6,33%			
Requerimiento de sal (% p/p)	0	Negativo	90,77%	0,593	NA	NA
		Positivo	9,23%			
	1	Negativo	56,6%	0,000	NA	NA
		Positivo	43,4%			
	5	Negativo	41,51%	0,000	NA	NA
		Positivo	58,49%			
	7.5	Negativo	21,54%	0,000	NA	NA
		Positivo	78,46%			
	10	Negativo	17,65%	0,003	NA	NA
		Positivo	82,35%			
	15	Negativo	0%	0,605	NA	NA
		Positivo	100%			

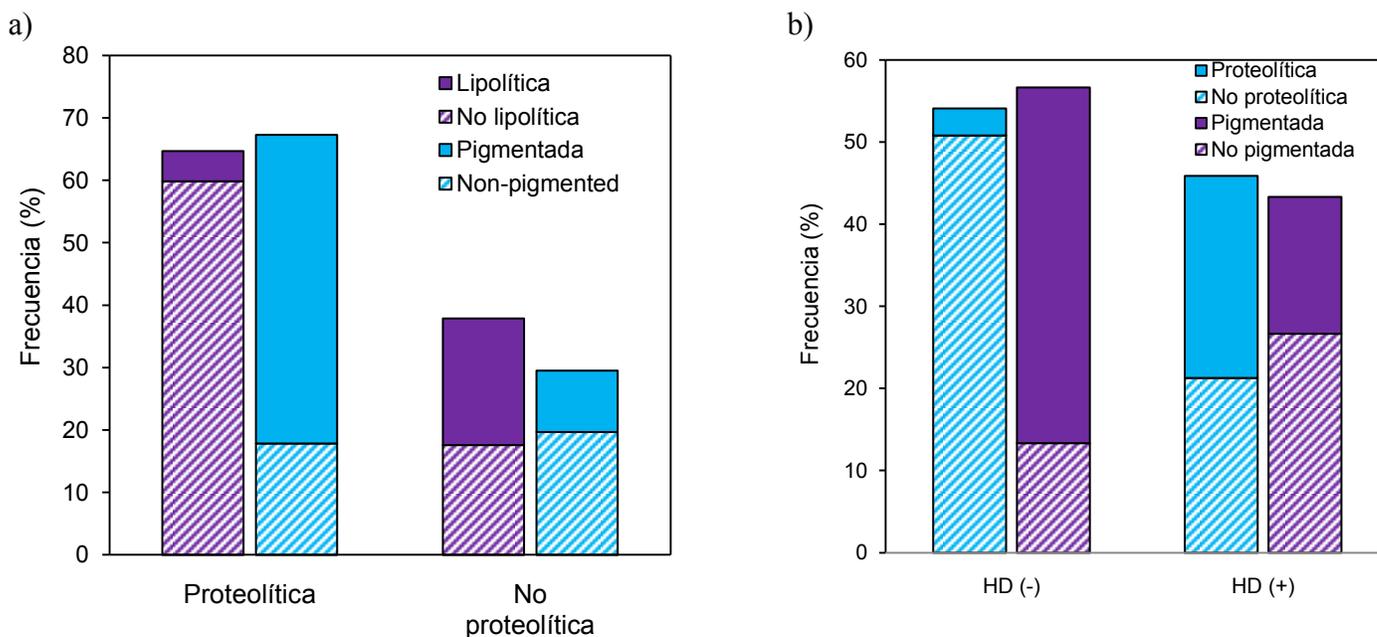
Pruebas bioquímicas	20	Negativo	3,85%	<i>0,034</i>	NA	NA
		Positivo	96,15%			
	Actividad citocromo oxidasa	Negativo	7,69%	0,452	0,310	NA
		Positivo	92,31%			
	Catalasa	Negativo	10,13%	0,693	0,232	NA
		Positivo	89,87%			
	Motilidad	Negativo	47,37%	0,053	NA	NA
		Positivo	52,63%			
	Reducción de nitrato	Negativo	27,54%	0,194	NA	NA
		Positivo	72,46%			
	Utilización de citrato en Agar Citrato de Simmons	Negativo	84,81%	<i>0,016</i>	NA	NA
		Positivo	15,19%			
	Producción de ácido por fermentación de glucosa	Negativo	70,89%	<i>0,000</i>	NA	NA
		Positivo	29,11%			
	Producción de ácido por fermentación de lactosa	Negativo	91,14%	<i>0,031</i>	NA	NA
		Positivo	8,86%			
	Producción de ácido por fermentación de sacarosa	Negativo	75,38%	<i>0,000</i>	NA	NA
		Positivo	24,62%			
	Capacidad de producir indol	Negativo	47,06%	<i>0,001</i>	0,210	NA
		Positivo	52,94%			
Actividad proteolítica	Negativo	73,53%	0,452	<i>0,003</i>	NA	
	Positivo	26,47%				
Actividad lipolítica	Negativo	58,82%	0,641	0,069	NA	
	Positivo	41,18%				
Actividad histidina-descarboxilasa	Negativo	54,1%	NA*	<i>0,010</i>	<i>0,001</i>	
	Positivo	45,9%				
Capacidad de producir H <sub>2</sub> S (medio TSI)	Negativo	74,36%	NA	0,051	NA	
	Positivo	25,64%				
Producción de ácido y gas de glucosa, lactosa y sacarosa (medio TSI)	Sin fermentación	64,56%				
	Fermentación de glucosa	1,27%	NA	NA	NA	
	Fermentación de glucosa, lactosa y/o sacarosa	34,18%				
Habilidad para fermentar y/u oxidar glucosa (medio OF)	Sin cambios	28,57%				
	Oxidativo	18,57%	<i>0,000</i>	NA	NA	
	Fermentativo	52,86%				

Valores en letra itálica indica que las variables están asociadas ( $p < 0.05$ ). NA: No analizado. \*La relación entre actividad histidina-descarboxilasa y el origen del aislamiento no se determinó por no disponer de datos durante la segunda parte de la maduración.

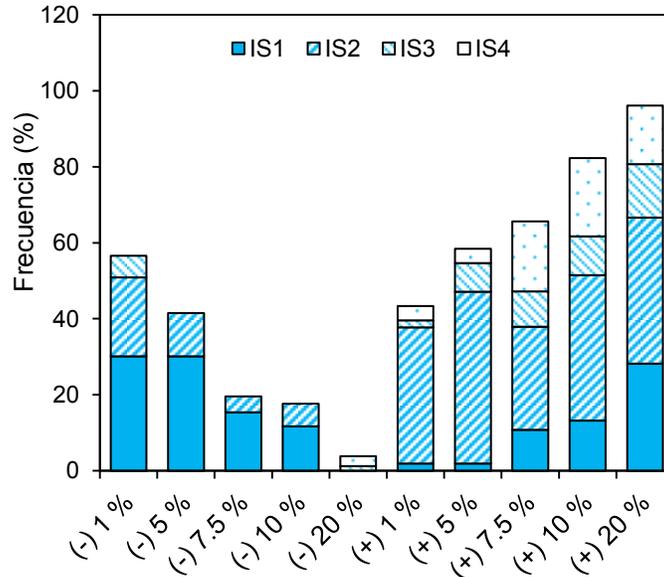




**Figura 4.2:** Distribución de frecuencias de resultados de test fenotípicos cuyas variables resultaron asociadas con el origen del aislamiento (IS1: sal, IS2: salado húmedo, IS3: 1<sup>era</sup> parte de la maduración, IS4: 2<sup>da</sup> parte de la maduración) ( $p < 0.05$ ). a) Morfología de la colonia; b) Morfología celular; c) Consumo de azúcares; d) TSI; e) OF; f) Citrato e indol.



**Figura 4.3.** Distribución de frecuencias de resultados de test fenotípicos para las variables asociadas ( $p < 0.05$ ) a) capacidad proteolítica vs capacidad lipolítica y pigmentación y b) actividad histidina-d Descarboxilasa (HD) vs capacidad proteolítica y pigmentación.



**Figura 4.4.** Distribución de frecuencias de respuestas hacia tolerancia/requerimiento de sal de la sal procedentes de distintos orígenes de aislamiento (IS1: sal, IS2: salado húmedo, IS3: 1<sup>era</sup> parte de la maduración, IS4: 2<sup>da</sup> parte de la maduración).

Entre las variables macroscópicas determinadas en esta investigación, solo las propiedades ópticas a través de la colonia resultaron relacionadas con el origen del aislamiento (Tabla 4.2, Figura 4.2a). Las muestras de sal mostraron más diversidad en las propiedades ópticas a través de la colonia. Estos datos son de especial interés porque las cepas representativas se seleccionaron en función del aspecto de la colonia y esta propiedad afecta la riqueza observada en las placas. Por otro lado, los aislamientos pigmentados en tonos rojizos/anaranjados fueron 58.97% de las cepas representativas totales y resultaron independientes del origen de aislamiento. Su importancia radica en que los halófilos rojos están asociados con el deterioro. Las bacterias rojas halófilas extremas son responsables de la formación de un sedimento rojizo en la superficie de los productos marinos salados, produciendo *off-odors* y *flavors* relacionados con el deterioro (Félix et al., 2006; Gram and Huss, 1966). Los resultados de este estudio indican que las cepas pigmentadas y no pigmentadas se distribuyen uniformemente sobre los diferentes orígenes de aislamiento, lo que significa que los halófilos rojos no están particularmente desarrollados en una etapa específica del proceso.

Con respecto a las observaciones microscópicas, los aislamientos fueron principalmente cocos, seguidos por células con forma de bastón; siendo la mayoría de ellos Gram negativos. Ambas características se relacionaron con el origen de los aislamientos (Tabla 4.2). Como se puede ver en la Figura 2b, las células con forma de disco aparecieron solo durante el salado húmedo, mientras que los cocobacilos cortos se observaron solo durante la maduración. Además, la diferencia principal encontrada con la tinción de Gram es que las cepas positivas aparecieron en una proporción mayor durante la maduración y en una proporción menor durante el salado húmedo y en las muestras de sal. Cabe destacar que la prevalencia de microorganismos gram negativos concuerda con lo reportado por Lee y Choe (1974) durante la maduración de *Engraulis japonica*, mientras que en sus estudios no hubo diferencias importantes entre cocos y bacilos.

En cuanto a las pruebas bioquímicas, la mayoría de los aislados presentaron actividad de citocromo oxidasa y reacción de catalasa positiva, resultando independientes del origen de los aislamientos (Tabla 4.2). Aunque no hay investigaciones que relacionen estas capacidades con la calidad sensorial del pescado fermentado, estas podrían ser características deseables, considerando que se han establecido como propiedades funcionales importantes de los principales cultivos bacterianos iniciadores para la fermentación de productos cárnicos. La enzima catalasa cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno, una forma reactiva de oxígeno implicada en la oxidación de ácidos grasos insaturados. Además, la actividad de la citocromo-oxidasa contribuiría a reducir el oxígeno presente en el seno del barril y evitaría la rancidez debido a un exceso de aldehídos por la oxidación de los ácidos grasos (Talon y Leroy, 2014). Lee y Choe (1974) también encontraron prevalencia de microorganismos catalasa positiva, pero no de actividad citocromo-oxidasa positiva.

Otras características bioquímicas estudiadas fueron la utilización de azúcares, nitratos y citratos y motilidad. Estas pruebas no tienen una relación directa que haya sido reportada respecto a las características del proceso, pero contribuyen al estudio general de las características de la comunidad. Las pruebas de motilidad y nitrato resultaron

independientes del origen de aislamiento, con proporciones similares entre motiles e inmóviles y prevalencia de aislamientos con capacidad de reducir los nitratos.

Por otro lado, la utilización de citrato y de azúcares estuvo fuertemente relacionada con el origen de la cepa. Como se ve en la Figura 4.2f, la diferencia principal sobre la utilización de citrato es que no se detectaron cepas positivas procedentes de la sal. Las pruebas de azúcares individuales en medio líquido mostraron que la mayoría de las colonias no consumieron glucosa, lactosa ni sacarosa. Sin embargo, se determinó un porcentaje más alto de utilización de azúcares en agar TSI (Tabla 4.2). Esta diferencia podría explicarse por la diferente composición de cada medio de cultivo.

Con respecto a la capacidad de oxidación y/o fermentación de la glucosa (medio OF), hubo un aumento en los resultados positivos en comparación con la prueba de TSI y la prueba de consumo de glucosa. Este hecho se puede atribuir al alto porcentaje de aislados con metabolismo fermentativo (anaeróbico) (Fig. 4.2e). Con respecto a la dependencia de la utilización de azúcares y el origen de aislamiento (Figuras 4.2c, 4.2d y 4.2e), la mayor cantidad de fermentadoras de azúcares se agrupan en aislamientos de la etapa de salado húmedo, seguido de los de la primera parte de la maduración y luego de la segunda parte de la maduración. En cuanto a las cepas aisladas de muestras de la sal, no se detectaron fermentadores de azúcares mediante ensayos de azúcares individuales o medio TSI mientras que se determinó una baja proporción de cepas capaces de oxidar y fermentar glucosa en OF. Estos resultados coinciden con los hallados por Lee y Choe (1974) durante la maduración de *E. japonicus* quienes mencionan que podría deberse a una selección natural de los microorganismos supervivientes en base a los sustratos disponibles, ya que el contenido de azúcares disponibles en pescado es muy bajo.

Entre las características bioquímicas que podrían estar relacionadas con el proceso, la producción de indol y la actividad lipolítica presentaron los mayores resultados positivos (alrededor del 40-50%) y las cepas con producción de H<sub>2</sub>S y las capacidades proteolíticas fueron de alrededor del 25%. Las actividades proteolíticas y lipolíticas se vieron equilibradas a lo largo del proceso y resultaron ser independientes de la materia prima de la

cual fueron aisladas. Con respecto a la producción de indol y H<sub>2</sub>S, se relacionaron fuertemente con el origen de la cepa (Tabla 4.2). Como se puede ver en las Figuras 4.2d y 4.2f, las cepas productoras de H<sub>2</sub>S se encontraron principalmente durante el salado húmedo y las productoras de indol en muestras de la sal y salado húmedo, pero no durante la maduración. Estos resultados son de gran interés debido a su implicancia en el desarrollo de *off-flavors* y el deterioro de los productos de pescado salado (Huss y Valdimarson, 1990).

La distribución equilibrada de cepas proteolíticas y lipolíticas durante todo el proceso es deseable debido a su contribución al desarrollo de textura y aroma final, respectivamente. Aunque la contribución de los microorganismos al mecanismo de proteólisis en el pescado salado no se ha estudiado en detalle, los resultados obtenidos en esta investigación y los reportados por Czerner y Yeannes (2014) son consistentes con un rol colaborativo y consecutivo de enzimas endógenas y enzimas microbianas en la proteólisis ocurrida durante el proceso, de forma tal que las enzimas endógenas preparan los sustratos peptídicos para la posterior acción de las enzimas microbianas (Hugas y Monfort, 1997).

Del mismo modo, la lipólisis microbiana contribuiría a la generación de ácidos grasos libres durante la maduración que están directamente relacionados con el desarrollo del sabor (Triqui y Reineccius, 1995a y 1995b). Un exceso de cualquiera de estas actividades durante una determinada etapa del proceso podría conducir a una pérdida o deterioro de la calidad (Czerner y Yeannes, 2014).

Por otro lado, la prueba de independencia mostró que la actividad proteolítica frente a la pigmentación ( $p = 0,003$ ) y proteolítica vs actividades lipolíticas ( $p = 0,000$ ) estaban fuertemente relacionadas, mientras que la lipólisis, indol, H<sub>2</sub>S, catalasa, oxidasa y pigmentación eran independientes ( $p \geq 0,069$ ). El hecho que la mayoría de las halófilas rojas (pigmentadas) fueran proteolíticas (Fig. 4.3a) es coherente con la literatura y es una causa conocida del deterioro del pescado salado (Huss y Valdimarson, 1990). Por el contrario, como se muestra en la Fig. 4.3a, las cepas proteolíticas generalmente no son lipolíticas, lo que podría sugerir que la participación de un consorcio bacteriano para generar una

aceleración del proceso de maduración es necesaria debido a que las diferentes cepas contribuyen con propiedades disímiles (Czerner y Yeannes, 2014; Musmeci, 2001; Lee y Choe, 1974).

En cuanto a pruebas bioquímicas que pudieran tener relación con la inocuidad del producto, se determinó la actividad histidina-descarboxilasa dado que esta enzima es la responsable de la formación de histamina en alimentos (Niven et al., 1981, Ramírez et al., 1994). Se hallaron cepas positivas aisladas de sal y de muestras de anchoíta durante el salado húmedo y la primera parte de la maduración. Se encontró que aproximadamente la mitad de las cepas analizadas resultaron potenciales formadoras de histamina. En este caso, no se estudió su relación con el origen de aislamiento dado que no se dispuso de datos de esta prueba en la segunda parte de la maduración. El hecho que en los estadios analizados se hallaran cepas halófilas formadoras de histamina concuerda con los estudios realizados por Ramírez et al. (1994), por lo que la investigación de alternativas para la prevención de la presencia de histamina resulta de suma importancia a fin de evitar pérdidas de alimentos. Respecto a la actividad histidina-descarboxilasa se realizó la prueba de independencia frente a pigmentación y a actividad proteolítica resultando fuertemente relacionada en ambos casos. La relación observada (Figura 4.2b) muestra que una menor proporción de cepas halófilas rojas tiene relación con la potencial formación de histamina que las cepas beige/crema. En cuanto a la actividad histidina-descarboxilasa y la capacidad proteolítica se observa que en general las que no sintetizan esta enzima tampoco son proteolíticas.

El estudio del requerimiento/tolerancia de sal para cepas aisladas mostró mayores respuestas positivas cuando el contenido de sal se incrementó progresivamente de 0 a 15% p/v con una ligera disminución al 20% p/v (Tabla 4.2). La prueba bivariada del requerimiento/tolerancia de sal con el origen de aislamiento resultó fuertemente relacionada para concentraciones de 1, 5, 7.5, 10 y 20% p/v. Al representar los resultados positivos y negativos en el eje de abscisas, se puede ver claramente que hay una tendencia hacia mayor proporción de resultados negativos a menores contenidos de sal, mientras que los resultados positivos aumentan al incrementar el contenido de sal (Fig. 4.4). Esto puede relacionarse con el hecho que los mayores hallazgos de microorganismos se dan en condiciones

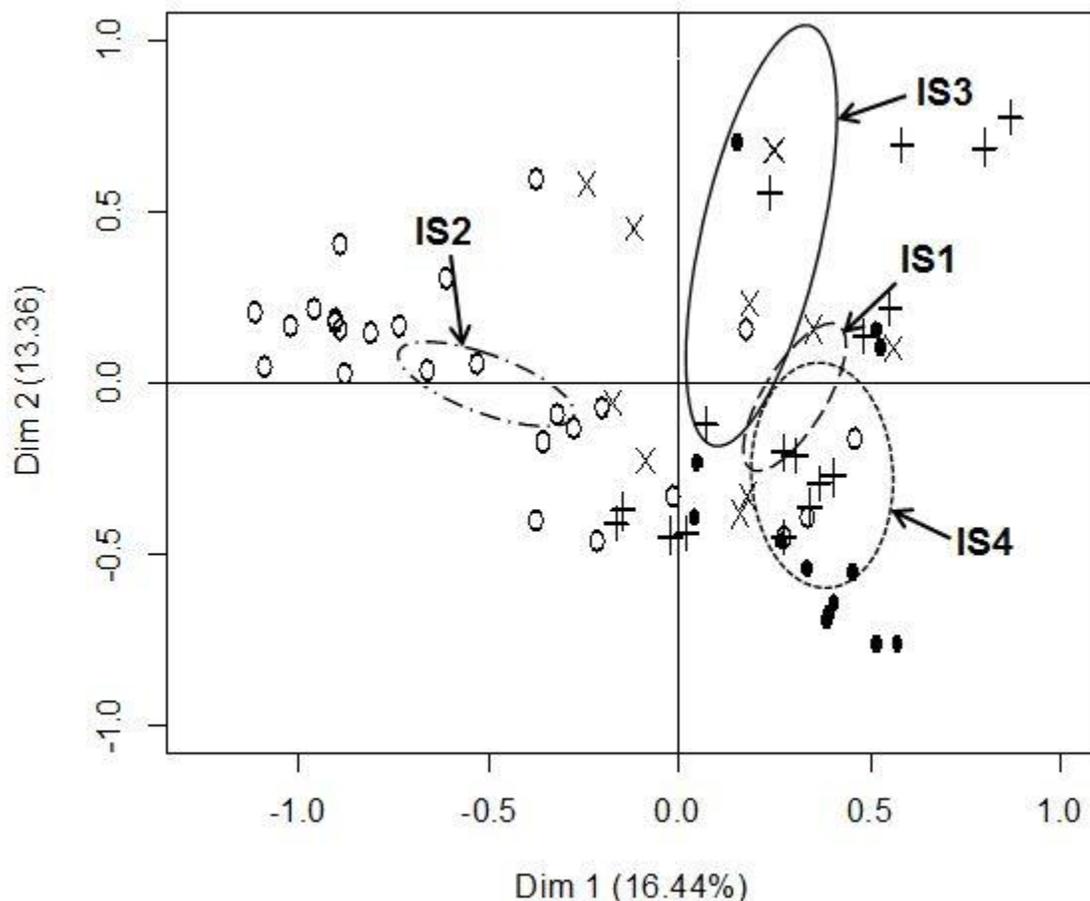
similares a las de el origen de las que se aíslan, por lo tanto es de esperarse que las cepas encontradas requieran contenidos de sal similares a los de la anchoíta salada (14-18% NaCl p/p) y tengan menor actividad al alejarse de estos valores (Czerner y Yeannes, 2014, Félix et al., 2006 y 2007; Onishi et al., 1979). Cuando se analizó el origen de aislamiento, la principal diferencia encontrada fue que los aislamientos efectuados de muestras de sal tuvieron menor capacidad para crecer a bajas concentraciones salinas (1, 5, 7,5 y 10% p/v), en comparación con las cepas procedentes de otros orígenes. Por otro lado, en la segunda parte de la maduración aparecieron cepas que no crecieron con un contenido de 20% p/v de sal. Estos resultados indicarían que probablemente las cepas halófilas extremas procedían principalmente de muestras de sal.

#### **4.2.1.4 Análisis Multivariado**

Las pruebas que tienen relación con el consumo de sustratos o generación de metabolitos podrían estar relacionadas con el desarrollo de las características típicas de la anchoíta salada-madurada o su deterioro. Con el objetivo de buscar posibles asociaciones entre las características microbianas en común que pudieran tener implicancias tecnológicas y las distintas etapas del proceso de elaboración, se efectuó un Análisis de Correspondencia Múltiple (ACM) seguido de un Análisis de Cluster mediante Agrupamiento Jerárquico de Componentes Principales (AJCP). Estas técnicas son complementarias para la exploración de datos. En primera instancia, el ACM reconoce patrones y asociaciones en un conjunto de datos de múltiples variables categóricas y realiza una reducción de dimensiones que permite eliminar los últimos componentes, lo que significa eliminar el ruido y hacer que la agrupación por características comunes mediante el AJCP sea más robusta (Escofier y Pagès, 1998). Para este análisis, no se consideró la actividad histidina-descarboxilasa porque los datos faltantes podían interferir en el análisis y además se excluyeron la apariencia de colonia, las características microscópicas y el requerimiento de sal por no tener relación con el desarrollo de las características típicas del producto. Por lo tanto, se analizaron los resultados de 14 pruebas bioquímicas y el origen de aislamiento, dado un total de 15 variables.

La prueba de Chi-cuadrado se aplicó al conjunto de datos para seleccionar las variables significativas ( $p < 0.05$ ) para el ACM. El origen del aislamiento se estableció como variable complementaria para el análisis, es decir, como variable descriptiva pero no calificativa. Este tipo de variables no contribuye a la inercia, pero puede proyectarse en las dimensiones después del análisis original de las variables. De las 15 variables analizadas, 11 fueron significativas ( $p \leq 0.024$ ): origen del aislamiento, capacidad de producción de  $H_2S$  y producción de ácido y gas a partir de glucosa, lactosa y sacarosa (medio TSI); producción de ácido a partir de glucosa, lactosa y sacarosa; capacidad de oxidación y/o fermentación de la glucosa (medio OF); actividad de citocromo-oxidasa; motilidad; capacidad de producción de indol y actividad proteolítica. El hecho que el origen del aislamiento de las cepas resultará significativa es el primer indicio de que esta variable es de importancia incluso haciendo un análisis de todas las características bioquímicas en simultáneo. La reacción de catalasa, la reducción de nitrato, la utilización de citrato en agar citrato Simmons y la actividad lipolítica no fueron significativos, por lo tanto no se incluyeron en ACM (Lebart et al., 1995; Escofier y Pagès, 1998).

El ACM transformó las variables incluidas en el análisis (variables significativas) en ejes o dimensiones (la diferencia entre la suma de categorías de variables y el número de variables dio un total de 15 ejes). A partir de este análisis, el 80% de la inercia se explicó con 11 ejes. En la Fig. 4.5 se puede observar la locación de cada individuo (cepa) en las dos primeras dimensiones (se plasma en 2 ejes un análisis de 11 ejes) y las elipses de confianza del 95% para cada origen de aislamiento. Los primeros dos componentes capturaron el 30.3% de la variabilidad. Cabe mencionar que mediante el ACM no se pretende explicar un determinado porcentaje de inercia, sino que el objetivo es trabajar con un número de dimensiones reducido y con la menor pérdida de información posible (Escofier y Pagès, 1998).

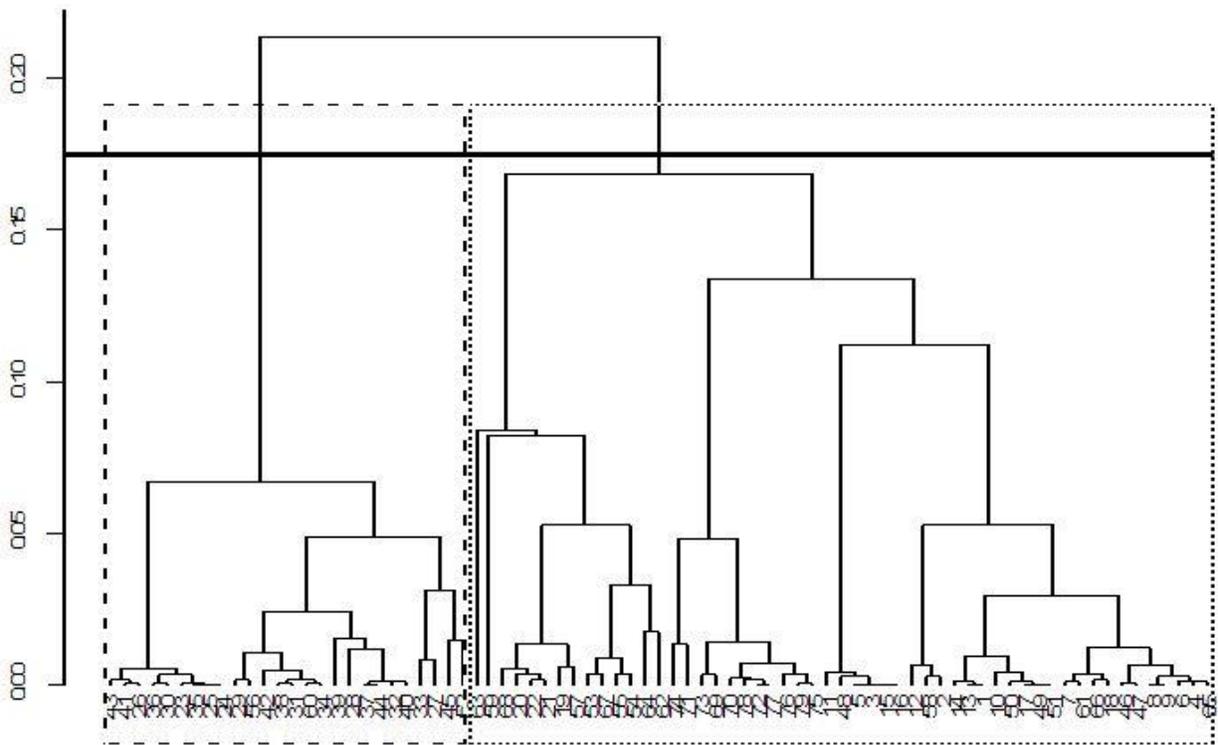


**Figura 4.5:** Mapa de factores del Análisis de Correspondencias Múltiple que muestra las posiciones de cada cepa mediante resultados de pruebas bioquímicas junto con orígenes de aislamiento.

Leyenda: + = IS1, muestras de sal; o = IS2, etapa de salmuera; = IS3: primera etapa de maduración (hasta el cuarto mes); • = IS4, segunda etapa de maduración (desde el quinto mes en adelante). Las elipses de confianza del 95% se representan para cada origen de aislamiento.

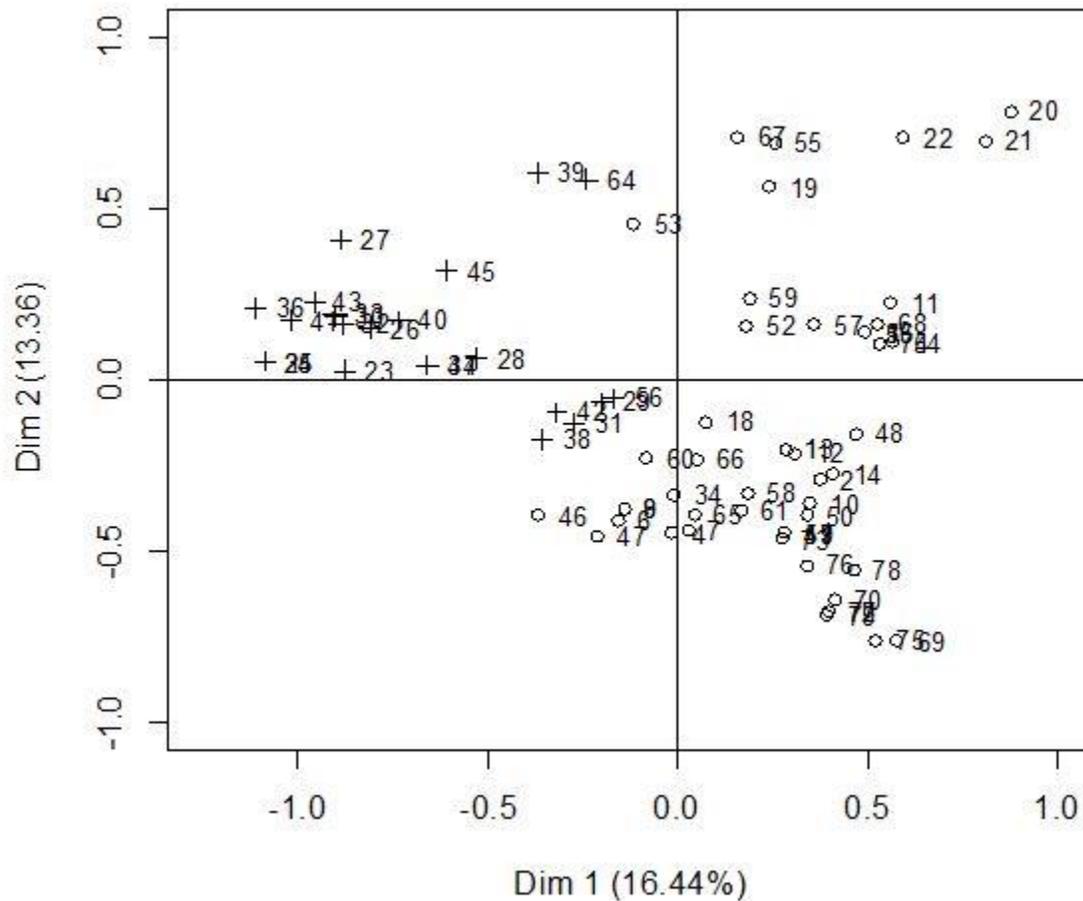
Como se puede observar en el dendrograma (Figura 4.6), a partir del AJCP las cepas se clasificaron en 2 grupos a una distancia de amalgamamiento (*linkage distance*) de 0.175. En el dendrograma, es posible discernir la conformación de 2 grupos. Cada origen de aislamiento y combinación de cluster se expone dentro del mapa de factores como una combinación de número/forma (Fig. 4.7). Los números 1 a 22 corresponden a aislamientos de sal (IS1), 23 a 52 de la etapa de salado húmedo (IS2), 53 a 64 de la primera parte de maduración (IS3) y 65 a 79 de la segunda parte de maduración (IS4). Los conglomerados resultaron bien definidos considerando las características bioquímicas y la conformación de

los grupos. La Tabla 4.3 incluye la información de las variables que describen cada grupo y la descripción de la procedencia de los aislados que constituyen al grupo. Cla/Mod representa el porcentaje de cepas que tienen la modalidad "i" y pertenecen al grupo "j" y Mod/Cla, el porcentaje de cepas pertenecientes al grupo "j" que muestra la modalidad "i". Es decir, para la primera prueba enumerada en la tabla, "Producción de ácido y gas a partir de glucosa, lactosa y sacarosa (medio TSI)", Cla/Mod es el porcentaje de cepas que son "Glucosa, lactosa y/o fermentador de sacarosa (medio TSI)" y pertenecen al Grupo 1; Mod/Cla es el porcentaje de cepas pertenecientes al Grupo 1 que son "Glucosa, lactosa y/o fermentador de sacarosa (medio TSI)".



**Figura 4.6:** Dendrograma de los aislamientos del proceso de salado-madurado de anchoita, mostrando las relaciones basado en las pruebas bioquímicas.

Legenda: - - = Cluster 1, ..... = Cluster 2.



**Figura 4.7:** Mapa de factores del Análisis de Correspondencias Múltiple que muestra la pertenencia de las cepas a cada cluster y el origen de aislamiento de la cual proceden. Leyenda: + = Cluster 1; ° = Cluster 2. Números 1 a 22 corresponde a aislamientos de sal (IS1), 23 a 52 del salado húmedo (IS2), 53 a 64 de la primera parte de la maduración (IS3) y 65 a 79 de la segunda parte de la maduración (IS4).

Las cepas pertenecientes al Grupo 1 se agrupan principalmente por su capacidad para producir ácido a partir de azúcares, pudiendo fermentar la glucosa en condiciones anaeróbicas. No se ha demostrado que el consumo de azúcares tenga implicancias en el proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada, pero son características metabólicas de las cepas. Además, se identificó como productor de indol y sulfuro de hidrógeno y principalmente constituido por bacterias móviles. Resulta interesante que este grupo se describe como procedente de la etapa de salado húmedo y no hay cepas de la sal o de la segunda parte del madurado formando parte del mismo. Descriptores tales como

producción de H<sub>2</sub>S e indol han sido declarados no deseables para el proceso como se mencionó anteriormente (Huss y Valdimarson, 1990).

El Grupo 2 fue descrito como no fermentador de azúcares (TSI y prueba individual de azúcares en caldo), no productor de H<sub>2</sub>S, no productor de indol, inmóvil y con actividad citocromo-oxidasa. A pesar que el origen de aislamiento no era un descriptor del Grupo 2, es notable que este grupo incluye todas las cepas provenientes de la sal y de la segunda parte de la maduración, el 83.3% de los aislados de la primera parte de la maduración y solo el 26.7% del salado húmedo. Esta agrupación indica que las cepas aisladas de la maduración muestran características bioquímicas similares a las aisladas de la sal, lo que podría sugerir una participación positiva en el proceso ya que no presentaron actividades relacionadas con el deterioro como lo hizo el Grupo 1.

En este sentido, investigaciones recientes se han enfocado en el estudio de arqueas halófilas para la mejora del proceso de maduración encontrando que la inoculación de las mismas puede ser beneficiosa (Alfonzo et al., 2017; Alkolkar et al., 2010; Aponte et al., 2010).

**Tabla 4.4:** Descripción de los clusters.

Cluster	Caracterización del cluster por orden decreciente de Cla/Mod Mod/Cla*	Frecuencia	Porcentajes de cepas (%) sobre el total de cada origen de aislamiento (porcentaje:origen)	Constitución del cluster (%) según el origen de aislamiento de las cepas (porcentaje:origen)
1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fermentador de Glu, Lac y/o Sac (medio TSI)</li> <li>- Fermentador de Sac (prueba en caldo)</li> <li>- Origen de aislamiento: etapa de salado húmedo</li> <li>- Productor de H<sub>2</sub>S (medio TSI)</li> <li>- Fermentador de Glu (prueba en caldo)</li> <li>- Productor de indol</li> <li>- Metabolismo fermentativo de la Glu (anaeróbico en medio OF)</li> <li>- Móvil</li> </ul>	24	73,3%: salado húmedo 16,7%: maduración (primera parte)	91,7%: salado húmedo 8,3%: maduración (primera parte)
2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No fermentador de azúcares (medio TSI)</li> <li>- No productor de H<sub>2</sub>S (medio TSI)</li> <li>- No fermentador de Glu (prueba en caldo)</li> <li>- Inmóvil</li> <li>- No productor de indole</li> <li>- No fermentador de Sac (prueba en caldo)</li> <li>- No fermentados de Lac (prueba en caldo)</li> <li>- Actividad citocromo-oxidasa positiva</li> </ul>	55	100%: sal 26,7%: salado húmedo 83,3%: maduración (primera parte) 100%: maduración (segunda parte)	40,0%: sal 14,5%: salado húmedo 18,2%: maduración (primera parte) 27,3%: maduración (segunda parte)

\*Cla/Mod representa el porcentaje de cepas que tienen la modalidad "i" y pertenecen al grupo "j" y Mod/Cla, el porcentaje de cepas pertenecientes al grupo "j" que muestra la modalidad "i".

Glu: glucosa, Sac: sacarosa, Lac: lactosa

La conformación de clusters es consistente con los resultados de recuentos microbiológicos (Tabla 4.1) en los que la riqueza de cepas presentada durante el salado húmedo se redujo drásticamente al comienzo de la maduración a recuentos ND (<10 UFC/g) con una proliferación posterior de diferentes cepas con propiedades bioquímicas similares a la microbiota de sal. Esta similitud entre las características de las cepas aisladas de sal y de la maduración puede observarse también por la proximidad de los orígenes de los aislamientos cuando se proyectan en el mapa de factores (Fig. 4.5). Las elipses de confianza correspondientes a IS1 e IS4 están superpuestas e IS3 se encuentra muy cerca de las anteriores. Por el contrario, IS2 está claramente discriminado de los otros orígenes de aislamiento. El hecho que el Grupo 1 incluya características no deseables con cepas procedentes del salado húmedo mientras que el Grupo 2 relaciona cepas aisladas principalmente de sal y de la maduración con algunas actividades bacterianas deseables indicaría que el proceso de salado-madurado de anchoíta favorece la selección natural de bacterias beneficiosas para el desarrollo de los atributos sensoriales del producto típico. Sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar esta hipótesis.

Es interesante que ningún grupo se caracterizara por propiedades proteolíticas o lipolíticas, estando este resultado de acuerdo con los resultados del análisis bivariado que indicó la independencia entre el origen del aislamiento y estas dos actividades.

Los compuestos derivados de la proteólisis y la lipólisis contribuyen al desarrollo del sabor característico. La proteólisis también contribuye al desarrollo de la textura (Czerner y Yeannes, 2014; Gram y Huss, 1996), mientras que la lipólisis está más relacionada con el aroma del producto (Triqui y Reineccius, 1995). Sin embargo, grandes cantidades de bacterias proteolíticas y/o lipolíticas podrían conducir a un desarrollo desequilibrado de las características sensoriales durante la maduración o acelerar el final de la vida útil al producir sabores extraños (Czerner y Yeannes, 2014). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la influencia de las actividades microbiológicas proteolíticas y lipolíticas en el desarrollo del sabor característico sería continua durante el proceso de maduración.

#### **4.2.2. Determinación de la validez del agrupamiento de características de cepas de la maduración**

Una vez que la anchoíta salada-madurada ha llegado a la maduración óptima, continúan sucediendo cambios que deterioran el producto llevándolo a un estado sobremadurado. Por ello, cobra importancia estudiar la presencia de microorganismos halófilos durante este período. Asimismo, resulta interesante contrastar los resultados obtenidos del Análisis Multivariado (Sección 4.2.1.4) sobre las características fenotípicas de los microorganismos halófilos del proceso de salado-madurado de anchoíta con otro set de datos de diferentes muestras.

En este sentido, se aislaron cepas halófilas de filetes de anchoíta salada-madurada en aceite y se caracterizaron cepas halófilas provenientes del cepario del GIPCAL (Grupo de Investigación, Preservación y Calidad de Alimentos) de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

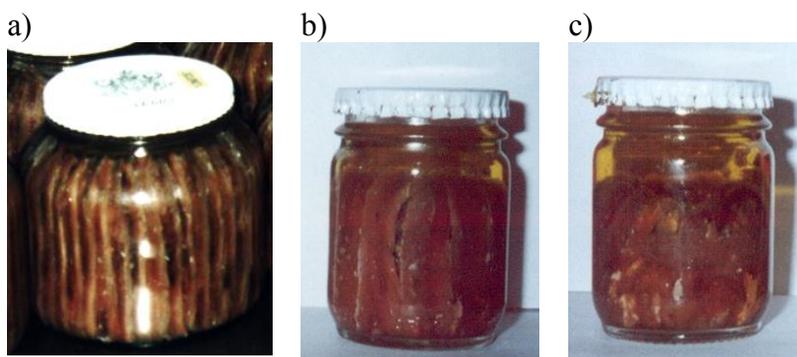
##### **4.2.2.1 Descripción de las muestras**

Se analizaron 12 muestras de filetes de anchoíta en aceite de un total de 8 plantas elaboradoras y con diversos tiempos desde su elaboración, tanto dentro del tiempo recomendado para su consumo como muestras sobremaduradas y con deterioro avanzado (Fig. 4.8 y Tabla 4.5).

**Tabla 4.5:** Descripción de las muestras de filetes de anchoíta en aceite

Identificación de la muestra	Establecimiento elaborador*	Fecha de vencimiento	Aspecto general
FLa	7	1995	Deterioro avanzado, derrumbe del filete.
FLb	8	2003	Deterioro avanzado, derrumbe del filete.
FLc	1	2004	Deterioro avanzado, derrumbe del filete.
FLd	5	2004	Deterioro avanzado, derrumbe del filete.
FLe	1	2006	Deterioro total (precipitado digerido rosa).
FLf	6	2007	Deterioro avanzado, derrumbe del filete.
FLg	1	2008	Deterioro avanzado, derrumbe del filete.
FLh	4	2008	Deterioro avanzado, derrumbe del filete.
FLi	1	2009	Deterioro avanzado, derrumbe del filete.
FLj	1	2009	Deterioro avanzado, derrumbe del filete.
FLk	2	2012	Producto con aspecto típico.
FLl	2	2013	Producto con aspecto típico.

\*A los diferentes establecimientos elaboradores se les asignaron números para mantener la confidencialidad.



**Figura 4.8:** Filetes sin piel de anchoíta salada-madurada en aceite: a) Recién envasados (aspecto típico), b) Deterioro avanzado con “derrumbe del filete”, c) Deterioro muy avanzado con “derrumbe del filete” y muy digerido.

#### 4.2.2.2 Aislamiento de microorganismos halófilos

En las muestras FLa, FLb, FLc, FLf, FLg, FLh y FLk no se detectaron microorganismos halófilos en BH15 ni BH20 (límite de detección: 10 UFC/g). La mayor parte de estas muestras presentaban un deterioro avanzado, incluso evidenciando el clásico derrumbe del filete (Fig. 4.8 y Tabla 4.5). Las muestras correspondieron a fechas de vencimiento variadas, desde 1995 hasta 2012. El hecho de evidenciarse deterioro de las muestras aunque no se pudieran aislar microorganismos de las mismas podría deberse a bajos recuentos de microorganismos (por debajo del límite de detección de las técnicas empleadas) o a que el deterioro por actividad de enzimas proteolíticas continúa aunque los microorganismos se hayan inactivado o se encuentren en estado viable no cultivable (Ayrapetyan y Oliver, 2016; Lee et al., 2015; Roh et al., 2010; Triqui y Reineccisus, 1995).

En las muestras FLd, FLe, FLj y FLi se halló solo un tipo de cepa representativa (según características macroscópicas de la colonia y microscópicas de las células) en cada una, denominadas cepa F1, F4, F5 y F9, respectivamente. A partir de la muestra FLi, se aislaron dos cepas representativas (cepas F7A y F7B). Estas 5 muestras correspondieron a fechas de vencimiento del 2004 al 2013. F1 y F4 fueron aisladas en BH20, mientras que F5, F9, F7A y F7B se aislaron en BH15. Como se ve en estos resultados, aunque en algunas muestras de anchoíta en aceite se hallaron microorganismos halófilos, la riqueza fue muy baja. Estos aislamientos correspondieron todos a colonias claras, translúcidas o en tonalidades beige o amarillas. No se encontraron colonias rojas, características de los halófilos extremos (Holt, 1989; Gibbons y Seghal, 1960).

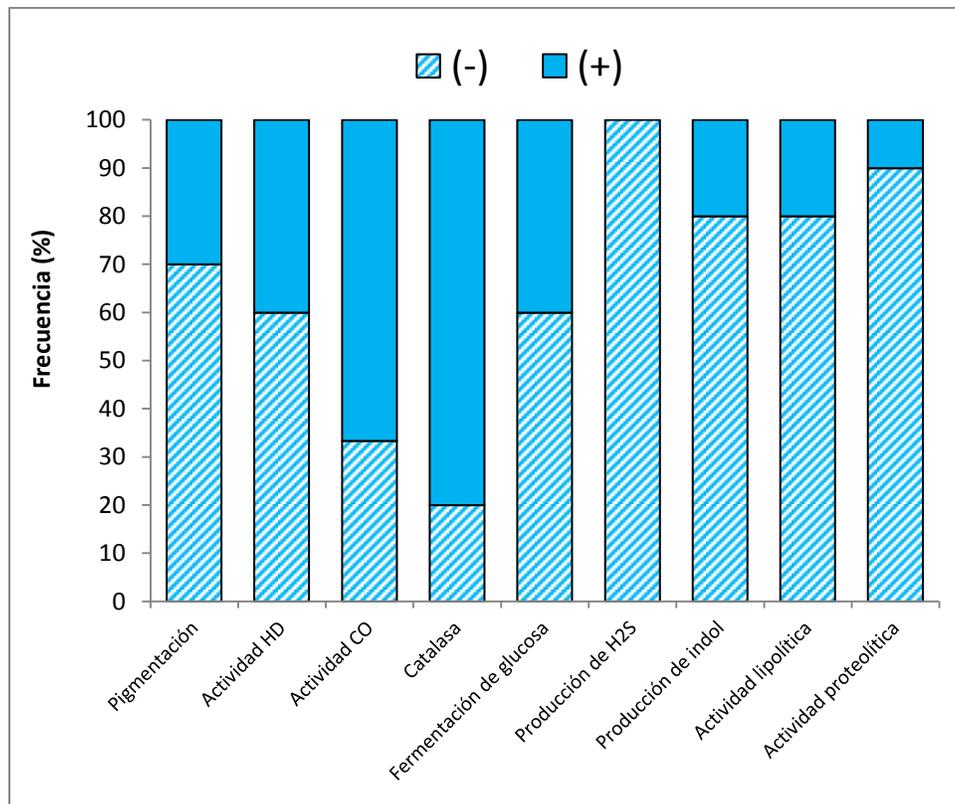
**Tabla 4.6.** Hallazgos de microorganismos halófilos en filetes de anchoíta

Identificación de la muestra	Riqueza de cepas representativas	Código asignado a la cepa	Medio de cultivo
FLd	1	F9	BH15
FLe	1	F5	BH15
FLi	2	F7A y F7B	BH15
FLj	1	F1	BH20
FLl	1	F4	BH20

Al comparar estos resultados con los de la Sección 3.2.1.4, se puede observar que el porcentaje de ocurrencia de microorganismos halófilos en los filetes en aceite ( $\%C_i \sim 42$ ) fue mucho menor que en anchoíta salada-madurada proveniente de barriles de maduración ( $\%C_i = 100$ ). Este hecho podría deberse a una combinación de factores, dado que a principio de la maduración (Sección 4.2.1.1) se encontró que el cambio en la condiciones de esta etapa genera una fase *lag* para la detección de microorganismos halófilos y posteriormente un cambio en la diversidad de cepas que se encuentran. Previo a la maduración se realiza el descabezado y eviscerado parcial, pudiendo contribuir a la disminución de la carga microbiana. Además, en la maduración se efectúan cambios en las condiciones intrínsecas y extrínsecas. En cuanto a las primeras, el agregado de nuevas capas de sal genera un aumento del contenido de NaCl del pescado como disminución de la humedad y  $a_w$ . En cuanto a las segundas, sucede un aumento de la presión por la prensa realizada y hay una reducción de la disponibilidad de oxígeno. Luego de estos cambios, al elaborar los filetes de anchoíta en aceite, se retira la prensa, se separan los filetes y terminan de retirar los restos de vísceras y luego se envasan con cobertura de aceite. Estos cambios que se ocasionan a lo largo del proceso podrían ser los causantes tanto de la disminución de la riqueza de microorganismos halófilos como del menor porcentaje de ocurrencia. La antigüedad de las muestras no pareciera ser una causa directa de la baja ocurrencia.

#### **4.2.2.3 Caracterización fenotípica de las cepas representativas**

Se caracterizaron fenotípicamente las 6 cepas halófilas aisladas de filetes de anchoíta junto a otras 5 cepas halófilas provenientes de la maduración de anchoíta salada (cepas 12, 13, 13xb, 11aii y T4 del cepario del GIPCAL). Los resultados generales obtenidos se muestran en la Fig. 4.9.



**Figura 4.9:** Distribución de frecuencias de los resultados de la caracterización fenotípica, resultados positivos (+) y negativos (-).

Al comparar los resultados obtenidos de este set de datos con el analizado en la Sección 4.2.1, se observa que, en lo que respecta a las variables no asociadas al origen de aislamiento, concuerda que aproximadamente la mitad de las cepas posee actividad histidina-descarboxilasa y que la mayor parte de las cepas es catalasa positiva. Sin embargo, aquí muestran una menor proporción de cepas halófilas rojas y de cepas con actividad proteolítica y lipolítica. Esto podría deberse al envejecimiento de las cepas dado que se analizaron muestras de varios años, por lo que las cepas podrían haber perdido sus propiedades bioquímicas (Del Puerto et al., 2009).

En cuanto a las características explicativas de las propiedades en común de las cepas aisladas durante la maduración, se encontró que las cepas no fermentadoras de glucosa superaron la mitad de los análisis, al igual que las que poseen actividad citocromo-oxidasa, así como un alto porcentaje resultó negativo en la producción de indol y las cepas no resultaron ser formadoras de H<sub>2</sub>S. Teniendo en cuenta que parte de estas cepas fueron

aisladas de filetes de anchoíta en aceite, lo que también pudo haber afectado la diversidad de cepas, se observa que en general la tendencia hallada mediante las técnicas multivariadas aplicadas en la Sección 4.2.1.4 se mantiene.

### 4.3 CONCLUSIONES PARCIALES

El salado-madurado de anchoíta es un proceso complejo y dinámico en el que predominan las bacterias y/o arqueas halófilas. Los recuentos microbianos cambiaron durante el procesamiento, pero los valores finales logrados en las etapas de salado húmedo y maduración resultaron del mismo orden de magnitud, aunque las colonias representativas de cada etapa presentaron características externas diferentes. Este hecho sugiere que estas etapas están dominadas por diferentes poblaciones bacterianas.

A través de Análisis Univariados y Bivariados, fue posible discernir el hecho que las características fenotípicas de las cepas aisladas en las distintas etapas del proceso fueron diferentes. Centrando el análisis en aquellas características con interés tecnológico, se observó que una cantidad importante de cepas resultaron positivas para la producción de indol y sulfuro de hidrógeno y también para actividades lipolíticas y proteolíticas. Se encontró que las cepas con capacidades proteolíticas y lipolíticas se aislaron uniformemente a lo largo del proceso; siendo esto una condición deseable debido a la contribución positiva al desarrollo de textura y aroma final, respectivamente. Las características microbianas negativas, como la producción de sulfuro de hidrógeno o indol, se encontraron principalmente en muestras de sal y durante la etapa de salado húmedo, pero no durante la maduración.

Por otro lado, Análisis de Correspondencias Múltiple (ACM) seguido del Análisis de Cluster mediante Agrupamiento Jerárquico de Componentes Principales (AJCP), resultó ser una técnica apropiada para explorar las relaciones entre respuestas de variables categóricas y reveló una imagen más global de las relaciones entre las cepas aisladas de las diferentes etapas del proceso y las respuestas bioquímicas que de otro modo no se detectarían mediante un análisis por pares. Los resultados obtenidos dan una idea sobre las características y efecto de la microbiota durante la elaboración de anchoíta salada-madurada. Cabe destacar que, según las búsquedas bibliográficas realizadas, el ACM se utiliza aquí por primera vez para investigar las comunidades microbianas de un producto alimenticio y sus modificaciones a lo largo del proceso de fabricación.

Además, el análisis multivariado efectuado sobre las pruebas bioquímicas se corresponde con la observación respecto a que colonias representativas de cada etapa presentaron características externas diferentes, dado que el agrupamiento discriminó las cepas aisladas durante el salado húmedo y la maduración. A partir de este análisis, las cepas aisladas se clasificaron en dos grupos. Así, las cepas procedentes del salado húmedo se asociaron con actividades no deseables para el proceso (producción de sulfuro de hidrógeno e indol) que podrían conducir al desarrollo de sabores extraños. Por otro lado, las cepas aisladas principalmente de muestras de sal y durante la maduración se incluyen en un grupo diferente, caracterizado por algunas capacidades bacterianas deseables (actividad de citocromo-oxidasa y no producción de sulfuro de hidrógeno e indol). Los resultados obtenidos en esta investigación indican que durante el proceso de maduración de anchoíta salada, el ecosistema bacteriano se modifica y se lleva a cabo una selección natural de bacterias con capacidades que contribuirían al desarrollo de los atributos sensoriales deseados.

En cuanto a la evaluación de la microbiota halófila de filetes de anchoíta en aceite, se detectaron microorganismos halófilos en ~42% de las muestras, siendo este porcentaje bajo al comparar con el hallado en la totalidad de las muestras de anchoíta salada-madurada proveniente de barriles de maduración. Las características fenotípicas de las cepas aisladas de filetes de anchoíta en aceite junto a las de cepas de la etapa de maduración (provenientes del cepario del GIPCAL, diferentes a las del análisis del proceso) concordaron con los resultados obtenidos mediante el agrupamiento del Análisis Multivariado. Este set de cepas coincidió con las propiedades en común de las cepas representativas de la etapa de maduración, es decir, resultaron en general poseer actividad citocromo-oxidasa positiva y no ser fermentadoras de glucosa, ni productoras de indol o sulfuro de hidrógeno.

La etapa de salado húmedo es considerada crítica desde el punto de vista de que es necesaria una rápida inactivación de la biota autóctona del pescado a fin de evitar el deterioro y la pérdida de inocuidad. Sin embargo, estos estudios revelaron que en dicha etapa se concentra la mayor riqueza en cuanto a cepas halófilas con características

indeseables, por lo que es importante buscar alternativas tecnológicas para esta etapa. En el Capítulo 3 se encontró también que durante el salado húmedo permanecen recuentos importantes de aerobios psicrótrofos, y aunque no sea la biota dominante, esto indicaría que disminuir la temperatura en esta etapa tampoco sería una solución. Por el momento, se recomienda acortar los tiempos de salado húmedo una vez reducida la actividad de agua a valores inferiores de 0,86.

El hecho de haber caracterizado fenotípicamente la microbiota durante el proceso, podría ser de utilidad para investigaciones futuras donde se buscará efectuar cambios en el proceso mediante inoculación de microorganismos *starters*. En este sentido, conocer las características que agrupan a los microorganismos halófilos podría permitir tomar decisiones sobre las características mantener o cambiar, según el fin buscado.

## **CAPÍTULO 5: Influencia de bacterias y arqueas halófilas en la formación y degradación de histamina**

---

## 5.1. Introducción

El deterioro microbiano de los alimentos es de gran interés para productores, elaboradores, vendedores y consumidores. El crecimiento de microorganismos deteriorantes o patógenos es indeseado desde el punto de vista de la inocuidad del producto, como así también desde un enfoque comercial y económico (Giannuzzi et al., 1997; Yeannes, 2005).

En este capítulo se presenta la investigación realizada con respecto a la influencia de microorganismos procariotas unicelulares halófilos (bacterias o arqueas) en la presencia de histamina en anchoíta salada-madurada, lo que se relaciona de forma directa con la inocuidad del producto. Se analiza su formación y/o degradación de histamina, sin dejar de lado las características fenotípicas de interés desde un punto de vista tecnológico por su posible contribución en el proceso y/o producto. Se analiza la presencia de cepas formadoras de histamina y la posible respuesta de motilidad quimiotáctica hacia su precursor (histidina), como así también hacia la amina biógena en cuestión (histamina).

La importancia de evaluar esta característica se debe a que la quimiotaxis se ha reportado como una ventaja competitiva de las bacterias y arqueas, dado que los microorganismos quimiotácticos poseen sistemas de percepción que les permiten detectar gradientes de concentración de sustancias químicas y dirigir su movimiento hacia zonas más favorables. La quimiotaxis se denomina positiva si el movimiento es en dirección hacia la mayor concentración de la sustancia química en cuestión y negativa si es en dirección opuesta (Di Salvo, 2013; Herrera Seitz y Sttudert, 2008).

Por otro lado, se presentan los resultados de los análisis de degradación de histamina por cepas puras y por un consorcio microbiano, así como también el modelado de las curvas de crecimiento de estos ensayos. Investigar la participación de un consorcio resulta de particular interés, ya que las propiedades intrínsecas de cada microorganismo son necesarias para generar una aceleración del proceso de maduración (Musmeci, 2001), y hasta el momento no se observan reportes previos de estudios que involucren la

degradación de histamina con consorcios microbianos. Asimismo, se exhibe la identificación molecular de cepas aisladas del proceso de salado-madurado haciendo foco en las degradadoras de histamina, como así también se analiza la posible influencia sensorial de las degradadoras para ver su utilidad como cultivos iniciadores en el proceso de salado-madurado.

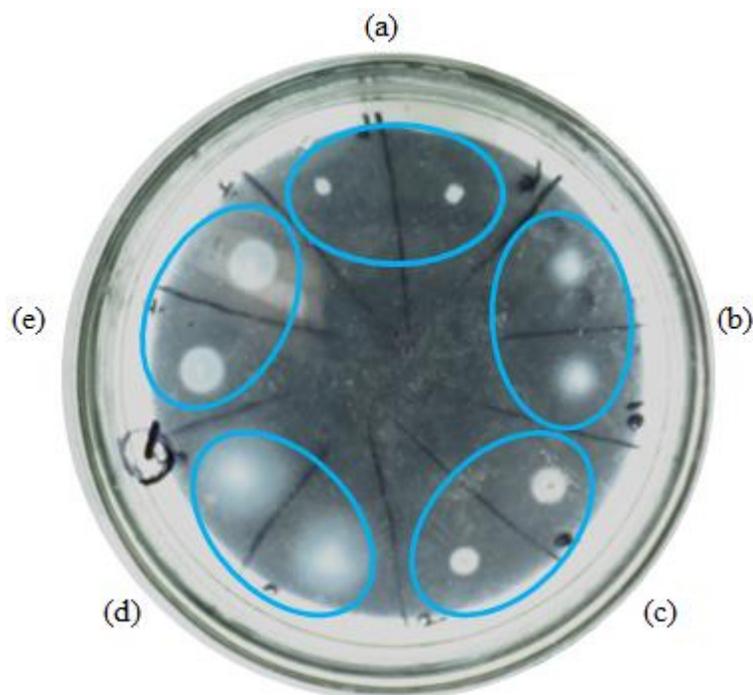
## 5.2. Resultados y discusión

### 5.2.1. Ensayos de cepas puras

#### 5.2.1.1. Estudios de quimiotaxis

Se analizaron 57 cepas halófilas moderadas y extremas aisladas del salado-madurado de anchoíta con el objetivo de establecer si tienen capacidad quimiotáctica hacia histidina y/o histamina. Estas cepas corresponden a los aislamientos de sal (17 cepas, nombradas como combinación de letra S seguida de un número), durante el salado húmedo (30 cepas, nombradas como combinación de letra A seguida de un número), de anchoíta salada-madurada (cepario GIPCAL, 5 cepas, nombradas como 12, 13, 13xb, 11aii y T4) y filetes de anchoíta en aceite (5 cepas, nombradas como combinación de letra F seguida de un número). Este estudio se realizó en placas de *swimming* (Englert et al., 2009; Wolfe y Berg, 1989) que es un ensayo dependiente del gradiente de concentración generado por el metabolismo microbiano dado que requiere que alguna sustancia del medio de cultivo actúe como atrayente y sea utilizada como sustrato. Así, a medida que el sustrato es consumido, las células nadan sincronizadamente en busca de zonas con mayor concentración de sustrato formando un anillo detectable a simple vista y que, con el tiempo, se extiende hasta los bordes de la placa. En medios complejos se observan varios anillos originados por el consumo secuencial de los diferentes atrayentes presentes (Englert et al., 2009; Herrera Seitz y Studdert, 2008; Wolfe y Berg, 1989). En primera instancia se analizaron todas las cepas en busca de las que presentaran una respuesta quimiotáctica en agar blando hacia tripteína y extracto de levadura. Se observaron diferentes respuestas (duplicados en Fig. 5.1), no quimiotácticas (a) donde solo se observó un crecimiento visible a simple vista en el punto de siembra y quimiotácticas (b-e) donde se registró la formación de un anillo concéntrico alrededor del punto de sembrado dado que el desplazamiento neto hacia los bordes de la placa en el tiempo es congruente con la característica respuesta quimiotáctica (Murialdo et al., 2009). En cuanto al tamaño de los anillos, (b) y (c) presentaron los menores, seguidos por (e), mientras que los mayores corresponden a (d). También es posible comparar cualitativamente la densidad de los mismos, observando que (c) y (e)

presentaron anillos de borde definido de mayor densidad, mientras que (b) y (d) presentaron anillos circulares que se fueron difundiéndose gradualmente hasta desaparecer.

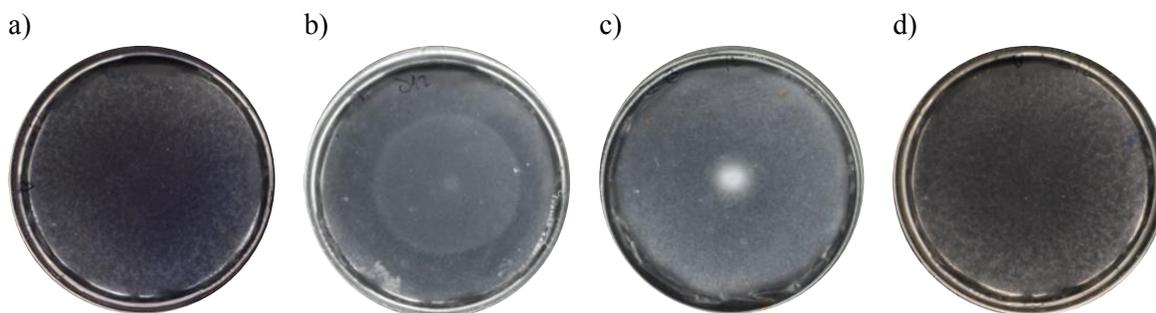


**Figura 5.1:** Diferentes respuestas de cepas en placa de *swimming*: (a) no quimiotáctica, (b), (c), (d) y (e), quimiotácticas.

Aquellos ensayos que tuvieron un comportamiento quimiotáctico positivo, se analizaron a fin de determinar sus respuestas en agar blando con histamina o histidina (rango de concentración 0,01-0,1 % p/v) como única fuente de carbono, y se utilizó un control negativo sin fuente de carbono y un control positivo con extracto de levadura (0,025 % p/v) y tripteína (0,025 % p/v). Los resultados obtenidos para una concentración de 0,05 % p/v del atrayente se muestran en la tabla 5.1, donde también se presentan los resultados de actividad histidina-descarboxilasa siguiendo la metodología reportada por otros autores (Niven et al., 1981; Ramírez et al., 1994).

En la figura 5.2 se muestran las diferentes respuestas observadas, ejemplificadas con los resultados de la cepa S12, que no evidenciaron crecimiento en forma de anillo concéntrico desde el punto de sembrado en el control negativo ni frente a histamina (Fig. 5.2a y 5.2d, respectivamente), mientras que se desarrolló un anillo concéntrico en el control

positivo de poca intensidad (muy visible sin aumento) y de gran tamaño (~ 60 mm de diámetro) (Fig. 5.2b). En cambio en presencia de histidina formó un anillo mediano de mucha intensidad (~23 mm de diámetro) (Fig. 5.2c). Estas observaciones se realizaron a simple vista sin la utilización de aumento.



**Figura 5.2:** Placas de *swimming* inoculadas con la cepa S12 al cabo de 21 días a 35°C: a) control negativo, b) control positivo, c) histidina, d) histamina

**Tabla 5.1:** Resultados de los estudios de quimiotaxis hacia histidina e histamina por microorganismos halófilos

Código	Actividad HD	Crecimiento en forma de anillo concéntrico			
		Control negativo	Control positivo	Medio con histidina	Medio con histamina
S5	+	-	++	-	-
S9	+	-	+++	++	-
S10	+	-	+++	++	-
S11	-	-	+++	++	-
S12	+	-	+++	++	-
S24	-	-	+++	-	++
A8	+	-	+++	-	++
A18	-	+	++	-	++
A22	-	+	+	-	+
A24	+	-	+++	+++	-
A25	+	+	++	++	-
A28	-	-	+++	-	-

HD: histidina-descarboxilasa.

Resultados negativos (-): no se evidenció crecimiento en forma de anillo. Resultados positivos (+): los signos indican el diámetro del anillo: + (<4 mm), ++ (4-20 mm) y +++ (>20 mm).

Como se puede observar en la tabla 5.1, de las 57 cepas halófilas analizadas, 3 de ellas mostraron formación de un anillo concéntrico (debido al crecimiento y desplazamiento poblacional) alrededor del punto de sembrado, congruente con la característica respuesta quimiotáctica en el control negativo, lo que indicaría que algún componente del agar blando del control negativo (agar-agar y sales minerales) produjo un comportamiento quimiotáctico leve. Se analizó la diferencia de crecimiento entre el control negativo y las placas con los otros componentes en estudio para determinar si dichos compuestos fueron atractivos, considerando tanto la diferencia de tamaño como la intensidad del anillo. Todas las cepas presentadas en la tabla presentaron comportamiento quimiotáctico en el agar blando con tripteína y extracto de levadura utilizado como control positivo. Asimismo, 12 de ellas mostraron formación de un anillo concéntrico (debido al crecimiento y desplazamiento poblacional) alrededor del punto de sembrado, congruente con la característica respuesta quimiotáctica. La cepa A22 presentó anillos similares en medio sin fuente de carbono (control negativo), como aquel en presencia del control positivo y del sustrato histamina. Por lo tanto, para determinar si existe o no una respuesta quimiotáctica hacia histamina se podrían emplear otras técnicas de estudio, como la desarrollada por Murialdo et al. (2009) para analizar la quimiotaxis mediante el uso de láser Specke dinámico y Nisenbaum et al. (2013a y 2013b) para detectar respuestas quimiotácticas ante bajas concentraciones microbianas, o mediante el procesamiento de videos (capturados con aumento) en la técnica del tapón de agarosa (Nisenbaum et al., 2016). La cepa A25 presentó una respuesta quimiotáctica positiva tanto en el control negativo como en el medio con histidina, pero en este último caso el tamaño del anillo fue mayor. Esta diferencia en las respuestas indicaría que la cepa dirige su movimiento a favor del gradiente del sustrato histidina, generado por el consumo microbiano. De modo similar se comportó la cepa A18, evidenciando un anillo de mayor tamaño en el medio con histamina comparado con el control negativo, por lo que se podría considerar quimiotáctica hacia histamina. Las cepas S9, S10, S11, S12 y A24 mostraron un anillo concéntrico alrededor del punto de siembra en el medio de cultivo con histidina y serían consideradas quimiotácticas hacia este sustrato. Las cepas S24 y A8 presentaron un anillo concéntrico en el medio semisólido con histamina y serían consideradas quimiotácticas hacia esta amina.

Las cepas S5 y A28 mostraron comportamiento quimiotáctico en el control positivo, pero no frente a histidina o histamina.

Por lo tanto, el porcentaje de ocurrencia ( $\%C_i$ , Sección 2.5.4) de cepas quimiotácticas hacia histidina fue del 10,5% (6 cepas: S9, S10, S11, S12, A24 y A25) y hacia histamina el 5,3% (3 cepas: S24, A8 y A18). Cabe destacar que el ~83% de las cepas que resultaron quimiotácticas hacia histidina, también resultaron positivas en el estudio de la actividad histidina-descarboxilasa propuesto por Niven et al. (1981) (modificado para microorganismos halófilos por Ramírez et al. (1994)). Solo una cepa (S11) quimiotáctica hacia histidina no evidenció actividad histidina-descarboxilasa. Esto podría estar relacionado con las diferentes composiciones de los medios de cultivo, considerando que la actividad enzimática se ve fuertemente ligada a condiciones extrínsecas e intrínsecas, entre ellas, el pH investigaciones (Alin, 1950; Lee et al., 2015; Tapingkae et al., 2010).

Evaluar la respuesta quimiotáctica de los microorganismos es de sumo interés ya que esta propiedad ayuda a los microorganismos a encontrar óptimas condiciones para su crecimiento y supervivencia (Paul et al., 2006) y es posible que la quimiotaxis sea una ventaja selectiva de las bacterias en condiciones de fuente de energía y carbono limitadas (Cunliffe y Kertesz, 2006; Marx y Aitken, 2000; Pandley y Jain, 2002). La prueba de quimiotaxis en placa de *swimming* es útil para una clasificación preliminar de cepas presuntamente quimiotácticas hacia un determinado sustrato. Por lo tanto, sería de interés continuar los estudios con otras técnicas, como la de Nisembaum et al. (2013) que permitan confirmar o esclarecer las posibles respuestas quimiotácticas y sus rutas metabólicas, tanto de atrayentes como de repelentes para favorecer la reducción o desaparición de histamina en el medio.

### 5.2.1.2. Formación de histamina por microorganismos halófilos

La capacidad presuntiva de formar histamina por cepas halófilas se evaluó mediante el test de actividad histidina-d Descarboxilasa (Niven et al., 1981; Ramírez et al., 1994) con el objetivo de buscar tendencias en las diferentes etapas del proceso de salado-madurado, si bien este tipo de ensayo puede presentar falsos positivos (Hernández-Herrero et al., 1999c). Los resultados se agruparon según el origen del aislamiento y se muestran en la tabla 5.2.

**Tabla 5.2:** Capacidad productora de histamina según el origen del aislamiento.

Origen	Cantidad de cepas analizadas	Actividad histidina-d Descarboxilasa*
Sal	17	23,5%
Anchoíta durante el salado húmedo	30	60,0%
Anchoíta durante la maduración (primera parte)	9	55,5%
Anchoíta salada-madurada (tanques y filetes en aceite)	10	40,0%
Total	66	47,0%

\*Porcentaje de cepas positivas en función del número de cepas de cada origen.

Según los hallazgos de cepas presuntamente formadoras de histamina (tabla 5.2), con un nivel de significación del 10% se encontró que el origen de los aislamientos y la actividad histidina-d Descarboxilasa estuvo relacionada ( $p=0,055$ ). La mayor influencia en la formación de histamina estaría dada en la etapa de salado húmedo. Cuando se analizan los porcentajes de cepas positivas en función de las cepas analizadas en cada origen, se observa que la menor representación de cepas halófilas positivas se da en la sal. En cuanto a estos valores en los diferentes estadios del proceso, hay una tendencia decreciente a medida que el proceso avanza.

### 5.2.1.3. Degradación de histamina por microorganismos halófilos

Se analizaron 57 cepas halófilas moderadas y extremas representativas de la microbiota del salado-madurado de anchoíta (detalle en Sección 5.2.1.1) a fin de determinar si entre ellas se encontraban cepas con capacidad de degradar histamina. Para esta evaluación se utilizó caldo halofílico que es un medio de cultivo rico en aminoácidos, vitaminas y minerales, siendo tal como el pescado, un hábitat adecuado para el crecimiento de microorganismos. Este medio posee otros nutrientes específicos necesarios para el desarrollo de microorganismos halófilos (IRAM, 1988; Guillen Velasco, 1997). Se fijó el contenido de NaCl en 17,5% p/V ya que está en el orden del contenido de esa sal en anchoíta salada-madurada (Czerner y Yeannes, 2014). Asimismo, se suplementó el caldo de cultivo con histamina en una concentración final de 800 ppm con el objetivo de evaluar la capacidad de las cepas para desarrollarse y degradar altos contenidos de histamina.

Como se observa en la Tabla 5.3, la degradación de las cepas S18, S20, A18, A28 y T4 fue significativa ( $p < 0.1$ ) en comparación con el control sin inoculación microbiana, presentando una degradación entre 4,2 y 9,7% partiendo de una elevada concentración inicial de histamina en presencia de otros sustratos. Pese a estas diferencias en los niveles de degradación de histamina, todas las cepas degradaron niveles del mismo orden de magnitud. Otros autores también hallaron microorganismos halófilos con esta capacidad, como la arquea *Natrinema gari* que degradó histamina en condiciones hipersalinas y cuyo estudio determinó que la misma está mediada por la enzima histamina deshidrogenasa termo-neutrofilica tolerante a la sal (Tapingkae et al., 2010), o el *Bacillus polymyxa* que degradó histamina (50 ppm) *in vitro* en presencia de hasta 10% p/V NaCl y redujo el 30% del contenido de histamina siendo inoculada como cultivo iniciador en la fermentación de pescado (Lee et al., 2015 y 2016).

**Tabla 5.3:** Degradación de histamina por microorganismos halófilos

Ensayo	Origen	Contenido de histamina final [ppm]	Capacidad degradadora de histamina [%]
Control		396,5±3,5	A
S18	Sal	372,0±0,0	BC
S20	Sal	358,0±3,0	C
A18	Anchoíta del salado húmedo	364,5±3,5	C
A28	Anchoíta del salado húmedo	366,5±4,5	BC
T4	Anchoíta salada-madurada	380,0±1,0	B

\*Promedio ± error standard. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.1$ ) en el nivel de histamina debido a la cepa microbiana. Los contenidos de histamina cuantificados corresponden al sobrenadante diluido con HCl 1M (relación sobrenadante y ácido 1:1).

Las cepas con actividad degradadora fueron aisladas de diferentes etapas del proceso de salado-madurado. Dentro de las mismas se presentaron tanto colonias halofílicas rojas (S18, S20 y A18) como colonias en tonalidades crema-beige (A28 y T4). Las cepas halófilas rojas han sido relacionadas con la aparición de *off-flavors* y *off-odors*, por lo que han sido consideradas perjudiciales para la calidad sensorial del producto (Gram y Huss, 1996; Huss y Valdimarson, 1990). Sin embargo, en estudios recientes han reportado beneficios de la aplicación de cepas halófilas rojas como cultivos iniciadores en el proceso de salado-madurado de *E. encrasicolus* (Alfonzo et al., 2017; Aponte et al.2010). En estos trabajos han evaluado la contribución a mejoras en la calidad sensorial y/o en los tiempos de maduración, así como también se mantengan niveles bajos de histamina, sin embargo no han estudiado la degradación de la amina biógena en cuestión. Por ello, cobra importancia la investigación de las cepas degradadoras de histamina en cuanto a las características fenotípicas relacionadas con el deterioro.

#### 5.2.1.4. Características fenotípicas de interés tecnológico

Las cepas con potencial actividad degradadora de histamina, detalladas en la Sección 5.2.1.3, fueron analizadas en cuanto a las características fenotípicas consideradas

de interés tecnológico tanto por su potencial influencia en la calidad sensorial de la anchoíta salada-madurada (catalasa, actividad citocromo-oxidasa, lipólisis, proteólisis, indol, producción de H<sub>2</sub>S, fermentación de azúcares) como por su efecto sobre la inocuidad del producto por la posible formación de histamina (actividad histidina-descarboxilasa). Asimismo, la capacidad del cultivo iniciador para competir con la microbiota natural de la materia prima y para llevar a cabo las actividades metabólicas esperadas está condicionada por su tasa de crecimiento y supervivencia en las condiciones que prevalece en el producto (Ammor y Mayo, 2007). A tal fin, el rango de requerimiento/tolerancia de sal debería comprender los 14-20% p/p de NaCl que tradicionalmente tiene el producto. Por otro lado, a partir del análisis multivariado sobre las pruebas fenotípicas que describen a la microbiota halófila presente en la etapa de maduración (Sección 4.2.1.4), se encontró que en general los microorganismos en esta etapa tienen en común el hecho de no ser fermentadores de azúcares, no producir H<sub>2</sub>S, no ser móviles y tener actividad citocromo-oxidasa positiva (Tabla 4.4), lo que también podría contribuir a la selección de un potencial cultivo *starter*. Desde el punto de vista de la inocuidad, cabe destacar que Alin (1950) reportó que algunas cepas de *E. coli* eran capaces tanto de formar como de degradar histamina a diferentes pH. Por ello, el hecho de encontrar potencial actividad degradadora de histamina no indicaría que en otras condiciones no puedan tener actividad histidina-descarboxilasa. La actividad de esta enzima se ve favorecida a pH 5, por lo que el test mencionado que se efectúa a ~ pH 5.3 es de suma importancia en este aspecto. Los resultados de los test fenotípicos mencionados se muestran en la tabla 5.4.

**Tabla 5.4.** Caracterización fenotípica de los microorganismos degradadores de histamina. Aspectos de importancia tecnológica para el proceso de salado-madurado de anchoíta

	Cepa				
	S18	S20	A18	A28	T4
Citocromo-oxidasa	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+
Actividad proteolítica	-	-	-	-	-
Actividad lipolítica	-	-	-	-	-
Producción de indol	+	-	+	-	-
Producción de H <sub>2</sub> S	-	-	+	-	-
Actividad histidina-descarboxilasa	-	-	-	-	+
	Glucosa	-	-	-	+
Fermentación de hidratos de carbono	Lactosa	-	-	-	+
	Sacarosa	-	-	+	+
Movilidad	-	-	+	-	+
Crecimiento con NaCl (% p/p)	>17	>10	1-20	>15	1-20

Referencias: (-) resultados negativos y (+) positivos.

Todas las cepas que resultaron degradadoras de histamina fueron positivas en la prueba de catalasa y citocromo-oxidasa; esto sería beneficioso dado que estas características dan estabilidad al color y disminuyen el desarrollo de la rancidez en productos cárnicos fermentados (Geisen et al., 1992). Asimismo, ha sido reportado el potencial probiótico de la catalasa por sus propiedades antioxidantes (Wang et al., 2017). Por otro lado, ninguna tiene capacidad proteolítica ni lipolítica, estas características son necesarias, pero en exceso son indeseables (Gram y Huss, 1996). Por ello, el hecho que las cepas degradadoras no posean estas capacidades podría ser ventajoso, considerando que la participación de un consorcio microbiano con diferentes características entre los microorganismos sería necesaria (Musmeci, 2001).

Por otro lado, las cepas S18 y A18 presentaron capacidad de producir indol y/o H<sub>2</sub>S, ambas indeseables por su relación con la aparición de *off-odors* (Huss y Valdimarson, 1990), por lo tanto no serían recomendables como potenciales cultivos *starter*. Además, a partir de los resultados de requerimiento/tolerancia de sal, la cepa S18 fue la cepa que mayor contenido de NaCl requirió para su desarrollo. Su potencialidad se vería ligada a las características del producto dado que los niveles de sal en el producto varían según los productores y requisitos de los compradores (Barañano, 2013). El resto de los microorganismos degradadores, se muestran adecuados en este aspecto.

Por otro lado, las cepas A18 y T4 resultaron móviles y fermentadoras de uno o más azúcares (Tabla 5.4). El hecho que las cepas sean fermentadoras de azúcares no tiene una implicancia probada en cuanto al proceso de maduración de anchoíta salada. Sin embargo, la producción de gas a partir de carbohidratos no es adecuada en la elaboración de otros productos cárnicos, como embutidos fermentados, ya que la formación de grandes cantidades de dióxido de carbono es causal de defectos en los productos debido a la aparición de poros de diferentes tamaños (Ammor y Mayo, 2007). Si bien esta característica es importante en otros productos cárnicos, en anchoíta salada-madurada su importancia es relativamente menor considerando el bajo contenido de carbohidratos del pescado. Asimismo, en el análisis multivariado (Sección 4.2.1.4) se observó que las cepas presentes en la etapa de maduración no son mayoritariamente fermentadoras de azúcares. Por ello, en la selección de cepas para *starters* podría ser conveniente considerar aquellas no fermentadoras de azúcares. Dado que esto tampoco es propio de la anchoíta salada-madurada, podría considerarse que esta característica es indeseable para el producto en cuestión. Por otro lado, las cepas de la etapa de maduración se caracterizaron por ser inmóviles (Tabla 4.4). La movilidad en si no ha sido estudiada como una ventaja, sin embargo, la quimiotaxis hacia histamina si podría serlo a fin de lograr la degradación de este sustrato en caso que estuviera presente. Por ello, desde este punto de vista, la cepa A18 podría haber sido de particular interés pero resultó productora de indol y H<sub>2</sub>S (Tabla 5.3), ambos compuestos indeseables por su relación con la presencia de *off-odors* (Huss y Valdimarson, 1990). Por otro lado, la cepa T4 resultó positiva en el test de actividad histidina-descarboxilasa. Asimismo, dentro de las degradadoras, T4 fue la que menor

porcentaje degradó, y junto a la A18 resultaron fermentadoras de azúcares, entonces no serían de interés como cultivo iniciador.

En base a la caracterización efectuada hasta el momento, las cepas A28 y S20 presentaron características fenotípicas apropiadas desde el punto de vista tecnológico y evidenciaron niveles de degradación similares entre ellas. Los resultados sugieren que A28 y S20 podrían ser utilizados como potenciales cultivos *starter* a fin de contribuir a mantener niveles más bajos de histamina en productos salados-madurados sin la producción de *off-favors* ni *off-odors*.

#### **5.2.1.5. Identificaciones moleculares**

Se utilizaron diferentes métodos moleculares para identificación microbiana a fin de identificar las cepas aisladas (protocolos descritos en la Sección 2.3.2), con especial interés en las cepas que presentaron actividad degradadora de histamina. Los resultados se presentan en la Tabla 5.5.

**Tabla 5.5:** Identificación molecular de los microorganismos

Cepa	Método molecular utilizado	Clasificación taxonómica	Porcentaje de similitud* [%]
S1	Genotipado (Protocolo 1)	<i>Halobacterium salinarum</i>	99.80
S12	Genotipado (Protocolo 1)	<i>Salicola maranensis</i>	99.43
S18	Genotipado (Protocolo 2)	<i>Halobacterium salinarum</i>	98.75
S20	Genotipado (Protocolo 2)	<i>Halobacterium salinarum</i>	98.15
A18	Genotipado (Protocolo 2)	<i>Halomonas utahensis</i>	99.18
A28	Genotipado (Protocolo 2)	<i>Halovibrio denitrificans</i>	98.26
T4	Genotipado (Protocolo 1)	<i>Chromohalobacter canadensis</i>	97.04
12	Proteotipado (Protocolo 3)	<i>Salinibacter ruber</i>	-
13	Genotipado (Protocolo 1)	<i>Chromohalobacter marismortui</i>	97.45
11aii	Genotipado (Protocolos 1 y 3)	<i>Lentibacillus/Virgibacillus</i>	93.86

\*Porcentaje de similitud entre fragmento del 16S rDNA amplificado y las especies de referencia en EzBioCloud (base de datos de NCBI controladas por calidad) (Yoon et al., 2017).

Las cepas identificadas por genotipado fueron las S1, S18 y S20. Estas son arqueas que pertenecen al género *Halobacterium*. También se identificaron las cepas S12, A18, y A28, que son bacterias con un alto porcentaje de similitud con *Salicola* spp., *Halomonas* spp. y *Halovibrio* spp., respectivamente, y T4 y 13 con *Chromohalobacter* spp., respectivamente. Cabe destacar que la cepa 11aii, próxima a *Lentibacillus* y *Virgibacillus*, podría ser una nueva especie dado su bajo porcentaje de similitud con especies conocidas (Tabla 5.5), y ha sido depositada en la colección de cultivos de la CCUG (Culture Collection - University of Göteborg, Suecia) con el código CCUG 69760. Otras cepas, como la S18 y S20, también posiblemente correspondan a nuevas especies. Se continúa trabajando en la clasificación de estas cepas con la Dra. Margarita Gomila (Universitat de les Illes Balears, España).

Por otro lado, se efectuó el depósito de la cepa 12 en la colección de cultivos de la CCUG con el código CCUG 69762, la cual no amplificó con los primers 27F y 1492R, por lo que se recurrió al proteotipado y se encontró que se acerca a *Salinibacter ruber*. Esta especie se encuentra dentro de los organismos más halófilos del dominio Bacteria (Antón et al., 2002). Aunque pertenece a las Bacterias, *Salinibacter* comparte muchas características con las arqueas de la familia *Halobacteriaceae* que viven en el mismo hábitat. Ambos grupos usan KCl para el ajuste osmótico de su citoplasma, poseen principalmente enzimas que requieren sal y contienen diferentes pigmentos carotenoides (Oren, 2013).

Las géneros de las cepas identificadas han sido relacionados con alimentos de origen marino salados y fermentados (Alfonzo et al., 2017; Anisha et al., 2012; Jiang et al., 2014; Jung et al., 2016). Las cepas S18 (*Halobacterium* spp.), S20 (*Halobacterium* spp.), A18 (*Halomonas* spp.) y A28 (*Halovibrio* spp.) y T4 (*Chromohalobacter* spp.) corresponden a las que resultaron degradadoras de histamina. Según las búsquedas bibliográficas realizadas, los géneros *Halobacterium*, *Halovibrio* y T4 *Chromohalobacter* no han sido aún asociados a la degradación de histamina. La especie *Halomonas shantousis* ha sido relacionada con la degradación de aminas biógenas (Jiang et al., 2014). Por otro lado, cepas del género *Halobacterium* han sido sugeridas como potenciales cultivos *starters* a fin de mantener bajos niveles de histamina durante la maduración de *E. encrasicolus* (Alfonzo et al., 2017), pero su potencialidad como degradadoras de histamina no fue estudiada.

Por otro lado, la cepa S12 resultó proteolítica y lipolítica en los ensayos medios de cultivo agar leche y agar con tributirina, respectivamente, lo que concuerda con Moreno et al. (2009) quienes reportaron que especies del género *Salicola* son bacterias halófilas extremas productoras de proteasas y lipasas.

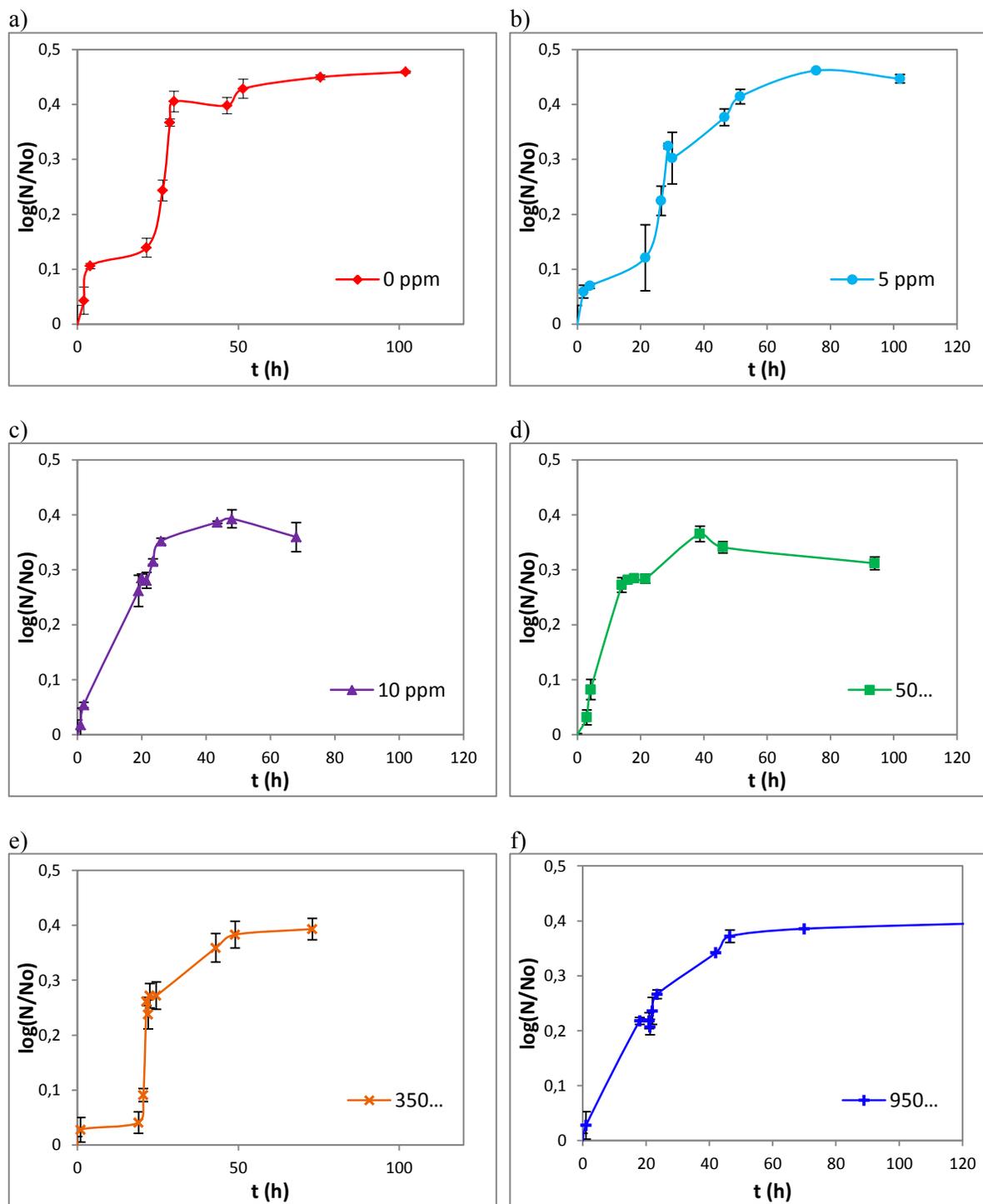
En cuanto a los diferentes protocolos utilizados, por desconocer *a priori* si los microorganismos aislados pertenecían al dominio *Bacteria* o *Archaea*, en algunos casos se realizaron las técnicas de identificación tanto con cebadores para bacterias como con cebadores para arqueas. Por otro lado, el protocolo 1 resultó adecuado para la extracción de

ADN (técnica de Colony PCR, Sheu et al. (2000)) pero la cantidad de ADN obtenida para la secuenciación fue, en muchos casos, insuficiente. Con este protocolo, se identificaron 5 de las 12 cepas analizadas. Respecto al protocolo 2, se decidió analizar las cepas S18, S20, A18 y A28 primero mediante la utilización de cebadores para bacterias, pudiendo identificar las cepas A18 y A28. Luego, dado que las S18 y S20 no amplificaron en la PCR, se realizó nuevamente la PCR con cebadores para arqueas. Las determinaciones genotípicas del protocolo 3 se realizaron únicamente con cebadores para bacterias. En este caso, se realizó el depósito de la cepa 11aii (anteriormente analizada siguiendo el protocolo 1) en la CCUG, como parte de los estudios para confirmar que corresponde a una nueva especie. Además, se depositó la cepa 12 y se completó su estudio por proteotipado dado que no se pudo identificar por genotipado.

## **5.2.2. Degradación de histamina por un cultivo mixto**

### **5.2.2.1. Etapa de aclimatación**

Se estudió la posible degradación de histamina por un cultivo mixto formado a partir de la inoculación de 57 cepas halófilas moderadas y extremas aisladas del proceso de salado-madurado de anchoíta (detalladas en la Sección 5.2.1.1). El fin de crear este cultivo mixto a partir de cepas cultivables es imitar un consorcio microbiano representativo de las condiciones naturales, que a su vez pueda servir para la selección de un *starter* o un mix de cepas *starters*. De este modo, se fomentó que las cepas cultivables compitieran y ocurriera una selección natural de aquellas capaces de tolerar o degradar histamina. A fin de aclimatar al cultivo mixto a la presencia de histamina, se utilizó como base un medio de cultivo nutritivo para microorganismos halófilos, utilizando sucesivamente concentraciones crecientes de histamina (ensayo “a” se usó de inóculo del “b”, luego el “b” del “c”, etc.). Durante cada ciclo de crecimiento, se efectuaron las curvas de crecimiento y se midió la concentración de histamina inicial y final (Sección 2.4.3). Las curvas de crecimiento y las mediciones de histamina se pueden observar en la Figura 5.3 y Tabla 5.6, respectivamente.



**Figura 5.3.** Curvas de crecimiento del cultivo mixto (N: UFC/mL a tiempo  $t$ ;  $N_0$ : UFC/mL inicial) con diferentes concentraciones de histamina inicial: a) 0 ppm, b) 5 ppm, c) 10 ppm, d) 103,5 ppm, e) 380,5 ppm, f) 889 ppm.

A partir de las mediciones de histamina se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de histamina remanente (comparación de concentración de histamina final con

inicial) de los diferentes ensayos (ANOVA de un factor,  $p=0,005$ ). Como se puede observar en la tabla 5.6, el consorcio microbiano fue capaz de degradar histamina en el ensayo f) al cabo de 14 días, presentando diferencias significativas ( $p<0.05$ ) con un control sin inóculo microbiano. En este ensayo se logró degradar ~20% de la histamina presente a tiempo cero.

**Tabla 5.6:** Capacidad de degradar histamina por microorganismos halófilos

Ensayo	tiempo (días)	Contenido de histamina [ppm]		Porcentaje de histamina remanente [%]	
		Inicial	Final		
Control	14	87,50 (0,71)	87,00 (2,83)	99,42±2,42	A
d)	7	103,50 (3,54)	94,80 (2,83)	90,83±0,37	A
e)	7	380,50 (26,16)	359,00 (24,04)	94,36±0,17	A
f)	7	889,0 (16,97)	809,50 (50,20)	91,02±3,91	A
	14	889,00 (16,97)	710,00 (18,38)	79,90±3,59	B

Valor medio (desviación estándar); Valor medio ± error estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ) en el nivel de histamina debido a la presencia del consorcio microbiano. Control es el ensayo con sustrato pero sin la presencia del cultivo microbiano.

### 5.2.2.2. Modelado del crecimiento microbiano durante la aclimatación

Para modelar el crecimiento microbiano del consorcio microbiano durante la etapa de aclimatación, se utilizó la ecuación de Gompertz modificada por Zwietering et al. (1990) para obtener de forma directa los parámetros de importancia biológica. Se utilizó este modelo dado que representa una curva sigmoideal asimétrica que ofrece mayor flexibilidad que el modelo Logístico (Gibson et al., 1987). En algunos casos, para lograr la convergencia, fue necesario inicializar los parámetros dando valores similares a los de la solución final, tal como fue reportado por Lopez et al., 2004. Los resultados de los

parámetros ( $A$ ,  $\mu_m$  y  $L$ ), el parámetro derivado  $MPD$  y así como también los estimadores del ajuste ( $RMSE$  y  $\bar{R}^2$ ) se muestran en la Tabla 5.7.

**Tabla 5.7:** Parámetros del modelo de Gompertz modificado ( $A$ ,  $\mu_m$  y  $L$ ),  $RMSE$  y  $\bar{R}^2$  de los ajustes y  $MPD$  para el crecimiento del consorcio microbiano con diferentes concentraciones de histamina inicial.

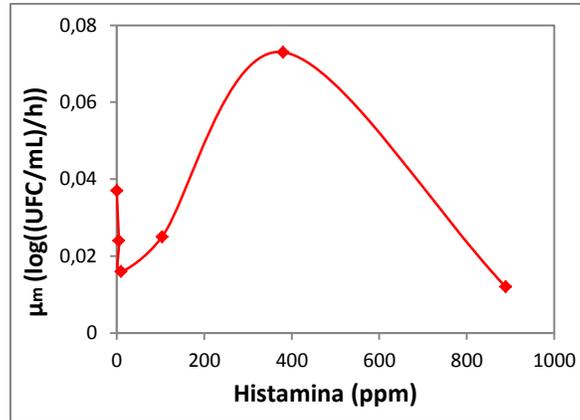
Ensayo	Histamina [ppm]	$A$ [log(UFC/mL)/h]	$\mu_m$ [log(UFC/mL)/h]	$L$ [h]	$RMSE$	$\bar{R}^2$	$MPD$ [log(UFC/mL)]
a)	0	0,438±0,017	0,037±0,008	18,140±1,489	0,048	0,922	11,885 (0,035)
b)	5	0,432±0,017	0,024±0,006	16,291±2,274	0,043	0,933	11,886 (0,029)
c)	10	0,385±0,010	0,016±0,001	1,326±1,113*	0,022	0,978	11,965 (0,027)
d)	103,5	0,364±0,010	0,025±0,003	0,413±0,654*	0,027	0,967	11,953 (0,046)
e)	380,5	0,370±0,015	0,073±0,013	18,647±0,485	0,037	0,935	11,991 (0,015)
f)	889	0,391±0,009	0,012±0,001	1,654±1,694*	0,020	0,977	12,023 (0,013)

Valor estimado ± error estándar. Valor medio (desviación estándar)

\*Parámetros con elevado error estándar.

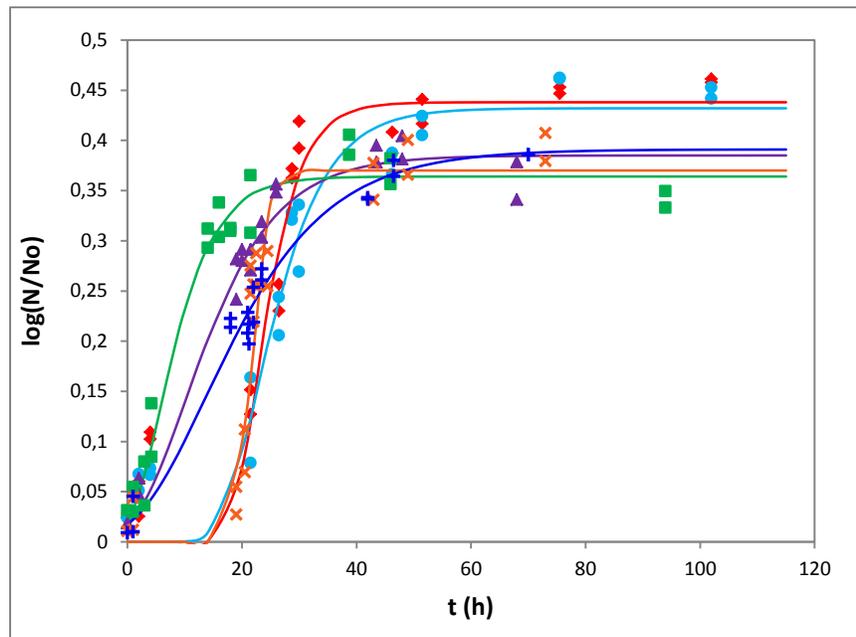
Para los ajustes de la tabla 5.7, los valores del coeficiente de determinación ajustado y los de *RMSE* mostraron un buen ajuste ( $\bar{R}^2 > 0,92$  y  $RMSE < 0,05$ ). Sin embargo, el error estándar para la estimación de *L* resultó similar al valor del parámetro en cuestión, considerándose un error estándar elevado. Resultados similares han sido reportados para ajustes realizados sobre curvas de crecimiento con fase *lag* muy corta (Tomac et al., 2013), así como también sucedió en los ajustes de la Sección 3.2.3.2. Las fases *lag* de los ensayos a), c) y e) que resultaron superiores a 16 hs, se relacionarían con el mayor tiempo requerido por los microorganismos para adaptarse a las nuevas condiciones del cultivo.

El valor *A* que corresponde a la diferencia entre la asíntota superior y los recuentos iniciales fue similar ( $\sim 0,4 \log(\text{UFC/mL})$ ) para todos los ensayos. Asimismo, se puede observar que los *MPD* fueron equivalentes en todos los ensayos (Tabla 5.7), lo cual se verificó mediante ANOVA de un factor evidenciando que no hubo diferencias significativas ( $p=0.098$ ). Esto indicaría que la concentración de histamina no fue inhibitoria del crecimiento del consorcio de microorganismos halófilos. En cuanto a la riqueza de colonias del consorcio microbiano observada en las placas de recuento, se observó el crecimiento de cepas en tonos beige/crema y rojizos/anaranjados en todas las experiencias. En base a los resultados de los *MPD* la biomasa máxima generada fue equivalente. Sin embargo, no se puede descartar que algún microorganismo se haya visto afectado y en consecuencia haya variado la biodiversidad del consorcio microbiano. Esto también podría explicar las diferentes velocidades  $\mu_m$ , como puede observarse en la tabla 5.7 y Fig. 5.4. Según la tendencia observada en la curva de esta última figura, la histamina a una concentración mayor a 400 ppm resultaría tóxica para los microorganismos del consorcio, afectando el máximo rendimiento celular (Stanbury et al, 1995). En el balance *batch* de biomasa el término de muerte celular se incrementa con la concentración tóxica del sustrato y el sustrato consumido se emplea en forma creciente para el mantenimiento celular a medida que aumenta la concentración tóxica del sustrato (Blanch y Clark, 1996).

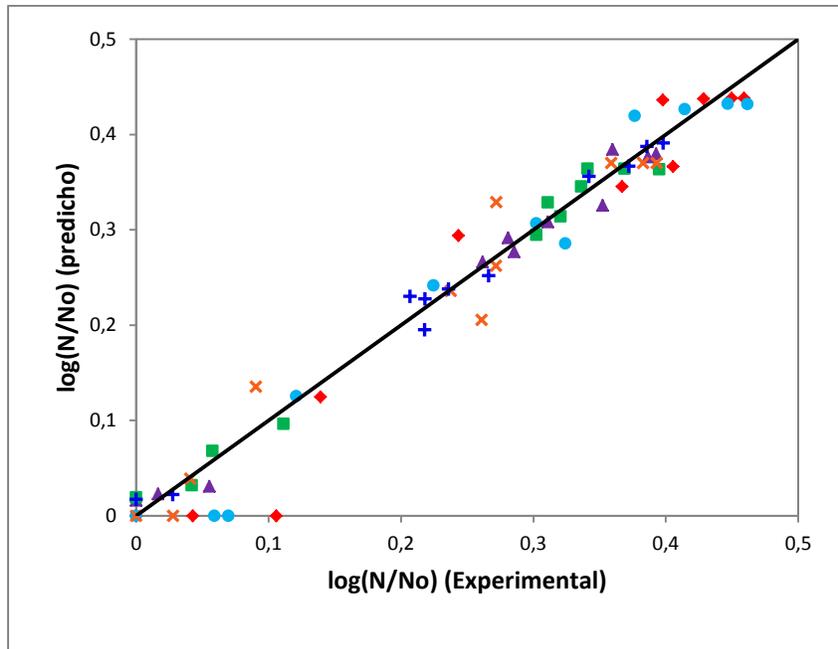


**Figura 5.4:** Relación de la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_m$ ) del consorcio microbiano con el contenido de histamina en el medio de cultivo (ppm).

El ajuste de los datos experimentales al modelo de Gompertz modificado y la correlación entre los valores experimentales y predichos se presentan en las Figuras 5.5 y 5.6, respectivamente, pudiendo observar una buena predicción del modelo.



**Figura 5.5:** Ajuste del modelo de Gompertz modificado para del consorcio microbiano ( $N$ : UFC/mL a tiempo  $t$ ;  $N_0$ : UFC/mL inicial) con diferentes contenidos de histamina en el medio de cultivo: 0 ppm (♦); 5 ppm (●); 10 ppm (▲); 103,5 ppm (■); 380,5 (×); 889,5 ppm (+) y ajuste del modelo para 0 ppm (—); 5 ppm (—); 10 ppm (—); 103,5 ppm (—); 380,5 (—); 889,5 ppm (—).



**Figura 5.6:** Correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo de Gompertz modificado (N: UFC/mL a tiempo t; No: UFC/mL inicial) para los ajustes realizados con diferente contenido inicial de histamina: con diferentes contenidos de histamina en el medio de cultivo: 0 ppm (♦); 5 ppm (●); 10 ppm (▲); 103,5 ppm (■); 380,5 (×); 889,5 ppm (+). Recta a 45° (—).

### 5.2.2.3. Degradación de histamina por el consorcio microbiano

Luego de la etapa de aclimatación del consorcio microbiano a la presencia de histamina en el bioreactor *batch* (Sección 5.2.2.1), donde se encontró que la degradación de histamina sucedía en fase estacionaria, se estudió la degradación de histamina en un medio de cultivo nutritivo con agregado de histamina (Sección 2.4.2). Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 5.8. Mediante un test-t para comparación de medias, se evaluaron con los contenidos de histamina al finalizar el período de incubación (contenido de histamina residual, ppm), hallando diferencias significativas ( $p=0,003$ ) entre ambos ensayos, lo que indicaría que efectivamente hubo degradación. La capacidad degradadora de histamina para el consorcio microbiano en estas condiciones resultó ser del 35,7%. Este porcentaje resultó ser considerablemente mayor al de las cepas puras (4-10% de degradación de la histamina presente a tiempo cero) (Sección 5.2.1.3) y al del consorcio microbiano durante la

aclimatación (~20% de degradación de la histamina presente a tiempo cero) (Sección 5.2.2.1).

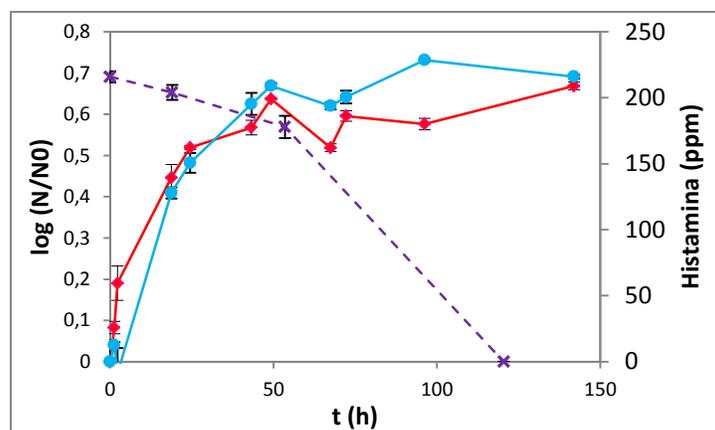
**Tabla 5.8:** Capacidad de degradar histamina por consorcio microbiano

<b>Ensayo</b>	<b>Contenido de histamina residual [ppm]</b>		<b>Capacidad degradadora de histamina [%]</b>
Control	396,50 (4,94)	A	-
Consortio microbiano	255,00 (2,83)	B	35,7

Valor medio (error estándar). Los contenidos de histamina cuantificados corresponden al sobrenadante diluido con HCl 1M (relación sobrenadante y ácido 1:1).

#### **5.2.2.4. Degradación de histamina en condiciones de nutrientes limitadas**

Se estudió la degradación de histamina en un medio de cultivo con histamina (~200 ppm) y otros nutrientes en condiciones limitadas (Sección 2.4.4.2), con el objetivo de mantener la histamina como principal fuente de carbono. A fin de evitar el stress microbiano por el cambio en las condiciones así como también enriquecer el consorcio con microorganismos resistentes y/o degradadores de histamina, y permitir una posible formación de biofilm en el biorreactor, se efectuaron tres ciclos de crecimiento del consorcio microbiano en este nuevo medio de cultivo renovando el 50% del medio de cultivo, dado que al mantenerse más células en el medio la aclimatación al compuesto potencialmente tóxico es mejor (Murialdo et al., 2001). En un cuarto ensayo se renovó el 95% del medio de cultivo para que sea más preciso el monitoreo y en este caso se realizaron las cuantificaciones. Los resultados experimentales de las curvas de crecimiento y de las cuantificaciones de histamina se presentan en la Fig. 5.7.



**Figura 5.7.** Degradación de histamina y curvas de crecimiento del consorcio microbiano (N: UFC/mL a tiempo t; No: UFC/mL inicial). Crecimiento del consorcio en ensayo control (—●—) y con histamina (—●—). Cuantificación de histamina (—×—).

En este ensayo, se logró degradar la histamina hasta cantidades no detectables (Fig. 5.7). Al inocular el consorcio microbiano en un medio de cultivo con limitación de nutrientes se optimizó la degradación de histamina en comparación a la degradación lograda por el consorcio microbiano en medios de cultivo nutritivos (Sección 5.2.2.1 y 5.2.2.2), como así también por las cepas puras (Sección 5.2.1.3). Cabe destacar que en este ensayo que se realizó en condiciones de nutrientes limitadas, las colonias desarrolladas en las placas para recuentos (agar Gibbons con NaCl 17,5% p/p) presentaron únicamente colonias en tonos beige/crema, evidenciando cambios en la composición del consorcio microbiano.

A fin de hacer una descripción fenotípica preliminar, se observaron las células al microscopio óptico (1000x) con contraste de fases en una cámara de Neubauer y se pudieron discriminar cocos y bacilos, estos últimos tanto pequeños como largos así como móviles e inmóviles. También se sembraron diluciones del consorcio microbiano en Agar IRAM y agar IRAM con leche (NaCl 17,5% p/p), observando la misma morfología de las colonias y sin evidenciar halo proteolítico en el medio con leche. Esto indicaría que el consorcio microbiano continuó manteniendo la estructura de cultivo mixto pero que las cepas halofílicas rojizas/anaranjadas fueron inhibidas. Con el objetivo de monitorear que el consorcio microbiano se mantuviera formado por bacterias y/o arqueas, se efectuaron determinaciones en un medio de cultivo para hongos y levaduras halófilas (HyL con

agregado de 17,5% NaCl, Sección 2.2.5), cuyo resultado no evidenció la presencia de estos microorganismos (resultado: No detectado).

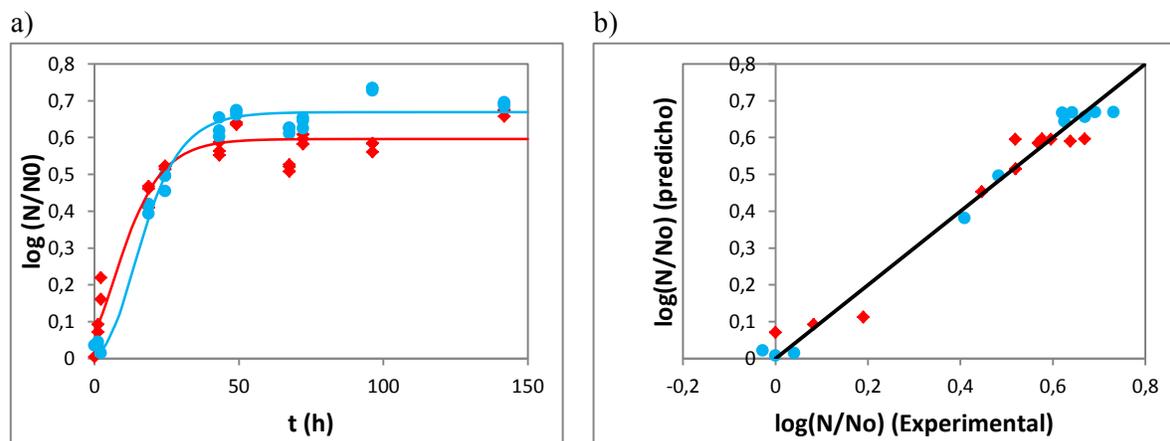
Por otro lado, se ajustó la curva de crecimiento al modelo de Gompertz modificado por Zwietering et al. (1990). Para lograr la convergencia, se debieron inicializar los parámetros dando valores similares a los de la solución final (López et al., 2004). Los resultados de los parámetros ( $A$ ,  $\mu_m$  y  $L$ ), el parámetro derivado  $MPD$  y los estimadores del ajuste ( $RMSE$  y  $\bar{R}^2$ ) se exponen en la Tabla 5.9.

**Tabla 5.9:** Parámetros del modelo de Gompertz modificado ( $A$ ,  $\mu_m$  y  $L$ ),  $RMSE$  y  $\bar{R}^2$  de los ajustes y  $MPD$  para el crecimiento del consorcio en un medio de cultivo limitado en nutrientes, con y sin histamina.

Ensayo	Histamina [ppm]	$A$ [log(UFC/mL)/h]	$\mu_m$ [log(UFC/mL)/h]	$L$ [h]	$RMSE$	$\bar{R}^2$	$MPD$ [log(UFC/mL)]
Control	0	0,596±0,013	0,024±0,003	-2,226±1,340	0,051	0,939	10,396 (0,052)
Histamina	200	0,669±0,010	0,027±0,003	4,372±1,940	0,040	0,977	10,438 (0,007)

Los valores del coeficiente de determinación ajustado ( $\bar{R}^2 > 0,93$ ) y los de  $RMSE$  ( $< 0,05$ ) mostraron un ajuste adecuado. Sin embargo, para el biorreactor *batch* “control”,  $L$  resultó negativo, lo que carece de sentido teniendo en cuenta que por definición  $L$  es el tiempo de duración de la fase de demora (o *lag*) en el crecimiento, indicando que no tiene fase *lag* o que la misma es despreciable. Como se observó en la Sección 3.2.3.2 y 5.2.2.2, cuando la fase *lag* es muy corta el modelo no resulta adecuado para la predicción de este parámetro. Las velocidades  $\mu_m$  fueron similares y pese a que el valor  $A$  (diferencia entre la asíntota superior y los recuentos iniciales) fue diferente para ambos ensayos, se puede observar que los  $MPD$  fueron equivalentes (test-t no presentó diferencias significativas,  $p=0,913$ ). Esto indicaría que el agregado de histamina, en las concentraciones usadas, no modificó significativamente la biomasa generada.

Se observa una buena predicción de la curva de crecimiento así como valores próximos a la recta a 45° en la correlación entre los valores experimentales y predichos (Fig. 5.8), verificando la bondad de ajuste del modelo.



**Figura 5.8:** a) Ajuste del modelo de Gompertz modificado para el crecimiento del consorcio microbiano ( $N$ : UFC/mL a tiempo  $t$ ;  $N_0$ : UFC/mL inicial) en un medio de cultivo limitado en nutrientes, con y sin histamina. b) Correlación entre valores experimentales y predichos por el modelo de Gompertz modificado. Resultados experimentales para el ensayo control (♦) y el ensayo con histamina (●) y estimados para el control (—) y el ensayo con histamina (—). Recta a 45° (—).

### 5.3 CONCLUSIONES PARCIALES

Las identificaciones moleculares resultaron de utilidad para diferenciar los géneros de las cepas halófilas aisladas de muestras durante el proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada a partir de muestras de sal o de anchoíta durante las etapas de salado húmedo y maduración. Se identificaron cepas del dominio *Archaea*, género *Halobacterium* y cepas del dominio *Bacteria* pertenecientes a los géneros *Salicola*, *Halomonas*, *Halovibrio*, *Chromohalobacter*, *Salinibacter* y *Lentibacillus/Virgibacillus*. Mediante estas determinaciones se encontró que 11aii (próxima a los géneros *Lentibacillus/Virgibacillus*), S18 y S20 (*Halobacterium* spp.) podrían ser nuevas especies.

La motilidad microbiana está muy asociada a la formación de biofilms y acelera el proceso de degradación de compuestos. En esta tesis se encontraron cepas halófilas con actividad quimiotáctica hacia histidina o histamina en placas de agar blando, un campo aún no explorado, por lo tanto continuar los estudios sobre esta temática sería de interés a fin de favorecer la reducción de histamina en el producto.

La incidencia de cepas halófilas con actividad histidina-descarboxilasa (formadoras de histamina) mostró una tendencia decreciente a lo largo del proceso, lo que refuerza los resultados del Capítulo 3 donde se observó que las mejoras tecnológicas del proceso de salado-madurado deben enfocarse en la etapa de salado-húmedo.

En cuanto a la capacidad de degradar una alta concentración de histamina (~ 800 ppm) en un medio nutritivo, se encontró que 5 cepas halófilas (T4, A18, A28, S18 y S20) eran capaces de degradarla entre un 4,2 y 9,7%. En base a las pruebas fenotípicas relacionadas con el metabolismo de estos microorganismos y su relación con la potencial influencia sensorial en el producto, se concluyó que S20 y A28 poseen características adecuadas como potenciales cultivos *starters*, por lo tanto se continuarán estudios al respecto para analizar *in situ* su comportamiento. Estas cepas se identificaron genotípicamente como *Halobacterium* spp. y *Halovibrio* spp., respectivamente.

Por otro lado, se encontró que la biodegradación de histamina en condiciones hipersalinas se ve favorecida por el uso de un consorcio microbiano halófilo. Estos resultados son los primeros reportados al respecto, de amplio potencial para aplicaciones biotecnológicas. El consorcio microbiano degradó ~20% de histamina presente a tiempo cero durante la aclimatación a la presencia de esta amina biógena, en un medio de cultivo nutritivo. Luego de la aclimatación, aumentó a ~36% la capacidad de degradar histamina en ese mismo medio de cultivo nutritivo, siendo aún mayor en condiciones de nutrientes limitadas (degradación completa). Para estas determinaciones, el modelado matemático de la cinética de crecimiento microbiano resultó de gran utilidad a fin de evaluar el comportamiento global del consorcio en las diferentes condiciones analizadas. En este sentido, el modelo de Gompertz modificado mostró una buena bondad de ajuste, con la consideración que para lograr la convergencia, se debieron inicializar los parámetros partiendo de valores similares a los de la solución final.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

---

## CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados hallados en esta Tesis permitieron cumplir con los objetivos planteados, ya que se analizó el efecto inhibitor del tratamiento de salado sobre la microbiota autóctona y no autóctona del pescado en el proceso de salado-madurado de anchoíta (*Engraulis anchoita*) representando un aporte significativo para el conocimiento científico-técnico necesario para colaborar con un óptimo aprovechamiento del recurso y para el sector industrial. Asimismo se evaluó la microbiota halófila -dominante del proceso- y sus características, considerando tanto su relación con la inocuidad del producto como su potencial aplicación biotecnológica.

### **Con respecto a las investigaciones basadas en el proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada:**

- Se modeló matemáticamente el crecimiento microbiano (modelos de Gompertz y Logísticos modificados) y la inhibición de los microorganismos (modelos de Gompertz para inactivación y modelo de Weibull) durante el salado húmedo, siendo el modelo de Gompertz modificado y el modelo de Weibull los que mejor predijeron el comportamiento microbiano.
- A partir del análisis de biodiversidad mediante diferentes índices, se verificó que la microbiota halófila resulta dominante en el proceso de salado-madurado, encontrando que las bacterias aerobias, y dentro de ellas principalmente las psicótrofas, son las siguientes en importancia.
- Se pudo observar que el tratamiento tradicional de salado húmedo reduce rápidamente la microbiota indeseada siendo suficiente para lograr la inhibición de los microorganismos deteriorativos y patógenos potencialmente presentes en pescado.

- Se validó el modelo de estimación de actividad de agua de Lupín et al. (1981) para la especie *Engraulis anchoita*, resultando estos hallazgos de especial interés para predecir la actividad de agua en el salado de pescados de la familia *Engraulidae* tanto en el área de investigación como en la industria, principalmente en los saladeros locales que trabajan con la especie *E. anchoita*.
- Se modelaron matemáticamente el contenido de sal y de agua durante el salado húmedo a las temperaturas medias de 14°C y 5°C, tanto mediante modelos empíricos (Peleg, ZyL y Weibull) como difusivos. Dentro de los modelos empíricos, el de Peleg resultó la mejor opción para las condiciones de estudio ya que predijo adecuadamente la cinética como también el contenido de agua y sal en el equilibrio. Por otra parte, el modelo difusivo (modelo de Crank para cilindro infinito) resultó ser el más adecuado para representar la pérdida de agua y la ganancia de solutos así como para determinar los coeficientes de difusión en el tejido.
- Se relevaron los sistemas tecnológicos utilizados actualmente en los saladeros y se consideró la modificación solicitada por la FDA. Desde el punto de vista de la cinética de transferencia de masa (ganancia de sal y pérdida de agua) durante el salado húmedo, no se presentaron diferencias entre realizar esta etapa en los saladeros a temperaturas medias de 14 o 5°C. A partir de la evaluación de la cinética microbiana, no se encontró evidencia suficiente que justifique el cambio a nivel industrial de las condiciones de proceso. Por lo tanto, las evaluaciones realizadas indicarían que no sería necesaria la modificación del proceso solicitada.

**Con respecto a las investigaciones sobre las bacterias y arqueas halófilas aisladas del proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada:**

- Se encontró que las distintas etapas del proceso están dominadas por diferentes poblaciones microbianas que presentan características fenotípicas diferentes.

- Las cepas con capacidades proteolíticas y lipolíticas se encontraron uniformemente a lo largo del proceso, siendo esto una condición deseable debido a la contribución positiva al desarrollo de textura y aroma final, respectivamente; mientras que las cepas con características negativas, como la producción de sulfuro de hidrógeno o indol, se encontraron principalmente en muestras de sal y durante la etapa de salado húmedo, pero no durante la maduración.
- El agrupamiento realizado mediante en Análisis Multivariado discriminó en grupos diferentes a la mayoría de las cepas aisladas durante el salado húmedo y la maduración. De esta manera pudieron asociarse las cepas procedentes del salado húmedo con actividades no deseables para el proceso (producción de sulfuro de hidrógeno e indol), mientras que las cepas aisladas principalmente de muestras de sal y durante la maduración se caracterizaron por algunas capacidades bacterianas positivas para el proceso y producto (actividad de citocromo-oxidasa y no producción de sulfuro de hidrógeno e indol). Estos resultados quedaron verificados al ser comparados con un set de cepas independientes.
- La caracterización fenotípica de la microbiota halófila durante el proceso, así como el reconocimiento de cuáles son las características principales de la misma, podría ser una herramienta para proyectar cambios en el proceso de elaboración, por ejemplo, mediante la inoculación de microorganismos halófilos iniciadores que pudieran coincidir en su perfil fenotípico con la microbiota típica de la maduración o plantear alternativas, según el objetivo buscado.
- Las cepas halófilas identificadas por técnicas moleculares resultaron corresponder tanto al dominio *Archaea* como al dominio *Bacteria*, así como los géneros encontrados se han relacionado con pescado salado-madurado o derivados. Parte de las cepas identificadas presentaron bajos porcentajes de similitud mediante estas técnicas indicando que podrían corresponder a nuevas especies.

- Dentro de las cepas halófilas aisladas, se encontraron cepas que presentaron motilidad quimiotáctica positiva hacia histidina y otras hacia histamina. El hecho de ser quimiotácticas hacia un sustrato que degradan como histamina, sería considerado una ventaja competitiva de los microorganismos, para ser usado como metodología a fin de favorecer la reducción de histamina en el producto. También podría serlo el hecho de buscar alternativas para evitar la presencia de cepas quimiotácticas hacia histidina (precursor de la histamina).
- Se encontraron 5 cepas halófilas (T4, A18, A28, S18 y S20) capaces de degradar histamina (concentración inicial ~ 800 ppm) entre ~4 y 10%. En base a las características fenotípicas de interés tecnológico (ensayos *in vitro*), principalmente por su relación con la potencial influencia sensorial en el producto, se concluyó que 2 cepas (S20 y A28, identificadas como *Halobacterium* spp. y *Halovibrio* spp., respectivamente) poseen características adecuadas como posibles cultivos *starters*.
- Se estudió la degradación de histamina por un consorcio microbiano halófilo, encontrando que la aclimatación del consorcio a la presencia de histamina en un biorreactor discontinuo fue efectiva para lograr la degradación de este compuesto y que en condiciones de nutrientes limitados fue capaz de degradarlo completamente. A partir del modelado matemático de la cinética de crecimiento microbiano se encontró que la velocidad específica de crecimiento se vió desfavorecida al aumentar el contenido de histamina en el medio de cultivo a concentraciones mayores de la ~400 ppm, atribuyéndose este hecho a que la histamina resultaría tóxica para los microorganismos.

La etapa de salado húmedo es crítica desde el punto de vista de la calidad global de producto, siendo necesaria una rápida inactivación de la biota autóctona del pescado a fin de evitar el deterioro y la pérdida de inocuidad. Considerando que las cepas halófilas con actividad histidina-d Descarboxilasa (formadoras de histamina) mostraron: i) una tendencia decreciente a lo largo del proceso; ii) que aquellas aisladas en la etapa de salado húmedo

presentaron características fenotípicas negativas para el producto y iii) que las bacterias aerobias psicrótrofas persistieron durante el salado húmedo, se puede concluir que sería conveniente realizar mejoras tecnológicas en la etapa de salado húmedo. Por otro lado, la biota psicrótrofa -relacionada con el deterioro- se podría ver favorecida por un descenso de temperatura, por lo tanto se debe apuntar a reducir los tiempos de salado húmedo al mínimo necesario para lograr la actividad de agua requerida ( $\sim 0,86$ ), y así minimizar el efecto negativo que la biota superviviente pudiera tener. En la literatura sobre el proceso de salado-madurado de la especie *E. anchoita* se puede encontrar que ha sido propuesta la alternativa de realizar el descabezado y eviscerado previo al salado húmedo, siendo los resultados hallados en esta Tesis complementarios dado que la microbiota halófila durante el salado húmedo se vio relacionada con características fenotípicas negativas, y al retirar las vísceras antes de esta etapa la carga microbiana se reduciría considerablemente.

En esta Tesis se encontraron cepas halófilas con actividad quimiotáctica hacia histidina o histamina y, por otro lado, se encontró que la biodegradación de histamina en condiciones hipersalinas se ve favorecida por el uso de un consorcio microbiano halófilo. Según las búsquedas bibliográficas realizadas, las investigaciones llevadas a cabo en esta Tesis corresponden a las primeras realizadas al respecto, siendo de amplio potencial para posibles aplicaciones biotecnológicas. Por otro lado, cabe destacar que, según la literatura encontrada, la aplicación que se hace del Análisis de Correspondencias Múltiples (ACM) en esta Tesis también es novedosa, ya que se utiliza por primera vez para investigar las comunidades microbianas de un producto alimenticio y sus modificaciones a lo largo del proceso de fabricación, en este caso en particular enfocado en las características fenotípicas de las cepas halófilas.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

---

## PERSPECTIVAS FUTURAS

Se espera que los resultados obtenidos contribuyan a la toma de decisiones principalmente a nivel industrial, como así también que sean de utilidad para el área de investigación de alimentos salado-madurados.

Durante el desarrollo de esta Tesis, se encontraron cepas halófilas que evidenciaron capacidad para degradar histamina y no presentaron características fenotípicas consideradas negativas para el producto, por lo que, desde un punto de vista tecnológico, resultaron adecuados para la inoculación en el proceso de elaboración de anchoíta salada-madurada. Este estudio podría continuarse en trabajos futuros, evaluando *in situ* la acción de los microorganismos halófilos, resultados que serían de particular interés para futura transferencia al sector pesquero.

Asimismo, este trabajo de Tesis presenta investigaciones novedosas y de amplio potencial para posibles aplicaciones biotecnológicas, abriendo un abanico de temas que pueden ser analizados con mayor profundidad, como puede ser la actividad quimiotáctica de cepas halófilas frente a histidina o histamina y el hecho que la implementación de un consorcio microbiano halófilo favorecería la biodegradación de histamina en condiciones hipersalinas en comparación a la acción de cepas puras.

Además se espera continuar los análisis de las arqueas y bacterias halófilas que evidenciaron bajos porcentajes de similitud al identificarlas por técnicas moleculares, a fin de demostrar que pertenecen a nuevas especies, como así también concluir los estudios por metagenómica (análisis en curso) de la comunidad microbiana en muestras de anchoíta salada-madurada y del consorcio microbiano que resultó adecuado para degradar histamina en los estudios en biorreactor discontinuo.

Estas temáticas serán abordadas durante la instancia post-doctoral de la tesista (CONICET), para desarrollar el siguiente plan: Investigación de cepas halófilas

degradadoras de histamina como control histaminogénico en procesos de elaboración de alimentos salado-madurados.

# **NOMENCLATURA**

---

## NOMENCLATURA

A Diferencia entre la asíntota superior - cuando el tiempo tiende a infinito - y los recuentos iniciales (de  $\log(N/N_0)$  vs  $t$ )

ACM Análisis de Correspondencias Múltiples

AJCP Agrupamiento Jerárquico de Componentes Principales

$a_w$  Actividad de agua

$a_w^0$  Actividad de agua a molalidad cero

$b$  Alcance de línea recta

BA7 Bacterias Aerobias a 7°C

BA25 Bacterias Aerobias a 25°C

BA35 Bacterias Aerobias a 35°C

BED Bacterias Específicas del Deterioro

BH15 Microorganismos halófilos con 15% NaCl p/v

BH20 Microorganismos halófilos con 20% NaCl p/v

$C$  Diferencia entre los valores de la asíntota superior e inferior

CaCl Cloruro de calcio

CSR *Clostridium* sulfito-reductores

CT Coliformes totales

$D(\%)$  Actividad degradadora de histamina

DMSO dimetil-sulfóxido

dNTPs Deoxinucleótidos trifostato

$E$  Error relativo

$e$  Número de Euler

EB Enterobacterias

FDA *Food and Drug Administration*

$H$  Índice de Shannon

HCl Ácido clorhídrico

H<sub>2</sub>O Agua

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Peróxido de hidrógeno

HPLC Cromatografía líquida de alta performance

$H_2S$  Ácido sulfhídrico  
 $KCl$  Cloruro de potasio  
 $K_2HPO_4$  Fosfato dipotásico  
 $KH_2PO_4$  Fosfato monopotásico  
 $k_{P1}$  Constante de velocidad del modelo de Peleg  
 $k_{P2}$  Constante de capacidad del modelo de Peleg  
 $k_{ZL}$  Constante de velocidad específica del modelo de Zugarramurdi y Lupín  
 $m$  Molalidad del soluto  
 $M$  Tiempo al cual la velocidad de muerte es máxima  
 $M_c$  Cantidad de muestras colonizadas por un determinado microorganismo  
 $M_t$  Número total de muestras analizadas  
 $M_0^P / M_0^S$  Relación másica de pescado/salmuera inicial  
 $MgCl_2$  Cloruro de magnesio  
 $N$  Número de microorganismos en el tiempo  
 $N_f$  Número de microorganismos al finalizar el tratamiento  
 $N_i$  Número de cada cepa  $i$  en la muestra  
 $N_t$  Número de microorganismos totales en la muestra  
 $N_0$  Número de microorganismos inicial  
 $NaCl$  Cloruro de sodio  
 NBV-T Nitrógeno Básico Volátil Total  
 NNP Nitrógeno no proteico  
 $L$  Duración de la fase de demora en el crecimiento  
 $O_2$  Oxígeno molecular  
 OTMA Óxido de trimetilamina  
 PCR *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)  
 $R^2$  Coeficiente de determinación  
 $\bar{R}^2$  Coeficiente de determinación ajustado  
 $RMSE$  Raíz del error cuadrático medio  
 $s$  Riqueza  
 $S$  Tasa de supervivencia  
 $SO_4Mg$  Sulfato de magnesio

$t$  Tiempo

TMA Trimetilamina

$X_c^H$  Concentración de histamina en el sobrenadante acidificado del control sin inóculo microbiano

$X_m^H$  Concentración de histamina en el sobrenadante acidificado de las muestras tratadas con inóculos microbianos

$x^w$  Fracción másica (base húmeda) de agua en el pescado

$x_0^w$  Fracción másica (base húmeda) de agua inicial en el pescado

$x^{NaCl}$  Fracción másica (base húmeda) de sal en el pescado

$x_0^{NaCl}$  Fracción másica (base húmeda) de sal inicial en el pescado

$x_t$  Fracción másica (base seca) de agua o sal al tiempo de deshidratación  $t$

$x_0$  Fracción másica (base seca) de agua o sal inicial

$y_0^w$  Fracción másica (base húmeda) de agua inicial en la salmuera

$y_e^{NaCl}$  Fracción másica (base húmeda) de sal en la salmuera en el equilibrio

$y_0^{NaCl}$  Fracción másica (base húmeda) de sal inicial en la salmuera

$Z^{NaCl}$  Concentración de sal en la fase líquida del músculo

$Z_e^{NaCl}$  Concentración de sal en la fase líquida del músculo en el equilibrio

$\alpha$  Parámetro de escala de los modelos de Weibull

$\beta$  Parámetro de forma de los modelos de Weibull

$\mu_d$  Velocidad específica de inactivación

$\mu_m$  Velocidad máxima específica de crecimiento

$\%A_i$  Índice de abundancia relativa de especies

$\%C_i$  Porcentaje de ocurrencia

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aizpún de Moreno J. E., Moreno V. J., Malaspina A. M. 1979. Variaciones en la composición bioquímica proximal de la anchoíta durante tres temporadas de pesca (1975-1977). *Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero*. Vol 1, Num 1: 45-53.
- Alfonzo A., Randazzo W., Barbera M., Sannino C., Corona O., Settanni L., Moschetti G., Santulli A. y Francesca N. 2017. Effect of salt concentration and extremely halophilic archaea on the safety and quality characteristics of traditional salted anchovies. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 26: 620-637
- Alin K. 1950. Bacterial production and destruction of histamine in vitro. *Acta allergologica*. III: 136-146
- Akolkar A. V., Durai D., Desai A. J. 2010. *Halobacterium* sp. SP1 (1) as a starter culture for accelerating fish sauce fermentation. *J. Appl. Microbiol.* 109: 44–53.
- Alonso Díaz DA. 2013. Histaminas y NBVT. Secretaría General de Comercio Exterior. Secretaria de Estado de Turismo y Comercio. España.
- Almquist J., Cvijovic M., Hatzimanikatis V., Nielsen J. y Jirstrand M. (2014). Kinetic models in industrial biotechnology – Improving cell factory performance. *Metabolic Engineering*. pp. 48-60.
- Alzamora, S. M., Guerrero, S., Viollaz, P., y Welti, J., 2005. Novel food processing. En: Barbosa Cánovas G.(Ed.). *Experimental protocols for modeling the response of microbial populations exposed to emerging technologies: Some points of concern*. Nueva York, Marcel Dekker, Inc., pp. 591-607.
- Ammor M. S., Mayo B. 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science* 76: 138–146
- Andrés, A., Rodríguez-Barona, S., Barat, J. M. and Fito, P. 2005. Salted cod manufacturing: Influence of salting procedure on process yield and product characteristics, *Journal of Food Engineering*, 69 (4): 467-471
- Andrés A. I., Ruiz J. 2001. Tecnología del salazonado del jamón ibérico, En cap. VIII de *Tecnología del jamón ibérico, de los sistemas tradicionales a la explotación racional del sabor y el aroma*”. Coordinador J. Ventanas. Ediciones Mundi Prensa. Madrid.

- Anisha C, Mathew J., Radhakrishnan E. K. 2012. Extracellular lipolytic enzyme Production by a novel extremely halophilic bacterium. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*. 2 (3): 143-148
- Antón J., Oren A., Benlloch S., Rodríguez-Valera F., Amann R., Rosselló-Mora R.. 2002. *Salinibacter ruber* gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the Bacteria from saltern crystallizer ponds. *Int J Syst Evol Microbiol*. 52(Pt 2):485-91
- AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis*, 15th edn. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC. (1993). *Official Methods of Analysis*, 16th edn. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Aponte M., Blaiotta G., Francesca N., Moschetti G. 2010. Could halophilic archaea improve the traditional salted anchovies (*Engraulis encrasicolus* L.) safety and quality? *Lett. Appl. Microbiol*. 51: 697–703.
- Arballo J. R., Bambicha R. R., Campañone L. A., Agnelli M. A., Mascheroni R. H. 2011. Mass transfer kinetics and regression desirability optimization during osmotic dehydration of pumpkin, kiwi and pear. *International Journal of Food Science & Technology*. 47(2): 306–314
- Assis F. R., Morais R. M. S. C., Morais A. M. M. B. 2016. Mass Transfer in Osmotic Dehydration of Food Products: Comparison Between Mathematical Models. *Food Eng Rev*. 8(2): 116–133.
- Atanasova N .S., Pietilä M. K., Oksanen H. M. 2013. Diverse antimicrobial interactions of halophilic archaea and bacteria extend over geographical distances and cross the domain barrier. *Microbiology Open* 2: 811-825.
- Ayrapetyan M., Oliver J. D. 2016. The viable but non-culturable state and its relevance in food safety. *Current Opinion in Food Science*: 8:127–133
- Azuara, E., Cortes, R., Garcia, H.S. & Beristain, C.I. 1992. Kinetic model for osmotic dehydration and its relationship with Fick's second law. *International Journal of Food Science and Technology*, 27: 239-242
- Bacilio-Jimenez, M. Aguilar-Flores, S., Ventura-Zapata, E., Perez-Campos, E., Bouquelet, S. and Zenteno, E. (2003). Chemical characterization of radical exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effect on the chemotactic capacity of endophytic bacteria and

- two root and soil plant growth-promoting bacteria (*Azospirillum* and *Bacillus* spp.) Plant and Soil 249:271-277
- Barañano, Silvia. (2013). Comunicación personal. Saladero PRANAS Puerto Mar del Plata.
- Barat J. M., Rodríguez-Barona S., Andrés A. and Fito P., 2003. Cod salting manufacturing analysis, Food Research International, 36 (5): 447-453
- Barat J. M., Rodríguez-Barona S., Andrés A., Ibáñez J. B. 2004. Modeling of the cod desalting operation. J. Food Sci. 69(4): 183–189.
- Barat J. M. 1998. Desarrollo de un modelo de la deshidratación osmótica como operación básica. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Barbosa M. N., Abdallah P. R. 2012. Análise econômica da captura da anchoita (*engraulis anchoita*) no litoral sul do Brasil. 50 Congresso da Sober.
- Bardy S. L., Ng S. Y. M., Jarrell K. F. (2003). Prokaryotic motility structures. Microbiology. 149: 295–304.
- Beraquet, N.J., Iaderoza, M., Jardim, D.C.P. and Lindo, M.K.K., 1983. Salting of mackerel (*Scomber japonicas*) II. Comparison between brining and mixed salting in relation to quality and salt uptake, Coletaneado Instituto de Tecnologia de Alimentos, 13: 175-198
- Bertolotti M. I. y Manca E. 1986. Procesamiento y comercialización de la anchoíta (*Engraulis anchoita*). Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero. N° 5. Diciembre de 1986. Pág. 224-246
- Besteiro, I., Rodríguez, C.J., Tilve-Jar, C., Pascual, C., 2000. Selection of attributes for the sensory evaluation of anchovies during the ripening process. J. Sens. Stud. 15: 65-77
- Birkeland S., Sivertsvik M., Nielsen H. H, Skåra T. 2005. Effects of brining conditions on weight gain in herring (*Clupea harengus*) fillets. J. Food Sci. 70(7): 418–424.
- Blanch, H. W. y D. S. Clark. 1996. Biochemical Engineering. New York, Marcel Dekker Inc.
- Bourlon, X. y Caro, S. 1997. Infopesca: El Mercado del Pescado en Buenos Aires. Montevideo.
- Burt J. R., Hardy R. 1992. *Composition and deterioration of pelagic fish. En: Pelagic Fish: the Resource and its Exploitation*, Capítulo 9. Ed.: Burt, JR; Hardy, R; Whittle, KJ. Fishing News Books, Oxford, Reino Unido. pp: 115-141.

- CAA. 2017. Alimentos Cárneos y Afines. Capítulo VI. Artículo 286 tris. Código Alimentario Argentino.
- Campello F., 1985. Approche microbiologique de l'anchoítage. Revue Travaux Inst Peches Maritimes. 47,217–226
- Cardenas F. C., Giannuzzi L., Zaritzky N. E. 2007. Modelling microbial growth in meat broth with added lactic acid under refrigerated storage. International Journal of Food Science and Technology. 42: 175–184
- Carrero J. J., Martín-Bautista E., Baró L., Fonollá J. Jiménez J. Boza J. J., López-Huertas E. 2005. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. Nutr. Hosp. vol.20 no.
- Carvalho F. M., Castello J. P. 2013. Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) stock identification and incipient exploitation in southern Brazil. Lat. Am. J. Aquat. Res. 41 (5): 820-827
- Casales M. R., Yeannes M. I., Zugarramurdi A. 1992. Conservas de caballa: composición química proximal y evaluación sensorial. Alimentaria: 93-97.
- Castello J. P. 2007. Síntese sobre a anchoita (*Engraulis anchoita*) no sul do Brasil. Em A Prospecção pesqueira e abundância de estoques marinhos no Brasil nas décadas de 1960 a 1990. Levantamento de dados e avaliação crítica. Haimovici, M.(Org.) Brasília: MMA/SMCQ p. 197 - 218.
- Castro-González, MI. 2002. Ácidos grasos omega 3: beneficios y fuentes. INCI v.27 n.3
- CE. 2005. REGLAMENTO (CE) no 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea. 22/12/2005
- Chatterjee T., Majumdar D., Chakrabarti P. 2015. Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model. Biochimica et Biophysica Acta. 1850: 299–306
- Chet I. y Mitchell R. 1976. The relationship between chemical structure of attractants and chemotaxis by a marine bacterium. Can. J. Microbiol. 22:1206-1208
- Chiralt F., Fito P., Barat J., Andrés A., González-Martínez C., Escriche I., Camacho M. 2001. Use of vacuum impregnation in food salting process. J. Food Eng. 49: 141-151.

- Clote P., Backofen R. 2000. Computational molecular biology: An introduction. Paperback, John & Wiley Sons, pp 286.
- Codex Alimentarius. 2012. Code of practice for fish and fishery products. Second edition.
- Coelho A. M., Coelho A. C., Góis J., Pinto M. L., Rodrigues J. 2008. Multifactorial correspondence analysis of risk factors for sheep and goat brucellosis seroprevalence. *Small Ruminant Research*. 78 (1–3), 181–185
- Coll Cárdenas F., Giannuzzi L., Noia M.A., Zaritzky N. 2001. El modelado matemático: una herramienta útil para la industria alimenticia. *Ciencia Veterinaria*. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam
- Corzo O., Bracho N. 2008. Application of Weibull distribution model to describe the vacuum pulse osmotic dehydration of sardine sheets. *LWT* 41: 1108–1115.
- Corzo O., Bracho N., Rodríguez J. 2012. Comparison of Peleg and Azuara et al. models in the modeling mass transfer during pile salting of goat sheets. *LWT - Food Science and Technology*. 46:448-452
- Corzo O., Bracho N. 2004. Effects of brine concentration and temperature on equilibrium distribution coefficients during osmotic dehydration of sardine sheets. *LWT* 37: 475–479.
- Corzo O., Bracho N. 2007. Water effective diffusion coefficient of sardine sheets during osmotic dehydration at different brine concentrations and temperatures. *J. Food Eng.* 80 (2): 497–502.
- Crank J. 1975. *The Mathematics of Diffusion* (2da ed.). University Press. Oxford.
- Crettaz Minaglia M., Rosso L., Aranda O., Sedan D., Juárez I., Ventosi E., Andrinolo D. y Giannuzzi, L. 2017. Modelado matemático del crecimiento de *Microcystis aeruginosa* en condiciones de laboratorio bajo diferentes temperaturas. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. 130: 61–67
- Cunha L. M., Oliveira F. A. R., Oliveira J. C. 1998. Optimal experimental design for estimating the kinetic parameters of process described by the Weibull probability distribution function. *Journal of Food Engineering*. 37: 175–191.
- Cunliffe M., Kertesz M. A. (2006). Effect of *Sphingobium yanoikuyae* B1 inoculation on bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in

- aged and freshly PAH-contaminated soils. *Environmental Pollution*, Volume 144, Issue 1, Pages 228-237.
- Czerner M. 2011. Aspectos tecnológicos de la maduración de anchoíta (*Engraulis anchoita*) salada. Efecto de la composición química y otras variables tecnológicas. Universidad Nacional de La Plata. Tesis Doctoral.
- Czerner M; Yeannes M. I. (2007). Evolución de la microflora presente durante el madurado de anchoíta (*E. anchoita*). Congreso; XI Congreso Argentino de Ciencias y Tecnología de Alimentos y 2do Simposio Internacional de Nuevas Tecnologías.
- Czerner M.; Yeannes M. I. (2010). Brining kinetics of different cuts of anchovy (*Engraulis anchoita*). *Int. J. Food Sci. Technol.* 45: 2001-2007.
- Czerner M.; Yeannes M. I. 2011. Modificaciones en el ecosistema bacteriano durante el salado-madurado de anchoíta (*E. anchoita*) y participación en el proceso. Congreso; XIII Congreso de Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Czerner, M., Yeannes M. I. 2013. Modelling the effect of temperature and lipid content on anchovy (*Engraulis anchoita*) salting kinetics. *Journal of Food Engineering.* 115: 164–172.
- Czerner M., Yeannes M. I. 2014. Bacterial Contribution to Salted Anchovy (*Engraulis anchoita* Hubbs & Marinni, 1935) Ripening Process. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 23:102–114.
- CTMFM. 2017. Ficha Técnica Anchoíta. Comisión Técnica Mixta del Frente Marítimo.
- Dalgaard P. y Emborg J. (2008). Histamine fish poisoning — new information to control a common seafood safety issue. *Foodborne Pathogens*, Pages 1140-1160.
- Del Puerto C. A., Iglesias E., Morales T., Baños N., Nocedo M. D., Carnota G., Martínez R. 2009. Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. *Vaccimonitor* 18 (1).
- Di Salvo M. E. 2013. Energética y dinámica del movimiento de bacterias autopropulsadas en medios acuosos. Tesis Doctoral. FaMAF-UNC. Noviembre de 2013.
- Dunbar J., Lawrence O., Kuske, C. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene Terminal Restriction Fragment Analysis. *App. and Env. Microbiol.* 66(7):2943-2950.

- Durand P. 1981. Etude de la fraction azotée soluble de l'anchois sale en cours de maturation. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit. 45 (4), 271-281.
- Escofier B, Pagès J., 1998. Analyses factorielles simples et multiples. Dunod, Paris.
- Emborg J., Dalgaard P. (2008). Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation by *Morganella psychrotolerans*. International Journal of Food Microbiology. 128: 226–233
- Englert D. L., Jayaraman A., Manson M. D. 2009. *Microfluidic Techniques for the Analysis of Bacterial Chemotaxis*. Chapter 1. Tian Jin and Dale Hereld (Eds.), Chemotaxis, Methods in Molecular Biology, vol. 571
- Espinosa L., Varela C., Martínez E. V., Cano R. 2014. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2008-2011 (excluye brotes hídricos). Boletín Epidemiológico Semanal. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. C/ Monforte de Lemos, 5, 28029-Madrid. Volumen 22 número 11.
- FAO. 2014. La pesca y la acuicultura sostenibles para la seguridad alimentaria y la nutrición. Comité de Seguridad Alimentaria Mundial (CSA). Grupo de alto nivel de expertos en seguridad alimentaria y nutrición (HLPE). Disponible en: <http://www.fao.org/cfs/cfs-hlpe/informes/es/>
- FAO. 2011. Review of the state of world marine fishery resources. Rome, FAO.
- Fakruddin M., Mazumder R. M., Mannan K. S. B.. 2011. Predictive microbiology: Modeling microbial responses in food. Ceylon Journal of Science. 40 (2): 121-131.
- Félix, M. M.; Ramirez E. E.; Yeannes M. I. 2007. Bacterias halófilas extremas deteriorantes en anchoita salada y su vida útil. Revista de Ciencias Agrarias y de Tecnología de Alimentos. Buenos Aires. Argentina. Vol 24. ISSN impresa 1666-2016; ISSN en línea: 1668-1940.
- Félix M., Ameztoy I., Yeannes M. I. 2006. Identificación de microorganismos presentes en sal empleada para procesos de conservación de alimentos. VII Congreso. XXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. 6 y 7 de diciembre. Rosario. Santa Fe. Argentina.
- Félix, M.L., Czerner, M., Ameztoy, I.M., Ramírez, E.E., Yeannes, M.I., 2016. Investigation of *Halococcus morrhuae* in salted-ripened anchovy products. International Food Research Journal. 23 (6), 2668-2674.

- F.I.L. I.D.F. 73. 1974. Determinación de microorganismos lipolíticos de la manteca.
- Filsinger B, Sisti E, Bergamaschi N. 1987. Chemical and sensory assessments in ripened anchovies. *Int. J. Food Sci. Technol.* 22 (1): 73-76.
- Filsinger B., Zugarramurdi A., Sánchez J. J., Trucco R. E., Lupín H. M. 1978. Variaciones químicas durante la maduración de anchoíta salada. *La Alimentación Latinoamericana* 108: 26-31.
- Filsinger, B., Barassi, C.A., Lupín, H.M., Trucco, R.E., 1982. An objective index for the evaluation of the ripening of salted anchovy. *Int. J. Food Sci. Technol.* 17 (2), 193-200.
- Filsinger B. E., Barassi C. A., Lupín H. M., 1984. Formación de Nitrógeno Básico Volátil Total durante la maduración de anchoíta (*E. anchoita*). *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 24 (4): 524-528.
- Frost S. C., Blackman J. W., Ebeler S. E., Heymann H. 2018. Analysis of temporal dominance of sensation data using correspondence analysis on Merlot wine with differing maceration and cap management regimes. *Food Qual Prefer.* 64: 245–252
- Fuselli, S. R.; Casales, M. R.; Fritz, R.; Yeannes, M. I. 1998. Isolation and characterization of microorganisms associated with marinated anchovy (*Engraulis anchoíta*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, Vol. 7(3).
- Fuselli, S. R.; Casales, M. R.; Fritz, R.; Yeannes, M. I. 2003. Typical microorganisms in cold marinated anchovies (*Engraulis anchoíta*) filled with corn oil and spices. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, Vol. 12(1).
- Gallart-Jornet L., Barat J. M., Rustad T., Erikson U., Escriche I., Fito P. 2007. Influence of brine concentration on Atlantic salmon fillet salting. *J. Food Eng.* 80: 267–275.
- Giannuzzi L., Pinotti A., Zaritzky N. 1997. Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 39(1–2), 101–110.
- Gibson A. M., Bratchell N., Roberts T.A.. 1987. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *Journal of Applied Bacteriology* 62: 479-490
- Gibson A. M., Bratchell N., Roberts T.A.. 1988. Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology.* 6: 155-178

- Geisen R., Lücke F. K., Kröckel, L., 1992. Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtschaft*, 72, 894–898
- Gómez-Salazar J. A., Clemente-Polo G., Sanjuán-Pelliccer N. 2015. Review of mathematical models to describe the food salting process. *DYNA* 82 (190):. 23-30.
- González-Hernández J. C., Peña A. 2002. Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 44(3-4): 137-156.
- González Martínez M. T. 2013. Evaluación del desarrollo de aminas biógenas en queso chihuahua durante la vida de anaquel. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis Doctoral.
- Gotelli N. J., Colwell R. K. 2001. Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters*. 4:379-391.
- Gram, L., Dalgaard, P., 2002. Fish spoilage bacteria – problems and solutions. *Curr Opin Biotechnol*. 13, 262–266.
- Gram, L. y Huss, H. H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International J. of Food Microbiol*. 33,121-137.
- Graiver N., Pinotti A., Califano A. y Zaritzky N. 2006. Diffusion of sodium chloride in pork tissue. *Journal of Food Engineering*, 77: 910–918.
- Graiver N., Pinotti A., Califano A., Zaritzky N. 2009. Mathematical modeling of the uptake of curing salts in pork meat. *Journal of Food Engineering*. 95: 533–540
- Guillen Velasco S. 1997. Producción de histamina en escómbridos. Universidad Autónoma Metropolitana. México
- Gutiérrez JB. 2008. Jamón curado: Aspectos científicos y tecnológicos. Ediciones Díaz de Santos, S.A.
- Hamm R. 1986. *Functional Properties of the Myofibrillar System and Their Measurements*. Capítulo 4. Muscle as food. Academic Press, Inc.
- Hamm R. 1961. *Biochemistry of meat hydration*. En: Chichester, CO; Mrak, EM (Eds.), *Advances in Food Research*, Vol 10. Academic Press, Pp: 355-463.
- Hansen J. E. 2000. Anchoíta (*Engraulis anchoita*). *Pesquerías de Argentina*, 1997-1999. Pag. 205-2016.

- Hansen, J. E.; Garciarena, A. D. 2004. Diagnóstico de la población de anchoita (*Engraulis anchoita*) al norte de los 41° S y estimación de capturas biológicamente aceptables durante el año 2004. Informe Técnico Interno INIDEP 15/04.
- Hernández-Herrero M.M., Roig-Sagués A.X., López-Sabater E. I., Rodríguez-Jerez J.J., Mora-Ventura M.T., 1999a. Total Volatile Basic Nitrogen and another physico-chemical and microbiological characteristics as related to ripening of salted anchovies. *J. Food Sc.* 67 (2), 2631-2640.
- Hernández-Herrero M. M., Roig-Sagués A. X., López-Sabater E. I., Rodríguez Jerez J. J., Mora-Ventura, M. T. 1999b. Protein hydrolysis and proteinase activity during the ripening of salted anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.). A microassay method for determining the protein hydrolysis. *J. Agric. Food Chem.* 47 (8): 3319-3324.
- Hernández-Herrero M. M., Roig-Sagués A. X., Rodríguez-Jerez J. J., Mora-Ventura M. T. 1999c. Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *J. Food Prot.* 62 (5): 509-514.
- Herrera Seitz K. y Studdert C. 2008. Quimiotaxis y otras yerbas... microorganismos en busca de un ambiente favorable. *Ciencia hoy.* 18 (105): 35-43.
- Holt J.G. 1989. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. III, Sec. 25, Archaeobacteria (pp. 2171-2233). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Hozbor MC; Saiz AI; Yeannes MI; Fritz R. Microbiological changes and its correlation with quality physicochemical indexes during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science and Technology.*: Elsevier. 2006. vol.39 n°. p99 - 104. issn 0023-6438.
- Hugas M., Monfort J. M. 1997. Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chem.* 59 (4): 547-554.
- Huss H. H., Valdimarson G. 1990. *Microbiology of salted fish*. Fish Tech News. Vol. 10. N°1. Pg: 3-5.
- Huang K., Tian H., Gai L., Wang J. 2012. A review of kinetic models for inactivating microorganisms and enzymes by pulsed electric field processing. *Journal of Food Engineering* .111: 191-207
- Huss H. H. 1994. Assurance of Seafood Quality. FAO Fisheries Technical Paper N° 334. FAO. Rome.

- Huss H. H. 1999. El Pescado Fresco: Su Calidad y Cambios de su Calidad. Documento técnico de pesca 348. FAO.
- Huss H. H., Reilly A., Karim Ben Embarek P. 2000. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control* 11: 149-156.
- ICMSF. 1981. *Microorganismos de los alimentos. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: Principios y aplicaciones específicas*. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- ICMSF. 1983. *Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológico*. Volume I. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Ienistea C. 1973. Significance and detection of histamine in food. *The Microbiological Safety of Food*. Academic Press, N. Y.
- IRAM. 1988. Instituto Argentino de Normalización y Certificación - IRAM 15.139. Productos de la Industria Pesquera: Método para la determinación de microorganismos halófilos extremos. Buenos Aires.
- ISO. 1991. Microbiology -- General guidance for the detection of Enterobacteriaceae with pre-enrichment. 8523:1991.
- Jiang W., Li C., Xu B., Dong X., Ma N., Yu J., Wang D., Xu Y. 2014. *Halomonas shantousis* sp. nov., a novel biogenic amines degrading bacterium isolated from Chinese fermented fish sauce. *Antonie van Leeuwenhoek*. 106:1073-1080
- Jung J. Y., Lee H. J., Chun B. H., Jeon C. O. 2016. Effects of temperature on bacterial communities and metabolites during fermentation of myeolchi-aekjeot, a traditional korean fermented anchovy sauce. *PLoS ONE* 11(3): e0151351.
- Kim J. H., Ahn H. J.; Jo C., Park H. J., Chung Y. J., Byun M. W. 2004. Radiolysis of biogenic amines in model system by gamma irradiation. *Food Control*; 15:405–8.
- Kinosita Y, Kikuchi Y., Mikami N., Nakane D. Nishizaka T. 2017. Unforeseen swimming and gliding mode of an insect gut symbiont, *Burkholderia* sp. RPE64, with wrapping of the flagella around its cell body. *The ISME Journal*.
- Kirk R., Sawyer, R., Egan, H. (1996). *Composición y Análisis de Alimentos de Pearson*, 2<sup>da</sup> edición. México: Editorial Continental S.A.
- Kudrats J., Money A., Hair Jr. J. F., 2014. Correspondence analysis: A promising technique to interpret qualitative data in family business research. *JFBS*. 5 (1), 30–40.

- Lauritzsen K., Akse L., Johansen A., Joensen S., Sørensen N. K., Olsen R. L. 2004. Physical and quality attributes of salted cod (*Gadus morhua* L.) as affected by the state of rigor and freezing prior to salting. *Food Res. Int.* 37: 677–688.
- Larsen H. 1986. Halophilic and halotolerant microorganisms-an overview and historical perspective. *FEMS Microbiology Reviews* 39: 3-73
- Lebart L., Morineau A., Piron M., 1995. *Statistique exploratoire multidimensionnelle*. Dunod, Paris.
- Lee Y. C., Lin C. S., Liu F. L., Huang T. C., Tsai Y. H. 2015. Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. *Journal of food and drug analysis* 23: 836-844
- Lee Y. C., Kung H. F., Huang C. Y., Huang T. C., Tsai Y. H. 2016. Reduction of histamine and biogenic amines during salted fish fermentation by *Bacillus polymyxa* as a starter culture. *Journal of food and drug analysis* 24: 157-163.
- Lee J. G., Choe W. K. 1974. Studies on the variation of microflora during the fermentation of anchovy, *Engraulis japonica*. *Bull. Korean Fish. Soc.* 7(3):105-114.
- Leuschner R. G., Heidel M., Hammes W. P., Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 39:1–10.
- Linton R. H., Carter W. H., Pierson M. D., Hackney C. R., Eifert J. D. 1996. Use of a modified Gompertz equation to predict the effects of temperature, pH, and NaCl on the inactivation of *Listeria monocytogenes* scott a heated in infant formula. *Journal of Food Protection*. 59(1): 16-23
- López-Sabater E. I., Rodríguez-Jerez J. J., Hernández-Herrero M., Mora-Ventura M. T. 1996. Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area. *International Journal of Food Microbiology*. 28: 411-418
- López S., Prietob M., Dijkstrac J., Dhanoad M.S., Francee J.. 2004. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *International Journal of Food Microbiology* 96 (2004) 289 – 300
- Lupín H. M., Boeri R. L., and Moschiar S. M. 1981. Water activity and salt content relationship in moist salted fish products. *J. Fd Technol.* 16: 31-38

- Lupín H. M.; Trucco R. E. 1978. Variación del contenido de nitrógeno básico volátil (NBV) durante el procesamiento de pescado salado y conservas. INTI-Mar del Plata Boletín. Cámara Marplatense de Industriales del Pescado. (93):1-5.
- Lupín H. M. 1979. Curso sobre tecnología de elaboración de productos pesqueros. Ed. Publitec SA. 150 p.
- Mafart P., Couvert O., Gaillard S., Leguerinel I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*. 72 (1–2): 107-113.
- Marx R. B. y Aitken M. D. 1999. Quantification of chemotaxis to Naphthalene by *Pseudomonas putida* G7. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:7:2847-2852.
- Massa A, Fernandez Compas A, Pennisi Farrell C y Manca E. 2013. Composición química y perfil de ácidos grasos de la anchoíta bonaerense en función del tamaño de los ejemplares y la zona de pesca. *Rev. Invest. Desarr. Pesq.* No 23: 161-174
- Massa A., Yeannes M. I., Manca E. 2007. Ácidos grasos poliinsaturados de la serie Omega - 3 en ejemplares bonaerenses y patagónicos de anchoíta argentina. *A&G* 66. Tomo XVII (1): 568-572
- Massa A., Yeannes M. I., Manca E. **2012**. Development of Quality Index Method (QIM) for anchovy (*Engraulis anchoita*) stored in ice. Assessment of its shelf life by chemical and sensory methods *Food Science and Technology International*. 18 (4): 339-351.
- Mateus T., Santo D., Saúde C., Pires-Cabral P., Quintas C. 2016. The effect of NaCl reduction in the microbiological quality of cracked green table olives of the Maçanilha Algarvia cultivar. *International Journal of Food Microbiology*. 218: 57-65.
- Mattos Avallone S., Rodríguez Servetti J. O., Torreión Strdube E. 1976. Estudio sobre la utilización de la anchoíta (*Engraulis anchoita*) en la fabricación de anchoíta. Monografía tecnológicas. Serie Pesca. Laboratorio Tecnológico del Uruguay. Ministerio de Industria y Energía.
- Mc Faddin J. F. 1980. Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de importancia clínica. Médica Panamericana. Buenos Aires.
- McBride M. J. 2001. Bacterial gliding motility: multiple mechanisms for cell Movement over Surfaces. *Annual Review of Microbiology*. 55: 49-75

- McKellar R. C., Lu X., Delaquis P. J. 2002. A probability model describing the interface between survival and death of *Escherichia coli* O157:H7 in a mayonnaise model system. *Food Microbiology*. 19: 235-247.
- McMeekin T., Olley J., Ross T., Ratkowsky D. 1993. Basic concepts and methods. In *Predictive microbiology: theory and application*. Research Studies Press LTD (pp. 11-84). Taunton, England.
- Meseguer Soria, I. 2004. Los microorganismos halófilos y su potencial aplicado en biotecnología. *Ciencia e Investigación*. VII (2): 13-17
- Mignot T., Shaevitz J. W., Hartzell P. L. y Zusman D.R. 2007. Evidence That Focal Adhesion Complexes Power Bacterial Gliding Motility. *Science*. 315 (5813) 853-856
- Monod J. 1949. The growth of bacterial cultures. *Annual Review on Microbiology*, 3:371-394.
- Monod J. 1950. La Technique de culture continue theorie et applications. *Annales L'Intitute Pasteur*. 79:390-410.
- Moreno M. de L., García M. T., Ventosa A. y Mellado E. 2009. Characterization of *Salicola* sp. IC10, a lipase- and protease producing extreme halophile. *FEMS Microbiol Ecol* 68: 59–71
- Mossel D. A. A., Moreno-García B., Struijk C. B. 2003. *Microbiología de los Alimentos*. 2ª ed. Acribia, Zaragoza, p 518, 620.
- Murialdo S. E., Sendra G. H., Passoni L. I., Arizaga R., Gonzalez J. F., Rabal H., Trivi M. 2009. Analysis of bacterial chemotactic response using Dynamic Laser Speckle. *Journal of Biomedical Optics* 14(6): 064015-1-6. ISSN: 1083-3668, OCLC: 32795913.
- Musmeci, J.C. 2001. Efecto de la inoculación de un cultivo de *Micrococcus halobius* en la maduración de *Engraulis anchoita* salada. Tesis de grado. FCEyN, UNMDP. 30/10/2001.
- Nei D. 2014. Evaluation of Non-bacterial factors contributing to histamine accumulation in fish fillets. *Food Control* 35: 142-145
- Nisenbaum N., Bouchet A., Guzmán M., González J. F., Sendra G. H., Pastore J., Trivi M., Murialdo S. E. 2013a. Dynamic laser speckle and fuzzy mathematical morphology applied to studies of chemotaxis towards hydrocarbons. *International Journal of Environment and Health*. 7 (1): 58-69.

- Nisenbaum N., Sendra G. H., Cerdá Gulbert G. A., Scagliola M., González J. F., Murialdo S. E. 2013b. Hydrocarbon biodegradation and dynamic laser speckle for detecting chemotactic responses at low bacterial concentration. *Journal of Environmental Sciences*. 25(3): 613-625
- Nisenbaum M., Maldonado E., Martínez Arca J., González J. F., Passoni L. I., Murialdo S. E. 2016. Video processing analysis for the determination and evaluation of the chemotactic response in bacterial populations. *Journal of Microbiological Methods*. 127: 143 - 153
- Niven C. F. Jr., Jeffrey M. B., Corlett D. A. Jr. (1981). Differential Plating Medium for Quantitative Detection of Histamine-Producing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 321-322 Vol. 41, No. 1.
- Nguyen M. V., Arason S., Thorarinsdottir K. A., Thorkelsson G, Gudmundsdóttir A. 2010. Influence of salt concentration on the salting kinetics of cod loin (*Gadus morhua*) during brine salting. *Journal of Food Engineering* 100: 225–231
- Ochoa-Martínez C. I. y Ayala-Aponte A. (2005). Modelos matemáticos de transferencia de masa en deshidratación osmótica, *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4:5, 330-342
- Onishi H., Fuchi H., Konomi K, Hidaka O., Kamekura M. 1979. Isolation and distribution of a variety of halophilic bacteria and their classification by salt-response, *Agric Biol Chem*. 44(6): 1253-1258
- Oren A. 2013. *Salinibacter*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. *FEMS Microbiol Lett*. 342(1):1-9
- OriginLab, 2017. Regression and Curve Fitting. OriginLab Corporation. Disponible en: <https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/Regression-Curve-Fitting>
- Pandley G. y R. K. Jain. (2002). Minireviews. Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:5789-5795.
- Parales R. E. y Harwood C. S. (2002). Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 5:266-273.
- Paredi M. E., Yeannes M. I. (1987). Histamina en Productos Pesqueros. *Revista de Ciencias Agrarias*. Argentina. Vol. 8, N° 1-2, enero-junio.

- Pastous Madureira L. S., Castello J. P., Prentice-Hernandez C., Queiros M. I., Espitito Santo M. L., Ruiz W. A., Raggi Abdallah P., Hansen J., Bertolotti M. I., Manca E., Yeannes M., Avadalov N. and Fernandez Amorin S. 2009. Capítulo: Current and potential alternate food uses of the Argentine anchoita (*Engraulis anchoita*) in Argentina, Uruguay and Brazil Libro: Fish as feed inputs for aquaculture. Practices, sustainability and implications Edited by: Mohammad R. Hasan and Matthias Halwart. Roma. Italia. Food and Agriculture Organization of the United Nations *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*. No. 518. Rome. ISBN 978-92-5-106419-1.Pg 269-289.libro 371.
- Paul D., R. Sing y R.K. Jain. (2006). Chemotaxis of *Ralstonia* sp. SJ98 towards p-nitrophenol in soil. *Environmental Microbiology*, 8(10):1797-1804
- Peleg M. 1988. An empirical model for the description of moisture sorption curves. *J. Food Sc.* 53 (4): 1216–1219.
- Peleg M., Cole MB. 1998. Reinterpretation of Microbial Survival Curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38:5, 353-380
- Pierson M y Smoot L. 2001. Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. *Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers*. 2nd ed. Doyle M.
- Pons-Sánchez-Cascado S. 2005. Estudio de alternativas para la evaluación de la frescura y la calidad del boquerón (*Engraulis encrasicolus*) y sus derivados. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universitat de Barcelona. Barcelona.
- Pons-Sánchez-Cascado, S., Veciana-Nogués, M.T., Bover-Cid, S., Mariné-Font, A., Vidal-Carou, M.C., 2005. Volatile and biogenic amines, microbiological counts, and bacterial amino acid decarboxylase activity through the saltripping process of anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *J. Food Prot.* 68 (8), 1683-1689.
- Possas A., Pérez-Rodríguez F., Valero A., García-Gimeno R. M.. 2017. Modelling the inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure processing in foods: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 70: 45–55
- Putnik P., Roohinejad S., Greiner R, Granato D, Bekhit A. E. A., Bursac Kovačević D. 2017. Prediction and modelling of microbial growth in minimally processed fresh-cut apples packaged in a modified atmosphere: A review. *Food Control*.

- R Development Core Team. (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>
- Ramette A. 2007. Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol.* 62, 142–160
- Ramírez E. E., Ameztoy I., Yeannes M. I. 1994. Bacterias halófilas como formadoras de histamina. Proceedings: VI Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1er. Encuentro de Técnicos de Alimentos del Cono Sur. 6 al 9 de abril. Centro Cultural San Martín. Buenos Aires. Argentina.
- Ramírez N., Sandoval A. H. y Serrano J. A. 2004. Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* v.24 n.1-2
- Ramírez E. E., Yeannes M. I., Czerner M. 2012. Suplemento Técnico Veterinario de la Revista del Colegio de Veterinarios de la provincia de Buenos Aires, Vol 50: 57-62. Editorial: Galtprinting, La Plata, Argentina.
- Roh SW, Kim KH, Nam YD, Chang HW, Park EJ, Bae JW. 2009. Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing. *ISME J*; 4(1):1-16.
- Roldán H., Barassi C., Trucco R. 1985. Increase on free fatty acids during ripening of anchovies (*E. anchoita*). *J. Food Technol.* 20: 581-585.
- Schmidt F.C., Carciofi B.A.M., Laurindo J.B. 2009. Application of diffusive and empirical models to hydration, dehydration and salt gain during osmotic treatment of chicken breast cuts. *Journal of Food Engineering* 91: 553–559
- Shannon, C.E. 1948 A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*, 27, 379–423.
- Sehgal S. N. y Gibbons N. E. 1960. Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol.* 6: 165-169
- Sendra H., Murialdo S., Passoni L. I. (2007). Dynamic laser speckle to detect motile bacterial response of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Physics*: ISSN 1742-6588 (Print) ISSN 1742-6596 (Online) 90 (2007) 012064 doi:10.1088/1742-6596/90/1/012064.

- Smid E. J. and Lacroix C. 2013. Microbe–microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology* 2013, 24:148–154.
- Schmidt F. C., Carciofi B. A. M., Laurindo J. B. 2009. Application of diffusive and empirical models to hydration, dehydration and salt gain during osmotic treatment of chicken breast cuts. *J. Food Eng.* 91(4): 553-559.
- Soares Costa P., Correia Santos N., Cunha P., Cotter J., Sousa N. 2013. The use of Multiple Correspondence Analysis to explore associations between categories of qualitative variables in healthy ageing. *Journal of Aging Research*. Volume 2013, Article ID 302163, 12 pages.
- Stanbury P. F., Whitaker A., Hall S. 1995. *Principles of fermentation technology*. 2da ed. Butterworth Heinemann. Gran Bretaña.
- Steffánson, G., Guðmundsdóttir G., 1995. Free amino acids and their relationship to taste in (salt) ripened pelagic fish species. Rf Report 91, Icelandic Fish Laboratories.
- Tabanelli G., Montanari C., Bargossi E., Lanciotti R., Gatto V., Felis G., Torriani S., Gardini F. (2014). Control of tyramine and histamine accumulation by lactic acid bacteria using bacteriocin forming lactococci. *International Journal of Food Microbiology*. 190: 14–23
- Talon R., Leroy S. 2014. *Fermented Meat Products and the Role of Starter Cultures*. Elsevier Ltd. INRA, Saint-Genès Champanelle.
- Tapingkae W., Tanasupawat S., Parkin K. L., Benjakul S., Visessanguan W. 2010. Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products. *Enzyme and Microbial Technology*. 46: 92–99
- Tellinghuisen J., Bolster C. H. 2011. Using  $R^2$  to compare least-squares fit models: When it must fail. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 105 (2): 220-222
- Tomac A., Mascheroni R. H., Yerannes M. I. 2013. Modelling the effect of gamma irradiation on the inactivation and growth kinetics of psychrotrophic bacteria in squid rings during refrigerated storage. Shelf-life predictions. *Journal of Food Engineering* 117: 211–216
- Torres V., Barbosa I., Meyer R., Noda A., Sarduy L. 2012. Criterios de bondad de ajuste en la selección de modelos no lineales en la descripción de comportamientos biológicos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 46 (4): 345-350

- Tosukhowong A., Visessanguan W., Pumpuang L., Tepkasikul P., Panya A., Valyasevi R. 2011. Biogenic amine formation in Nham, a Thai fermented sausage, and the reduction by commercial starter culture, *Lactobacillus plantarum* BCC 9546. Food Chemistry. 129: 846–853.
- Triqui, R; Reineccius, G. A. 1995a. Flavor development in the ripening of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.). J. Agric. Food Chem. 43 (2): 453-458
- Triqui, R; Reineccius, GA. 1995b. Changes in Flavor Profiles with Ripening of Anchovy (*Engraulis encrasicolus*). J. Agric. Food Chem. 43: 1883-1889
- Ventosa A., Nieto J. J., Oren A. 1998. Biology of Moderately Halophilic Aerobic Bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62 (2): 504-544.
- Vergaray G., Méndez C. R., Morante H. Y., Heredia V. I. y Béjar V. R. 2007. *Enterococcus* y *Escherichia coli* como indicadores de contaminación fecal en playas costeras de Lima. Revista del Instituto de Investigaciones FIGMMG. 10, N° 20: 82-86.
- Villar, M., Ruiz Holgado, A., Sanchez, J., Trucco, R., Oliver, G., 1985. Isolation and characterization of *Pediococcus halophilus* from salted anchovies (*Engraulis anchoita*). Appl. Environ. Microbiol. 49 (3), 664-666
- Voskresensky, N. A., 1965. Salting of herring. En Fish as Food, Vol III. Ed.: Borgstrom, G. Academic Press, Londres. pp. 107-131.
- Wacher Rodarte M. C. 2012. Ventajas del uso de Cocultivos en Biotecnología. BioTecnología, Vol. 16 No. 1.
- Wang Y., Wu Y., Wang Y, Xu H., Mei X., Yu D., Wang Y. y Li W. 2017. Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. Nutrients 9(5): 521
- Wolfe A. J. y Berg H. C. 1989. Migration of bacteria in semisolid agar. Proc. Natl. Acad. Sci. Biophysics. 86: 6973-6977
- Xiong R., Xie G., Edmondson A. S., Linton R. H., Sheard M. 1999. Comparison of the Baranyi model with the modified Gompertz equation for modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A. Food Microbiology: 16: 269-279
- Yeannes M. I. 1995. Histamina en alimentos. En Capítulo VII: Tóxicos Marinos. Libro: Toxicología de los alimentos. Coordinador: A. Silvestre. Editorial Hemisferio Sur S. A. Buenos Aires. Argentina. Octubre de 1995.

- Yeannes, M. I. 2006. Tecnología de Productos Pesqueros. En Módulo: Tecnologías de procesamiento de los alimentos. Carrera de Especialización en Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad nacional de Buenos Aires.
- Yeannes, M. I. 2013. Preservas de Productos Pesqueros. En: Curso de Post grado: Calidad y Tecnología de los Productos Pesqueros. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Yeannes M. I., Ramirez E. E., Lupín H. 2006. Incidencia de hongos halófilos en anchoíta (*Engraulis anchoita*) salada. X Taller Internacional sobre Calidad Sanitaria, Evaluación y Comercialización de Alimentos. Varadero. Cuba.
- Yongmei L., Xiaohong C., Mei J., Xin L., Rahman N., Mingsheng D., Yan G. 2009. Biogenic amines in Chinese soy sauce. *Food Control*, 20: 593–597
- Yoon S. H., Ha S. M., Kwon S., Lim J., Kim Y, Seo H., Chun J. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67:1613–1617
- Yu H. S., Alam M. 1997. An agarose-in-plug bridge method to study chemotaxis in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *FEMS Microbiology Letters*, 156:265-269.
- Yu X., Zhao M., Hu J., Zeng S., Bai X., 2012. Correspondence analysis of antioxidant activity and UV–Vis absorbance of Maillard reaction products as related to reactants. *LWT - Food Science and Technology*. 46 (1): 1–9
- Zaman M. Z., Bakar F. A., Selamat J., Bakar J., Ang S. S., Chong C. Y. 2014. Degradation of histamine by the halotolerant *Staphylococcus carnosus* FS19 isolate obtained from fish sauce. *Food Control* 40: 58-63
- Zugarramurdi A., Lupín H. M. 1977. Studies on anchovy salting. II. Dynamics of the process. *Latin-American Journal of Chemical Engineering and Applied Chemistry*, 7: 25–38.
- Zugarramurdi A., Lupín H. M. 1980. A model to explain observed behavior of fish salting. *J. Food Sc.* 45 (5): 1305-1317.
- Zwietering M. H., Jongenburger I., Rombouts F.M., Van Riet K., 1990. Modelling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ Microbiol.* 56, 1875–1881.