

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**Efecto Antagonista de la Cepa *Carnobacterium piscicola* sobre *Listeria monocytogenes* en Salmón Ahumado en Frío**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Ciencias de los Alimentos.

**Jeanette Paola Velázquez Mansilla**

VALDIVIA-CHILE

2006

## **PROFESOR PATROCINANTE**

Renate Schöbitz Twele  
Tecnólogo Médico , M. Sc.  
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos  
Facultad de Ciencias Agrarias

---

## **PROFESORES INFORMANTES**

Luz Haydée Molina  
Profesora de Biología y Química  
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos  
Facultad de Ciencias Agrarias

---

Wilhelm Heimlich Mimica  
Químico  
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos  
Facultad de Ciencias Agrarias

---

## ÍNDICE DE MATERIAS

Capítulo	Página
1      INTRODUCCIÓN	1
2      REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1    Bacterias Ácido Lácticas ( BAL )	3
2.2 <i>Listeria</i> spp	7
2.3    Parámetros que definen la calidad del salmón	9
2.3.1   Salmón ahumado	13
2.3.2   Presencia de <i>L. monocytogenes</i> en la industria salmonera	15
2.4    Medidas para la prevención de la contaminación con <i>L. monocytogenes</i> en la industria del salmón ahumado	16
2.4.1   Uso de preservantes	17
2.4.2   Bioprotección mediante el uso de BAL	18
2.4.3   Bioprotección por bacteriocinas	20
2.5    Calidad sensorial del salmón	22
3      MATERIAL Y MÉTODO	24
3.1    Material	24
3.1.1   Cepas bacterianas y medios de cultivo	24
3.1.2   Sustrato para la inoculación de las cepas	24
3.1.3   Bolsas utilizadas para envasar los trozos de salmón ahumado en frío al vacío	25
3.2    Estudio del efecto antagonista de la cepa <i>C. piscicola</i> L103 en contra de <i>L. monocytogenes</i> L4/00, inoculadas sobre filetes de	25

	salmón ahumado en frío	
3.2.1	Etapas preliminares del estudio	25
3.2.2	Preparación del salmón para su inoculación	26
3.2.3	Preparación de las cepas	26
3.2.4	Procedimiento de inoculación del salmón	27
3.2.5	Envasado y almacenamiento de los trozos de salmón	28
3.2.6	Análisis microbiológico y frecuencia de muestreos	28
3.2.7	Mediciones de pH en los trozos de salmón	29
3.3	Estudio del efecto del crecimiento de <i>C. piscicola</i> L103 sobre las características organolépticas del salmón ahumado en frío	29
3.3.1	Selección de panelistas	29
3.3.2	Tratamientos evaluados	30
3.3.3	Atributos evaluados en el panel	30
3.3.4	Preparación de las muestras para el panel sensorial	30
3.4	Análisis estadístico	31
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	32
4.1	Estudio del efecto antagonista de la cepa láctica <i>C. piscicola</i> en contra de <i>L. monocytogenes</i> inoculada sobre trozos de salmón ahumado en frío	32
4.2	Evaluación sensorial	42
5	CONCLUSIONES	47
6	RESUMEN	48
	SUMMARY	49
7	BIBLIOGRAFÍA	50

ANEXOS

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura		Página
1	Fermentación láctica homofermentativa	4
2	Fermentación láctica heterofermentativa	6
3	Cambios bioquímicos en los músculos de pescados después de la muerte	11
4	Tinción de Gram de <i>L. monocytogenes</i> L4/00 y de <i>C. piscicola</i> L103, observadas bajo el microscopio (aumento 100x)	32
5	Recuento de BAL ( $\log \text{ufc/cm}^2$ ) en trozos de salmón ahumado en frío, almacenados durante 21 días	34
6	Recuento de <i>Listeria</i> ( $\log \text{ufc/cm}^2$ ) en trozos de salmón ahumado en frío, almacenados durante 21 días	37
7	Mediciones de pH en trozos de salmón ahumado en frío, almacenados durante 21 días	40
8	Calificaciones promedio de 8 panelistas, para cada atributo de olor en estudio	43
9	Calificaciones promedio de 8 panelistas, para los atributos de firmeza y aceptación	44

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Composición del medio de cultivo D-MRS y Soya Tripticasa (ST)	62
2	Estandarización de la cepa <i>C. piscicola</i> L103	63
3	Determinación de la actividad de la bacteriocina producida por <i>C. piscicola</i> L103	64
4	Área de los trozos de salmón ahumado en frío, utilizados para los recuentos microbiológicos del experimento 2	66
5	Ficha de evaluación sensorial	67
6	Recuento de BAL (log ufc/cm <sup>2</sup> ) en los trozos de salmón ahumado en frío de los dos experimentos	69
7	Recuento de <i>L. monocytogenes</i> (log ufc/cm <sup>2</sup> ) en los trozos de salmón ahumado en frío de los dos experimentos	76
8	Valores de pH en las muestras de salmón ahumado en frío	84
9	Calificaciones promedio obtenidas de la evaluación sensorial de salmón ahumado en frío, para cada atributo en ambos paneles sensoriales	88

*El presente es solo lo que tienes, el día de mañana no sabes si lo tendrás. El pasado ya se fue, no te pertenece. No dejes para más tarde la obra que tienes entre manos. Los que viven esperando esforzarse después... no llegan nunca a ser nada.*

*Luis Actis*



## AGRADECIMIENTOS

*Deseo agradecer de todo corazón a mi familia, a Héctor mi mejor amigo y pololo, a mis amigos, a calle Gálvez 550 y 550-B donde se halla mi segunda familia “mi familia valdiviana”, por el amor y apoyo brindado durante todos éstos años de estudio.*

*Igualmente quisiera agradecer muy especialmente a la profesora Patrocinante de este estudio Sra. Renate Schöbitz por su apoyo, confianza y comprensión. Además a quienes aportaron para que esto fuera posible, los profesores informantes Sra. Luz Haydé, Sr. Wilhelm Heimlich, al mismo tiempo a quienes me ayudaron y aportaron con un granito Sra. Mariela, Sra. Sade, Don José, Don Tito.*

Por último quiero agradecer a Ventisqueros S.A. por haberme facilitado el material fundamental para el desarrollo de este estudio como fueron los filetes de salmón ahumado en frío.

*A todo ellos...Muchas gracias.*

## 1. INTRODUCCIÓN

En la última década, se ha podido observar como en Chile la industria del salmón ha incrementado considerablemente la elaboración de productos con valor agregado. Es así como hoy se exportan desde Chile gran variedad de este tipo de productos, entre los cuales se puede encontrar filetes frescos y congelados, salmón ahumado, salados y en conservas. Este sostenido aumento en la elaboración de estos productos con valor agregado explica los mayores retornos de las exportaciones de salmónidos de la industria chilena, dentro de los cuales destacan los productos ahumados.

El salmón ahumado en frío es un producto ligeramente preservado, lo que puede significar un alto riesgo para la salud, especialmente por la presencia de *Listeria monocytogenes*, patógeno aislado con frecuencia de productos del mar, frescos, congelados y “listos para servir”, implicado epidemiológicamente en casos de listeriosis asociadas a estos productos.

El aumento en la producción y exportación de salmón ahumado, ha obligado a las empresas elaboradoras a implementar sistemas que aseguren su inocuidad, la conservación del producto y el cumplimiento de estándares internacionales, sin perjuicio de los requerimientos de los consumidores que prefieren cada vez más los productos libres de conservantes químicos y que sean microbiológicamente seguros. Para ello una innovadora forma de cumplir con estos estándares en salmón ahumado en frío, sería el uso de bioprotectores como *Carnobacterium piscicola* para evitar así el riesgo de la presencia de *L. monocytogenes* en este tipo de productos, cumpliendo de ésta manera en forma eficaz con los requerimientos de los principales mercados de destino de las exportaciones de salmón y trucha.

### **Objetivo general**

Estudiar la capacidad antagonista de una bacteria ácido láctica sobre *Listeria monocytogenes*, inoculada en filetes de salmón ahumado en frío, envasados al vacío y determinar el efecto del desarrollo de la cepa láctica sobre las características sensoriales de este pescado.

### **Objetivos específicos**

- Determinar la capacidad de inhibición de *Carnobacterium piscicola* L103 en contra de *Listeria monocytogenes* L4/00, inoculada sobre filetes de salmón ahumado.
- Evaluar el efecto del crecimiento de *Carnobacterium piscicola* L103 sobre las características sensoriales de olor y textura en el salmón ahumado.

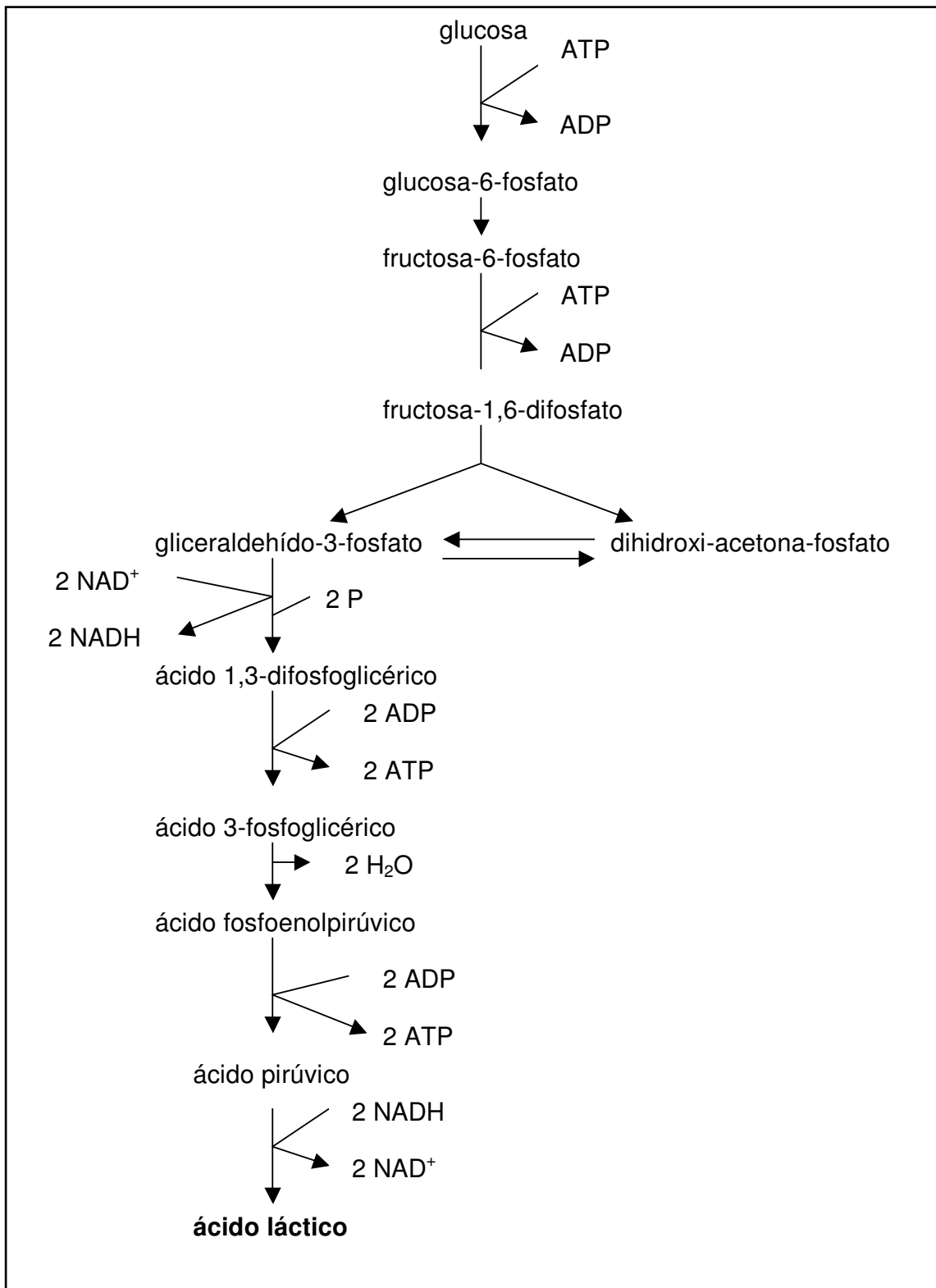
## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las BAL corresponden a bacterias Gram positivas, no formadoras de esporas, anaerobias aerotolerantes, a las cuales les falta citocromo y porfirina, siendo por consiguiente catalasa y oxidasa negativa (ADAMS y MOSS, 2000). Son inmóviles, de forma bacilar o esférica, comúnmente ordenadas en pares o en cadenas (STANIER **et al.**, 1996). Generalmente son mesófilas, pero se pueden desarrollar a temperaturas bajas como 5 °C o a altas como 45 °C. La mayoría de las cepas crecen entre un pH 4,0 a 4,5, pero también existen algunas que son activas a pH 9,6 y otras a pH 3,2 (CAPLICE y FITZGERALD, 1999).

Dentro de las BAL se describen siete géneros: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Enterococcus*. También se distinguen dos grandes grupos, basados en los productos finales de la fermentación de la glucosa como son las BAL homofermentativas (FIGURA 1) que tienen como único o principal producto final al ácido láctico y las BAL heterofermentativas (FIGURA 2), que producen otros productos, en particular ácido láctico, CO<sub>2</sub> y etanol (JAY, 1992; MADIGAN **et al.**, 1998).

En general estas bacterias son débilmente proteolíticas y lipolíticas y requieren para su desarrollo de la presencia de aminoácidos, purinas y pirimidinas y vitamina B (CAPLICE y FITZGERALD, 1999). A consecuencia de sus complejos requerimientos nutricionales, las BAL se cultivan usualmente en medios que contienen peptona, extracto de levadura u otros hidrolizados de materiales vegetales o animales. Estos medios deben suplementarse con un azúcar fermentable para proporcionar una fuente de energía (STANIER **et al.**, 1996).



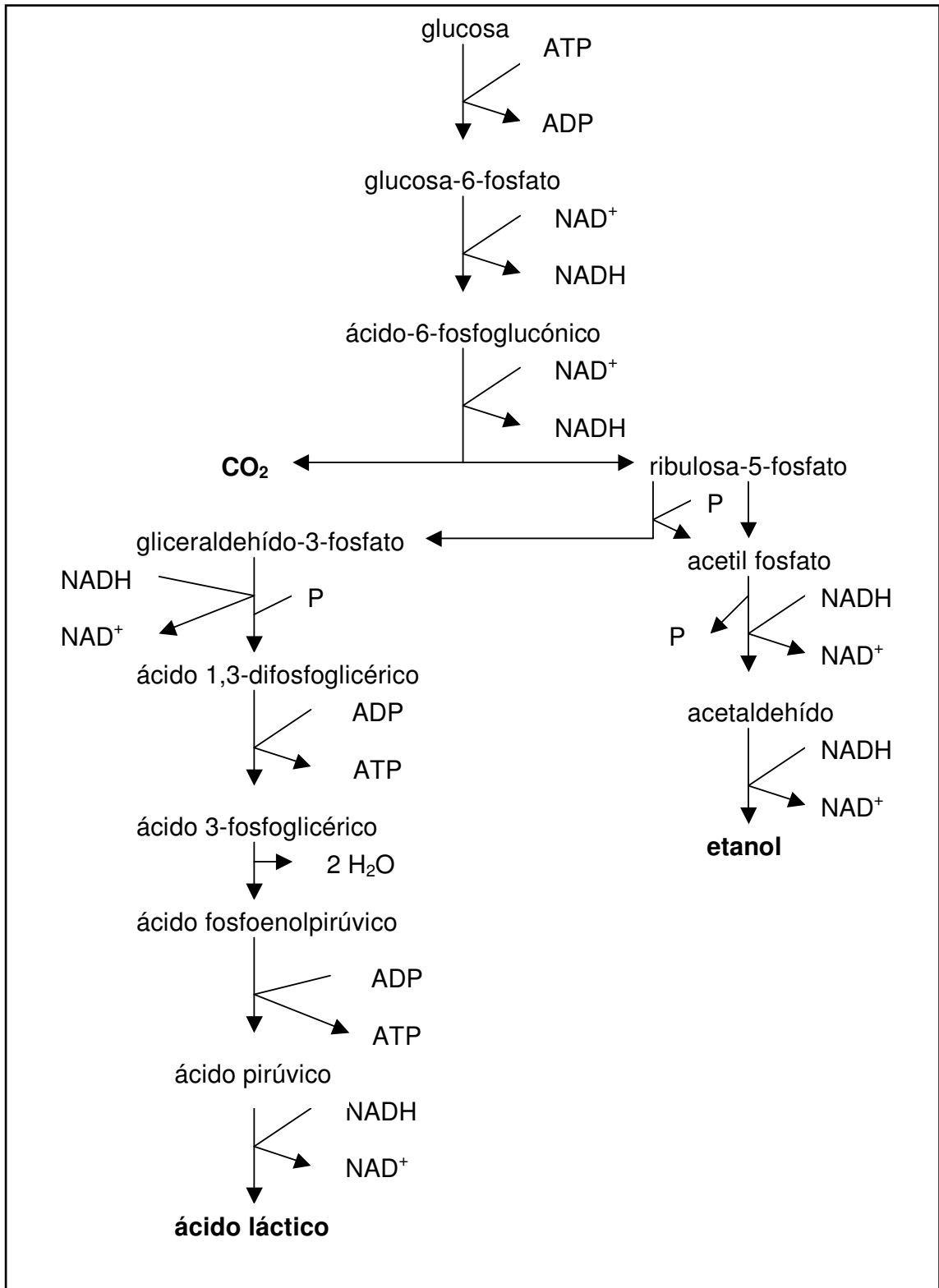
**FIGURA 1 Fermentación láctica homofermentativa.**

FUENTE: BOURGEOIS y LARPENT(1994); CAPLICE y FITZGERALD (1999).

Las BAL, son de especial interés para la industria alimentaria por pertenecer a la categoría GRAS (Generalmente Reconocidas como Seguras) (MANZANARES, 1997). Siendo empleadas para la conservación de muchos alimentos: productos lácteos, cárnicos y vegetales fermentados, en los que ejercen dicho efecto, producto de una disminución del pH y la fermentación de una gran cantidad de carbohidratos, lo que le permite inhibir a microorganismos alterantes que no soportan estas condiciones, como *Pseudomonas*, enterobacterias, *Acinetobacter*, entre otras (BOURGEOIS y LARPENT, 1994).

Otros beneficios descritos de estos microorganismos incluyen: a) la producción de sustancias antimicrobianas; b) su efecto sobre tumores; c) la reducción de los niveles de colesterol sérico; d) el mejoramiento de la tolerancia a la lactosa de productos lácteos; y e) la síntesis de vitaminas y absorción de minerales. Además algunas BAL constituyen parte de la flora normal del organismo animal, encontrándose en número considerable en la nasofaringe, la vagina y el tracto intestinal (STANIER **et al.**, 1996). En este último se pueden localizar, debido a que poseen cierta compatibilidad con el ambiente intestinal, principalmente por su resistencia a la bilis y a que pueden franquear algunas barreras de colonización para otras bacterias como son los jugos gástricos y enzimas intestinales (MANZANARES, 1997).

Por otra parte, dentro de las BAL el género *Carnobacterium* spp., que incluye las especies *Lactobacillus carnis*, *C. divergens*, *C. piscicola*, *C. gallinarum* y *C. mobile* (McMULLEN y STILES, 1996), tienen la ventaja de no ser acidúricas, pero presentan el inconveniente de ser heterofermentativas produciendo pequeñas cantidades de CO<sub>2</sub> durante su desarrollo (GARCIA **et al.**, 1995). Estas BAL han sido estudiadas por su capacidad de producir un tipo de péptido con actividad antimicrobiana en contra de algunas bacterias patógenas, en especial *L. monocytogenes* (SCHILLINGER **et al.**, 1993; SCHÖBITZ **et al.**, 1999; STOFFELS **et al.**, 1993).



**FIGURA 2 Fermentación láctica heterofermentativa.**

FUENTE: BOURGEOIS y LARPENT (1994); CAPLICE y FITZGERALD (1999).

## 2.2 *Listeria* spp

Corresponden a bacterias Gram positivas que pueden desarrollarse en forma aeróbica o como anaerobias facultativas, no son formadoras de esporas (PHAN-THANH **et al.**, 2000), son catalasa positiva y oxidasa negativa (FUCHS, 1999). Tienen una temperatura óptima de crecimiento entre los 30°C y 37°C, su crecimiento se restringe entre 1°C y los 45°C. Son capaces de crecer en un rango de pH que va desde 4,1 hasta aproximadamente 9,6, creciendo mejor en la escala de pH comprendida entre los valores 6 y 8 (JAY, 1992).

El género *Listeria* comprende seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi subsp. murrayi* y *L. grayi subsp. grayi*. Solamente cuatro de estas especies han sido reportadas en enfermedades causadas al hombre o en animales (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. innocua*). Tres de las especies de *Listeria* causantes de enfermedades, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii*, son hemolíticos. Siendo la proteína hemolisina identificada como uno de los factores de virulencia en *L. monocytogenes* (FUCHS, 1999).

La especie *L. monocytogenes* ha sido indicada como el agente causante de la listeriosis (DUFFES **et al.**, 1999; EKLUND **et al.**, 1995 y STANIER **et al.**, 1996), enfermedad que afecta a la población inmunocomprometida como pacientes con enfermedades crónicas, ancianos, mujeres embarazadas y recién nacidos (CISTERNAS **et al.**, 2002; DE MARTINIS **et al.**, 2001; GUYER y JEMMI, 1991).

Las cepas virulentas causantes de listeriosis son capaces de multiplicarse en los macrófagos y producir meningitis, infección del sistema nervioso central, abortos y septicemia (DILLON y PATEL, 1992). La meningitis se produce debido a que el patógeno puede localizarse en las membranas que rodean el cerebro. Durante el embarazo, la transmisión puede ocurrir a través de la placenta o a través de la sangre, dando a veces como resultado el aborto o



muerte del feto (STANIER **et al.**, 1996; VENEGAS **et al.**, 1990). Se describe un período de incubación de 2 a 6 semanas (CISTERNAS **et al.**, 2002). Aunque la listeriosis ocurre con una incidencia menor a 10 por millón, el porcentaje de fatalidad es alto, del orden de un 75% en individuos altamente susceptibles. En contraste, el porcentaje de fatalidad es a menudo bajo en personas sin factores de predisposición, en general el rango de fatalidad es de un 20% (Gelling y Broome, citado por NØRRUNG **et al.**, 1999).

*L. monocytogenes* es un microorganismo ubicuo, que puede ser encontrado en el suelo, agua, animales, alcantarillado, vehículos de transporte de producto, equipos, materiales de envasado, productos alimenticios procesados (VAZ-VELHO **et al.**, 1998). El reservorio principal lo constituyen los animales (principalmente ganado bovino, porcino y ovino) y aves silvestres (CISTERNAS **et al.**, 2002), y también puede ser transportado por el hombre, en donde se ha observado que alrededor del 5% de los individuos sanos son portadores digestivos transitorios, ya que no se implanta en el intestino (VENEGAS **et al.**, 1990).

Los alimentos juegan un rol preponderante como agente transmisor, siendo aislada de variados alimentos destinados al consumo humano, tales como carne refrigerada, leche, queso, crema, chocolate, entre otros (VENEGAS **et al.**, 1990). El primer brote de listeriosis tuvo lugar en Boston en 1979, donde se postuló que el vehículo para la infección de 20 personas fueron, apio, lechuga y tomates crudos (HOBBS y ROBERTS, 1997).

En el año 1985 en Estados Unidos tuvo lugar una epidemia, en la cual se identificó como alimento transmisor de *L. monocytogenes* el queso procedente de fábrica (STANIER **et al.**, 1996; HOBBS y ROBERTS, 1997). No obstante, es raro que la listeriosis aparezca en forma de epidemia y en la mayoría de los casos se desconoce el reservorio (STANIER **et al.**, 1996).

En Chile, como en todo el mundo la listeriosis es una enfermedad de muy baja incidencia, y no se han detectado brotes epidémicos. Sin embargo, debido a su gravedad, en Santiago de Chile, se analizaron 2145 muestras de diferentes alimentos. Las muestras fueron recolectadas en industrias, mercados, restaurantes y hospitales, en un período comprendido entre 1990 y 1997. Los resultados obtenidos mostraron que en Chile podría presentarse un eventual brote de listeriosis. Esta investigación se realizó para una eventual inclusión de *L. monocytogenes* en futuras regulaciones alimentarias (CORDANO y ROCOURT, 2001), ya que la reglamentación sanitaria chilena (CHILE, MINISTERIO DE SALUD, 2004) no incluye la detección o el recuento de esta bacteria en alimentos. A pesar de ello, las industrias exportadoras de alimentos, como las plantas procesadoras de salmones y algunas industrias lácteas están haciendo el análisis para satisfacer los requerimientos de exportación.

Algunos países han establecido los niveles de tolerancia de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. En Inglaterra, Dinamarca y Australia se considera a *L. monocytogenes* un patógeno específico para sectores de riesgo (BEN EMBAREK, 1994), mientras que otros como Estados Unidos exigen tolerancia cero, ausencia del patógeno en 25 g de alimento (DUFFES **et al.**, 1999). Canadá tiene una tolerancia de menor a 100 por g para algunos alimentos y tolerancia cero para otros, especialmente aquellos que favorecen el desarrollo del patógeno (Farber et al., citado por NØRRUNG **et al.**, 1999).

### **2.3 Parámetros que definen la calidad del salmón**

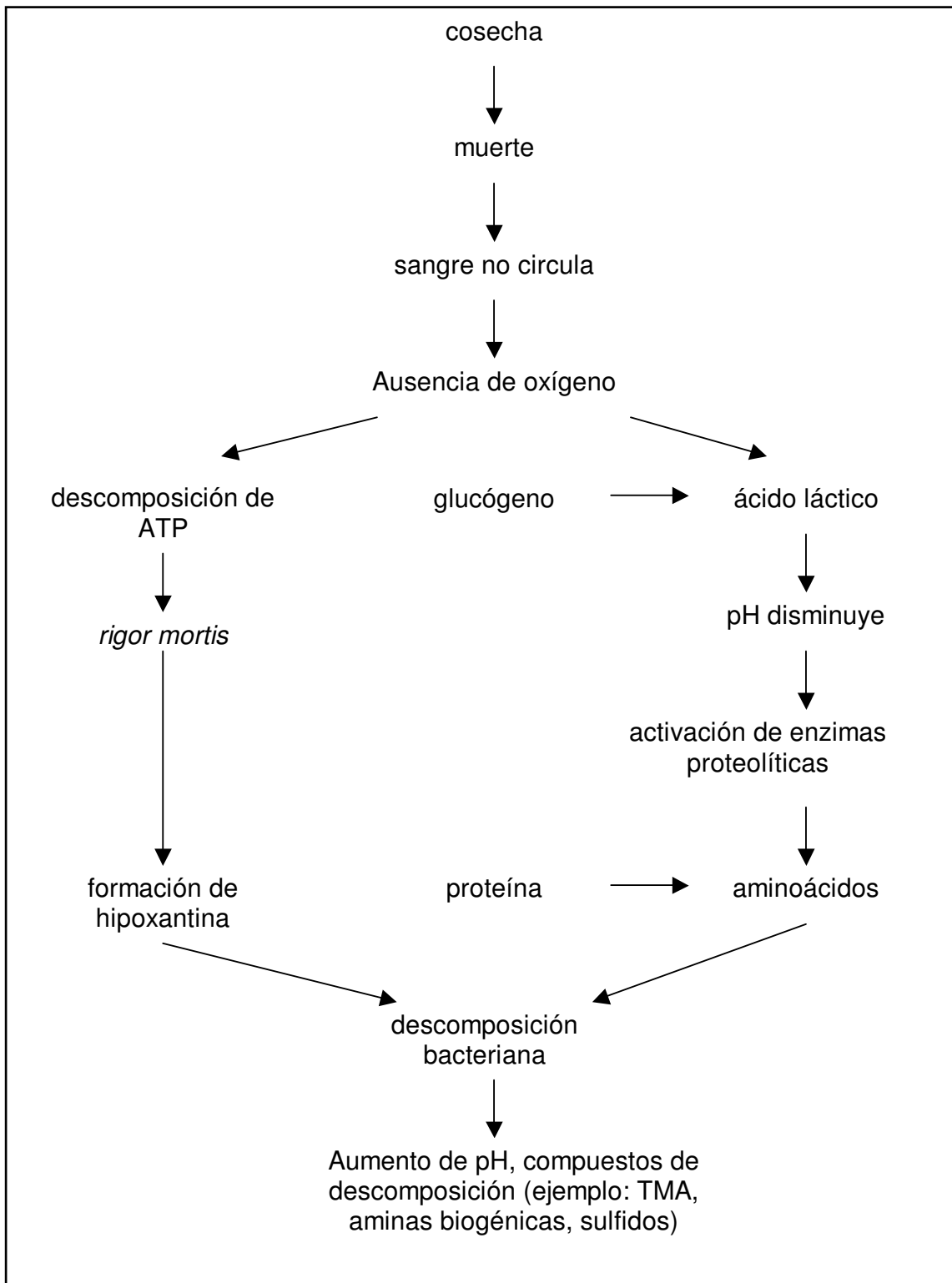
Los componentes más abundantes de todos los pescados son el agua y las proteínas, en cambio el contenido en grasas es variable, siendo alto en algunos pescados y muy bajos en otros, e incluso en la misma especie las proporciones de proteínas y grasas varían mucho, según la época del año, zonas y temperatura del agua. En el salmón el porcentaje de proteínas varía entre un 20

y 22%, la grasa entre un 14 y 16%, agua varía en un 60-70% y cenizas entre un 1-1,2%. Además el salmón es muy rico en vitaminas A y D, también en vitaminas del grupo B y en minerales (PRIMO, 1997).

El pescado fresco tiene una superficie brillante cubierta con una mucosidad delgada y transparente; sus ojos se conservan convexos (salientes), brillantes y libres de mucosidad visible; las branquias son de color rojizo o rosado sin que la sangre forme coágulos. La textura de su cuerpo es firme y elástica. El olor de la carne se describe como "salobre" o "fresca"; la carne del pescado grasoso tiene además un olor agradable parecido al de la margarina (HUSS, 1998), el pH de la carne muscular de un pescado recién capturado se encuentra entre 6,0 y 6,5 (PRIMO, 1997).

Los pescados frescos que se conservan con hielo son alterados por bacterias, mientras que los pescados conservados con sal y los desecados es más probable que sean alterados por hongos. La carga microbiana en el pescado se encuentra en la piel, agallas (bacterias aerobias) y tracto intestinal (bacterias anaerobias). El tejido muscular y los órganos internos son normalmente estériles, debido a que el sistema inmunológico del pez previene el crecimiento de bacterias en el músculo. Una vez muerto las bacterias son capaces de pasar la pared intestinal y colonizar las fibras musculares, pero en forma muy limitada (JAY, 1992).

Inmediatamente o poco después de muertos los peces (FIGURA 3), se produce la llamada rigidez cadavérica o *rigor mortis* originada por la coagulación de la proteína contráctil que tienen los músculos, llamada "miosina". En los pescados enteros y filetes congelados *pre-rigor*, pueden obtenerse buenos productos si se descongelan cuidadosamente a baja temperatura. De esta forma, se da tiempo para que pase el *rigor mortis* mientras el músculo continúa congelado, ya que de lo contrario se produce una pérdida en el rendimiento y en la textura del



**FIGURA 3 Cambios bioquímicos en los músculos de pescados después de la muerte.**

FUENTE: McCALLUM y ARCHIBALD (1994).

producto (HUSS, 1998). La alteración del pescado se inicia después del *rigor mortis*, debido a una oxidación, a la autólisis favorecida por las enzimas naturales del pescado o de origen microbiano o la combinación de las anteriores (PRIMO, 1997). El *rigor post mortem* en el pescado ocurre antes y dura menos tiempo que en la carne de vacuno, al igual que la bajada del pH es menor, debido a la composición química del pescado en el tejido muscular (baja concentración de carbohidratos y elevado contenido en compuestos nitrogenados no proteicos) (HUSS, 1998), siendo el pH final del pescado de 6,0 a 6,5 en los músculos blandos y de 5,5 a 6,0 en los músculos rojos (FENNEMA, 2000). A este nivel de pH, la proliferación bacteriana es mayor, ya que los microorganismos se encuentran en condiciones de pH óptimo y con grandes cantidades de nutrientes para el crecimiento.

A medida que el pescado se descompone, la superficie de su cuerpo pierde el brillo y color y se cubre con una mucosidad más gruesa, que se espesa y produce grumos, y finalmente toma una coloración amarilla o café. Los ojos se hundén y retraen gradualmente, la pupila se vuelve lechosa y la córnea se opaca, las branquias asumen un color rosáceo que posteriormente se torna oscuro y grisáceo; la carne se ablanda o se desprende fácilmente del esqueleto y produce líquidos bajo una presión suave; su elasticidad desaparece (McCALLUM y ARCHIBALD, 1994).

Cuando la putrefacción avanza, se presentan cambios graduales en el olor del pescado fresco, el cual es inicialmente "fresco", después se vuelve "dulce" (HUSS, 1998) y posteriormente se produce el olor intenso de la trimetilamina (olor amoniacal) y aminas biógenas, como la histamina causante de las reacciones alérgicas, produciendo además una textura limosa y blanda (PRIMO, 1997). Las bacterias implicadas en la alteración son *Shewanella* y *Pseudomonas*, siendo *Shewanella putrefaciens* la que predomina a bajas temperaturas (en pescado refrigerado). Las bacterias que predominan en el

pescado descompuesto a altas temperaturas (10-39°C) son las Gram negativas, como *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio* y bacterias coliformes (HUSS, 1998). El músculo de pescados descompuestos presenta un pH de 7,0 o superior (McCALLUM y ARCHIBALD, 1994).

Entre los factores que más influyen sobre el proceso de descomposición, el más importante es la temperatura, cuanto más baja sea más lento será el proceso de descomposición (SCHLESINGER, 1993). Para prolongar la vida útil del pescado, este se comercializa congelado, en conserva y actualmente otras formas de elaboración están adquiriendo mayor importancia industrial como son el salado, ahumado, secado, marinado en vinagre y diferentes condimentos, surimi, entre otras (PRIMO, 1997).

**2.3.1 Salmón ahumado.** El ahumado puede ser en frío o en caliente (HAYES, 1993). El pescado elaborado por ahumado en caliente es sometido a temperaturas superiores a los 60°C, mientras que en el ahumado en frío las temperaturas son inferiores a los 30°C (RØRVICK, 2000). El proceso de ahumado tiene como consecuencia, tanto la desecación del pescado, como su impregnación con humo de madera, determinando una disminución del número de bacterias (HAYES, 1993).

El proceso de ahumado en frío incluye fileteado, salado, secado, ahumado, recorte y envasado (RØRVICK, 2000). El tiempo de salado depende del tamaño y del grosor de los filetes y lo mismo ocurre con el tiempo de ahumado. En este tipo de ahumado la materia prima debe ser salada con mayor intensidad (generalmente en seco, para conseguir una deshidratación y una penetración más rápida de la sal). Como no se emplean temperaturas altas durante el proceso, es la sal la que controla cualquier inicio de descomposición microbiana. El secado del producto en este tipo de ahumado también es

mayor, por lo cual al final se obtiene un producto con mayor contenido de sal, más seco, y por consiguiente una vida útil más prolongada (25 a 30 días)<sup>1</sup>.

La composición de la microflora en salmón ahumado en frío es probablemente determinada por varios factores tales como, la microflora del salmón crudo, las condiciones de producción (método de salado, procesamiento y temperatura de ahumado) y la flora microbiana al interior de los ahumadores. Sin embargo, las condiciones de preservación normalmente usadas (3-5% de sal en la fase acuosa, pH comprendido entre 5,8-6,3,  $a_w$  en el rango de 0,93 a 0,96, temperatura de refrigeración y vacío), constituyen una barrera física, estrechando el rango de microorganismos capaz de desarrollarse en el producto (PALUDAN-MÜLLER **et al.**, 1998; RØRVICK, 2000).

El rol de las BAL en el deterioro del salmón ahumado en frío no está claro (DUFFES **et al.**, 2000; LEROI **et al.**, 1998). Algunos trabajos como los de NILSSON **et al.** (1999), PALUDAN-MÜLLER **et al.** (1998) y LEROI **et al.** (1998) encontraron que en salmón ahumado antes de su deterioro las BAL son las predominantes y según LEROI **et al.** (1998) estas se encuentran presentes en un (49%) con un 65% de especies de *Carnobacterium*, aunque también se encuentran *Photobacterium phosphoreum* (33%), *Brochotrix spp.* (13%), *Shewanella putrefaciens* y *Aeromonas spp.* (3%), que son reconocidos microorganismos causantes del deterioro (DUFFES **et al.**, 2000).

Gran preocupación ha despertado a nivel mundial la contaminación por *L. monocytogenes* en los productos terminados. El peligro en alimentos como el pescado ahumado en frío se debe a que los valores de actividad de agua, pH y contenido de sal, están normalmente dentro de un rango que permite el desarrollo de *L. monocytogenes* y el calor aplicado durante el procesamiento no es suficiente para inactivar al microorganismo, siendo además los productos

---

<sup>1</sup> Fuente: [www.clubdelamar.org/ahumado.htm](http://www.clubdelamar.org/ahumado.htm). Junio, 2003.

consumidos sin cocción (EKLUND **et al.**, 1995; GUYER y JEMMI, 1991; VAZ-VELHO **et al.**, 1998). Por el contrario, en el proceso de ahumado en caliente una temperatura de 65°C por 20 minutos, tiene un efecto bactericida sobre éste patógeno (JEMMI y KEUSCH, 1992).

**2.3.2 Presencia de *L. monocytogenes* en la industria salmonera.** *Listeria* spp., se ha encontrado en pescado crudo proveniente de agua dulce y marina, siendo *L. monocytogenes* aislada en un 62% de todas las muestras de agua (DILLON y PATEL, 1992). En Chile de un total de 594 muestras analizadas desde una planta procesadora de pescado, se encontró en el 53% del producto elaborado fresco-refrigerado y en el 60% del producto congelado (VILLALOBOS, 2000). En una industria portuguesa se analizaron 40 muestras de salmón y 48 muestras de trucha asalmonada, junto con 67 muestras ambientales de dos piscifactorías productoras de trucha. La incidencia total de *Listeria* spp., y *L. monocytogenes* en el salmón fue de 2% y 0% respectivamente. La incidencia de las mismas especies en la trucha asalmonada fue del 6,3% y 2,1%. En las muestras ambientales no se detectó la presencia de *Listeria* (VAZ-VELHO **et al.**, 1998).

FARBER y PETERKIN (1991), reportaron la presencia de *L. monocytogenes* en salmón crudo proveniente de USA, Chile, Noruega y Canadá. *L. monocytogenes* fue aislada desde la superficie del salmón crudo, fileteado, agua de lavado y desde productos de recortes de una planta de ahumado en frío. EKLUND **et al.** (1995), identificaron como la primera fuente de contaminación con *L. monocytogenes* en las plantas de procesamiento de pescado ahumado en frío, la superficie externa de los pescados frescos y congelados. Durante las operaciones de fileteado, lavado y salado la bacteria es transferida a la carne expuesta, debido a la circulación a través de las diferentes fases de procesamiento, equipos, personal y otras superficies



con las cuales tiene contacto, constituyendo ésta la segunda fuente de contaminación.

#### **2.4 Medidas para la prevención de la contaminación con *L. monocytogenes* en la industria del salmón ahumado**

Para eliminar éste patógeno desde el ambiente de procesamiento del salmón ahumado, una medida es la buena calidad higiénica general de la planta, con énfasis en las superficies que están en contacto con el producto. Para ello los operarios deben ser entrenados para que entiendan la importancia de una buena higiene y la necesidad de implementarla durante el proceso. La temperatura es fundamental en las áreas de procesamiento y debe ser controlada, el producto final debe ser llevado al almacenamiento tan rápido como sea posible (GUYER y JEMMI, 1991; RØRVIK, 2000).

*L. monocytogenes* ha sido encontrada en varios lugares dentro del ambiente de la planta de procesamiento, una vez establecido el organismo es difícil de erradicar (MCCARTHY, 1997), debido a su capacidad de adhesión a las superficies formando una matriz biopolimera denominada biofilm (LUPPENS **et al.**, 2001), bajo esta forma tiene mayor resistencia a los desinfectantes y su control es difícil de lograr (LAIDLER, 2001). Estas células se pueden adherir en materiales de acero, goma, vidrio y otras superficies usadas en plantas procesadoras de alimentos (LUNDÉN **et al.**, 2000; MONTVILLE y WINKOWSKI, 1997). Para el control de los biofilms usualmente se ha intentado con una combinación de detergentes biocidas y mecanismos de limpieza, sin embargo el uso de un solo desinfectante o agente de limpieza para la erradicación del patógeno es poco efectivo (ARIZCUN **et al.**, 1998). El uso de vapor y amonio cuaternario es recomendado en la desinfección de cintas transportadoras y máquinas de corte<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> [www. Cfsan.fda.gov](http://www.Cfsan.fda.gov).Marzo, 2001.

Para el control de *L. monocytogenes* en productos pesqueros ahumados en frío los siguientes pasos son necesarios: a) eliminación o reducción de *L. monocytogenes* de la superficie externa de pescados frescos o congelados antes que ellos sean fileteados, empleando para ello el uso de agua clorada en el proceso (GARLAND, 1995); b) prevención de la recontaminación del producto durante todas las etapas de procesamiento, mediante el uso del sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP), una separación física de las áreas de alto riesgo como la evisceración, además de una estricta higiene y restringida entrada del personal a la planta de procesamiento (GARLAND, 1995); c) inhibición de algún posible sobreviviente, los cuáles pueden desarrollarse durante la distribución (EKLUND **et al.**, 1995), por medio de preservantes, o el uso de barreras que controlen el crecimiento o la inactiven, como bacteriocinas o desinfectantes (FARBER, 1993).

**2.4.1 Uso de preservantes.** Los resultados de PELROY **et al.** (1994), indicaron que el uso de alguno de estos preservantes sal, nitrito y lactato de sodio, tienen una baja efectividad cuando son usados en forma individual sin embargo, en combinación pueden ser efectivos. *L. monocytogenes* puede desarrollarse bien en pescado ahumado en frío en concentraciones de un 6% de NaCl en la fase acuosa, lo cual es inaceptable para la mayoría de los consumidores. Estos autores demostraron que el nitrito de sodio y lactato de sodio en combinación con un 3% de NaCl en la fase acuosa, inhiben el desarrollo de bajos niveles de inóculo de *L. monocytogenes* en salmón ahumado en frío almacenado a 10°C.

Según DUFFES **et al.**(1999), la designación de salmón ahumado implicaría la ausencia de aditivos. En Francia, no está permitido el uso de aditivos como preservantes, colorantes, antioxidantes o estabilizantes. De esta manera y siguiendo la designación de salmón ahumado, una forma natural de protección de este producto contra *L. monocytogenes* sería el uso de BAL.

**2.4.2 Bioprotección mediante el uso de BAL.** Las potencialidades inhibitoras de las BAL son importantes. Los progresos en el conocimiento de sus mecanismos de inhibición, en particular a nivel de las condiciones que permiten la manifestación de tales mecanismos, permitirá aumentar su uso como agentes de conservación de productos alimenticios (BOURGEOIS y LARPENT, 1994). Desde hace más de 60 años se ha observado el fenómeno de antagonismo de las BAL cuando se encuentran en cultivo mixto, inhibiendo o destruyendo a microorganismos estrechamente emparentados y a microorganismos que producen toxinas o que alteran los alimentos. Sin embargo, no se ha dilucidado el mecanismo exacto mediante el cual los cultivos lácticos inhiben a otros microorganismos. Entre los factores inhibidores identificados están, el peróxido de hidrógeno, los ácidos orgánicos, la reducción del pH, el etanol, el diacetilo, el agotamiento de nutrientes en el medio, la producción de bacteriocinas y/o la producción de antibióticos (JAY, 1992; SCHILLINGER y LÜCKE, 1991).

El efecto inhibitor específico de los ácidos orgánicos se atribuye generalmente a su forma no disociada. Esta forma penetra libremente en la célula donde se ioniza, lo que provoca un descenso en el pH interno y el bloqueo de algunos mecanismos de transporte (BOURGEOIS y LARPENT, 1994). El ácido láctico posee una cierta acción bacteriostática. Bajo ciertas condiciones, también producen pequeñas cantidades de ácido acético que posee una acción inhibitora más pronunciada (SCHILLINGER y LÜCKE, 1991; CAPLICE y FITZGERALD, 1999). El ácido acético es más inhibitorio que el ácido láctico y puede inhibir levaduras, mohos y bacterias, sin embargo la presencia simultánea de ambos ácidos orgánicos podría tener un ligero efecto de sinergismo en la acción inhibitora (BOURGEOIS y LARPENT, 1994). El ácido propiónico inhibe hongos y bacterias. La contribución de acetaldehído para la biopreservación es menor (CAPLICE y FITZGERALD, 1999).

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se acumula en el medio de crecimiento al no producir estos microorganismos catalasa. La acción bactericida del  $H_2O_2$  se atribuye a su efecto altamente oxidante, mediante peroxidación de los lípidos de la membrana y la destrucción de la estructura básica molecular de proteínas celulares (REQUENA y PELAEZ, 1995). La acumulación del  $H_2O_2$  varía mucho según las especies e incluso en una misma especie las concentraciones máximas de  $H_2O_2$  detectadas en los cultivos son variables, pudiendo sobrepasar 1mM (BOURGEOIS y LARPENT, 1994). La actividad antimicrobiana del  $H_2O_2$  es ampliamente reconocida sobre microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas* spp (MANZANARES, 1997).

El dióxido de carbono ( $CO_2$ ), es formado durante las fermentaciones heterolácticas, puede crear directamente un ambiente anaeróbico y es tóxico para algunos microorganismos presentes en los alimentos, a través de su acción sobre la membrana celular y su habilidad para reducir el pH interno y externo (CAPLICE y FITZGERALD, 1999).

Las BAL heterofermentativas producen también etanol, otro antimicrobiano bien establecido. Este puede contribuir a la inhibición de los microorganismos competidores, aunque su concentración en productos lácteos fermentados es generalmente baja (ADAMS y MOSS, 2000).

Otro producto es el diacetilo, compuesto producido por bacterias lácticas fermentadoras del citrato. Posee un efecto antimicrobiano a elevadas concentraciones sin embargo, a bajas concentraciones puede ser metabolizado por algunos microorganismos (REQUENA y PELAEZ, 1995). Las bacterias Gram negativas, levaduras y hongos son más sensibles al diacetilo que las Gram positivas, y este modo de acción se cree que se debe a la interferencia con la utilización de arginina (CAPLICE y FITZGERALD, 1999; MANZANARES, 1997).

**2.4.3 Bioprotección por bacteriocinas.** Por definición, las bacteriocinas son macromoléculas de composición proteica (MANZANARES, 1997), sintetizadas en los ribosomas (MADIGAN **et al.**, 1998), producidas por un diverso número de especies bacterianas (MANZANARES, 1997). El espectro de actividad de las bacteriocinas de bacterias lácticas se limita a bacterias Gram positivas. Esto incluye varios patógenos de los que algunos son susceptibles a bacteriocinas, como *Clostridium botulinum*, *S. aureus* y *L. monocytogenes*. Otras bacteriocinas inhiben sólo especies muy relacionadas, por lo que su aplicación en alimentos es poco probable (MEDINA **et al.**, 1992).

Los criterios clásicos según (MEDINA **et al.**, 1992) que definen una bacteriocina son:

- un espectro de actividad inhibitorio reducido, fundamentalmente frente a especies próximas
- la presencia de una parte proteica activa
- el modo de acción bactericida
- la unión a receptores específicos
- la síntesis de una molécula que inmuniza a la célula productora contra su propia bacteriocina; el soporte genético de las dos moléculas, bacteriocinas y moléculas de inmunidad es un plásmido.

El espectro de acción las distingue de los antibióticos, que tienen un espectro de actividad más amplio (MADIGAN **et al.**, 1998), siendo éstos inaceptables en los alimentos, debido al riesgo del desarrollo de una resistencia antibiótica en la flora intestinal, lo cual no sucede con las bacteriocinas que son degradadas por las proteasas digestivas presentes en el estómago o en el intestino delgado (SCHILLINGER y LÜCKE, 1991).

Para la producción de bacteriocinas se tienen que tener en consideración factores como la composición y pH del medio de cultivo y la fase de crecimiento de la bacteria productora, ya que se ha comprobado que algunas bacteriocinas sólo se producen en medios sólidos, siendo la producción máxima de algunas durante o al final de la fase logarítmica, comprobándose un descenso posterior (MEDINA **et al.**, 1992).

Las bacteriocinas de las BAL presentan una serie de propiedades bioquímicas comunes como son, su sensibilidad a la acción de enzimas proteolíticas y tolerancia a elevadas temperaturas y a bajo pH (REQUENA y PELAEZ, 1995). Muchas también son más activas a pH ácido (CAPLICE y FITZGERALD, 1999), siendo generalmente estables a pH ácido o neutro, aunque existen algunas excepciones. Así, por ejemplo, la solubilidad y estabilidad de la nisina decrece de un pH óptimo de 2,0 a un pH de 6,0, lo que supone una desventaja tecnológica en la utilización de la nisina en alimentos no ácidos (GARCIA **et al.**, 1995).

De este modo las bacteriocinas o cepas productoras de bacteriocinas podrían ser utilizadas como bioprotectores de alimentos, especialmente de productos lácteos o cárnicos. En la actualidad, la nisina es la única bacteriocina que se emplea en alimentos en algunos países (MEDINA **et al.**, 1992). Las BAL pertenecientes al género *Carnobacterium* han sido generalmente aisladas a partir de alimentos como pollos, carne y pescado. Es así como desde éstos productos varios autores han aislado cepas del género *Carnobacterium* productoras de bacteriocinas (PILET **et al.**, 1995; STOFFELS **et al.**, 1993; LEROI **et al.**, 1998; DUFFES **et al.**, 1999).

La actividad antilisterial de *Carnobacterium* spp., ha sido estudiada por la capacidad de la cepa para crecer y producir bacteriocinas a bajas temperaturas y en presencia de altas concentraciones de cloruro de sodio (AHN y STILES,

1990; DUFFES **et al.**, 1999; NILSSON **et al.**, 1999). STOFFELS **et al.** (1993) reportaron métodos para la purificación y caracterización de una de las bacteriocinas producidas por este género de BAL (carnocin U149).

La factibilidad del empleo de *C. piscicola* directamente en sistemas alimentarios, dependerá de su impacto organoléptico, ya que para su empleo como cultivo protector, debe suprimir al microorganismo indeseable, modificando escasamente las propiedades sensoriales del producto (SCHILLINGER y LÜCKE, 1991).

## **2.5 Calidad sensorial del salmón**

La evaluación sensorial es definida como una disciplina científica, empleada para evocar, medir, analizar e interpretar reacciones características del alimento, percibidas a través de los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y audición (HUSS, 1998). En el salmón ahumado en frío no se han identificado microorganismos específicos del deterioro por lo tanto el análisis sensorial parece ser la mejor forma de evaluar su vida útil (LEROI y JOFFRAUD, 2000). NILSSON **et al.** (1999) y PALUDAN-MÜLLER **et al.**(1998), señalan que la calidad sensorial del salmón ahumado en frío no es adversamente afectada por la presencia de elevados números de células de *C. piscicola*. Por otra parte el género *Carnobacterium* es considerado una especie segura para su uso en alimentos listos para el consumo (DUFFES **et al.**,1999).

En cuanto a los métodos químicos, tales como bases nitrogenadas volátiles totales (BNVT), trimetilamina (TMA) y etanol, no parecen ser buenos indicadores del deterioro en salmón ahumado en frío, ya que no existe una buena correlación con la evaluación sensorial, incluso cuando en ésta última se observen diferencias significativas (LEROI **et al.**, 1996). En un estudio realizado por LEROI **et al.** (1998) en salmón ahumado en frío almacenado a 8 °C, se encontró una producción de TMA de poca importancia a lo largo del periodo de

almacenamiento, sin embargo los resultados de la evaluación sensorial indicaron el completo deterioro del salmón a las 3 semanas de almacenamiento.

Por lo tanto, para caracterizar la influencia de la cepa *C. piscicola* sobre el deterioro del salmón ahumado en frío, los atributos graso, rancio, ácido/picante, agrio/fermentado, amino y queso han sido escogidos según LEROI **et al.** (1996) como buenos descriptores del deterioro para éste producto. Por otra parte los métodos físicos como textura y principalmente el pH brindan valiosa información acerca de la condición de la carne de pescado (HUSS, 1998).



### 3. MATERIAL Y MÉTODO

El estudio se realizó en las fechas comprendidas entre el 13 de octubre del 2003 y el 30 de enero del 2004, en los laboratorios de Microbiología de Alimentos y de Evaluación Sensorial del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICYTAL)<sup>1</sup>.

#### 3.1 Material

**3.1.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo.** La cepa bacteriana del estudio, corresponde a la bacteria ácido láctica *C. piscicola* L103, aislada a partir de carne envasada al vacío (SCHÖBITZ **et al.**, 1995) y descrita como productora de un compuesto antagónico, el cuál fue identificado por SCHÖBITZ **et al.** (1999), como una sustancia del tipo de las bacteriocinas. La cepa previo a su uso se mantuvo congelada a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  en caldo Soya Tripticasa (ST) adicionado de glicerol al 1% (como crioprotector).

Como cepa indicadora de la actividad antagonista de *C. piscicola* L103 se trabajó con *L. monocytogenes* L4/00, aislada a partir de salmón, en el ICYTAL y conservada en caldo ST congelada a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**3.1.2 Sustrato para la inoculación de las cepas.** Para los ensayos se contó con dos partidas de 10 filetes de salmón ahumado en frío donados por la planta “Ventisqueros S. A.<sup>2</sup>”, sin espinas y sin piel, envasados en bolsas de polietileno, los cuales fueron transportados en cajas de plumavit en condiciones de refrigeración. A su llegada a la ciudad de Valdivia los salmones fueron

---

<sup>1</sup> Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos “ICYTAL”, Universidad Austral de Chile.

<sup>2</sup> Planta salmonera, Ubicada en Lib. Bernardo O’Higgins 150 x Región, Hornopirén, Chile.

conservados bajo congelación. La recepción de los filetes de la primera partida se realizó el 8 de diciembre del 2003 y los de la segunda partida el 03 de enero del 2004.

**3.1.3 Bolsas utilizadas para envasar los trozos de salmón ahumado en frío al vacío.** Se utilizaron bolsas Cryovac® termorretráctiles, con una permeabilidad al oxígeno de aproximadamente 20 a 40 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup>/24h, 1 atm a 25°C y 95% H. R.

## **3.2 Estudio del efecto antagonista de la cepa *C. piscicola* L103 en contra de *L. monocytogenes* L4/00, inoculadas sobre filetes de salmón ahumado en frío**

**3.2.1 Etapas preliminares del estudio.** Para verificar la pureza de la cepa bacteriana en estudio y de la cepa indicadora, los cultivos congelados se repicaron en 10 ml de caldo D-MRS (ANEXO 1) y Soya Trypticase (ST) (ANEXO 1), incubadas a 25 °C/48h y 32 °C/18h, respectivamente. Se realizó la tinción de Gram para observar la morfología y controlar la pureza de los cultivos. También se hicieron las pruebas de catalasa y oxidasa a cada una de las cepas.

Para la estandarización de la concentración de células de *C. piscicola* para el inóculo, se efectuaron recuentos en superficie en placas con agar D-MRS y se determinó la densidad óptica (absorbancia) del cultivo a 660 nm (Equipo Spectronic Génesis 5, USA) a las 18, 24 y 27 h (ANEXO 2). Por otra parte para establecer el periodo de incubación con mayor actividad antagonista de la cepa láctica, se determinó la actividad de la bacteriocina en los mismas horas indicadas anteriormente, empleando la técnica de la “gota sobre césped” (ANEXO 3), para estandarizar el inóculo durante el tiempo necesario para obtener la mayor actividad antagonista y de esta manera obtener mejores

resultados de inhibición de *L. monocytogenes* al realizar la inoculación sobre el salmón.

**3.2.2 Preparación del salmón para su inoculación.** Los 10 filetes de la primera partida fueron conservados bajo congelación durante una semana y para su uso, el salmón fue descongelado durante 16 h a temperatura ambiente, para luego ser cortados con cuchillo estéril en trozos de 5 cm x 5 cm, constituyendo cada trozo una muestra. Los filetes de la segunda partida, se mantuvieron congelados durante 2 días y fueron descongelados a temperatura ambiente durante 12 h, siendo posteriormente cortados en trozos de aproximadamente 5 cm x 5 cm. Sus medidas exactas se determinaron en el momento de la siembra (ANEXO 4).

**3.2.3 Preparación de las cepas.** Para la preparación del inóculo de *C. piscicola* L103, se inocularon en un matraz con 100 ml de caldo D-MRS, 100  $\mu$ L de un cultivo de *C. piscicola* L103. El matraz se incubó a temperatura ambiente, durante 24 h con agitación constante (200 rpm) en un Shaker (Lab-Line Environ-Shaker. Lab-Line Instruments Inc. Melrose, ILL.). Posteriormente se procedió a diluir el cultivo 100 veces. Para ello se tomó 1 ml del cultivo de 24 h, con una concentración inicial de  $1,0 \times 10^9$  ufc/ml vertiéndose en 99 ml de buffer 0,05 M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ) a pH 7,0 (Merck) obteniéndose un inóculo de  $1,0 \times 10^7$  ufc/ml.

Para la obtención del inóculo de *L. monocytogenes* L4/00, en tubos con 10 ml de caldo ST se inocularon 100  $\mu$ L de un cultivo de *L. monocytogenes* L4/00, los cuales se incubaron durante 18 h a  $32 \pm 1^\circ\text{C}$ . Este cultivo tenía una concentración inicial de  $1,0 \times 10^9$  ufc/ml y se diluyó 10.000 veces. Para ello se agregó 1 ml del cultivo en 99 ml de buffer fosfato 0,05 M pH 7,0 y de éste 1 ml se diluyó 100 veces en matraz con 99 ml de buffer fosfato, obteniéndose un inóculo con una concentración de  $1,0 \times 10^5$  ufc/ml.

**3.2.4 Procedimiento de inoculación del salmón.** La inoculación de *L. monocytogenes* sobre los trozos de salmón se efectuó al interior de una cámara de polietileno, para evitar la diseminación del patógeno al ambiente. Se empleó un envase plástico con dispositivo de aspersion, realizándose la aspersion en ambas caras de los trozos de salmón, dejando transcurrir algunos minutos (1 a 5 minutos) antes de inocular la segunda cara del trozo de salmón.

La inoculación de los trozos de salmón con la cepa *C. piscicola* y buffer fosfato, se realizó en una cámara de flujo laminar (pure Air Corporation of America, Van Nuys. California), previamente desinfectada, utilizando para la aspersion el mismo procedimiento descrito para la cepa de *L. monocytogenes*.

Los envases plásticos con dispositivo de aspersion, en cada uno de los casos antes de su uso se esterilizaron haciendo pasar alcohol de 70% de concentración, seguido de un enjuague con agua destilada estéril.

Los experimentos contaron con cinco tratamientos y cada uno se realizó en triplicado para cada fecha de análisis. El total de trozos de salmón por tratamiento fueron 12.

**Tratamientos:**

**T1:** control.

**T2:** control con buffer fosfato.

**T3:** *L. monocytogenes* L4/00, concentración inicial de  $1,0 \times 10^5$  ufc/ml.

**T4:** *L. monocytogenes* L4/00, concentración inicial de  $1,0 \times 10^5$  ufc/ml más *C. piscicola* L103, concentración inicial de  $1,0 \times 10^7$  ufc/ml.

**T5:** *C. piscicola* L103, concentración inicial de  $1,0 \times 10^7$  ufc/ml.

**3.2.5 Envasado y almacenamiento de los trozos de salmón.** Los trozos de salmón pertenecientes a los tratamientos T1, T2 y T5 (sin *L. monocytogenes*) fueron colocados en bolsas Cryovac y envasados al vacío, utilizando una máquina envasadora ubicada en la planta faenadora FRIVAL<sup>1</sup>. Los trozos de salmón correspondientes a los tratamientos T4 y T5 (con *L. monocytogenes*) se cubrieron con un film plástico y cartón, para luego ser colocados en las bolsas Cryovac para su posterior envasado al vacío en una máquina envasadora (MINIVAC 300. Construzioni Meccaniche Industriali. Italia), perteneciente a la planta (CTL<sup>2</sup> del ICYTAL).

La termorretracción de las bolsas se realizó sumergiendo, cada uno de los trozos sellados de los distintos tratamientos en un baño termostático (Memmert, Thelco. Rango 0 °C – 100 °C ± 1 °C) a una temperatura de 90 °C durante un segundo, para luego mantenerse almacenados en refrigeración a una temperatura de 2,0 ± 1,0 °C en el primer experimento y a 4,6 ± 1,0 °C en el segundo experimento, hasta el momento de su análisis.

**3.2.6 Análisis microbiológico y frecuencia de muestreos.** Para los tratamientos T1, T2 y T4 se realizaron recuentos de BAL sobre agar D-MRS, incubadas en aerobiosis a 24 ± 2 °C y recuento de *Listeria* en agar OXA (Oxoid. Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) selectivo para *Listeria* en aerobiosis a 32 ± 1 °C.

En los trozos del tratamiento T3 se realizó recuento sólo de *L. monocytogenes* y para los trozos del tratamiento T5 sólo de BAL, incubándose las placas en las mismas condiciones indicadas anteriormente para el recuento del respectivo microorganismo. Los recuentos microbiológicos se efectuaron en el tiempo cero, a los 7, 14 y 21 días.

---

<sup>1</sup> Frigoríficos Valdivia “FRIVAL”, Av. Balmaceda 8010, Valdivia, Chile.

<sup>2</sup> Centro Tecnológico de la Leche (CTL), Universidad Austral de Chile, campus isla teja s/n.

Para la siembra, en el correspondiente tiempo de análisis se midió la superficie de cada trozo con la ayuda de un pie de metro digital (Mitutoyo, Vernier Caliper Mitutoyo Corporation, Japan), luego se introdujeron los trozos en bolsas Stomacher estériles y se le añadieron 100 ml de buffer fosfato (APHA, 1992), homogeneizándose por 30 segundos a velocidad alta en un homogeneizador “Stomacher” (Seward Medical, modelo 400, U. K), obteniéndose de esta manera la primera dilución ( $10^{-1}$ ). Posteriormente se realizaron las diluciones necesarias para efectuar los recuentos microbiológicos. Los valores obtenidos de los recuentos fueron transformados a ufc/cm<sup>2</sup>.

**3.2.7 Mediciones de pH en los trozos de salmón.** La determinación del pH se efectuó en los trozos de salmón pertenecientes a los tratamientos T1, T2 y T5 (sin *L. monocytogenes*), en forma paralela al análisis microbiológico y en duplicado, utilizando un peachímetro (Radiometer, Copenhagen N. V. Dinamarca) y de acuerdo a la metodología especificada en la Norma Chilena 1370/10 (CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN, 1978).

### **3.3 Estudio del efecto del crecimiento de *C. piscicola* L103 sobre las características organolépticas del salmón ahumado en frío**

Con el objetivo de establecer si la inoculación de los trozos de salmón con *C. piscicola* L103 o buffer fosfato afectaban la calidad sensorial del salmón, se realizó el estudio en el laboratorio de evaluación sensorial del ICYTAL.

**3.3.1 Selección de panelistas.** Con el propósito de trabajar con las personas más idóneas para efectuar la evaluación sensorial del salmón ahumado en frío, se trabajó con un panel estable, compuesto por 8 panelistas semientrenados con experiencia en la evaluación sensorial de alimentos, a los cuales previamente se les hizo evaluar salmón ahumado en frío sin inocular, para familiarizarlos con las características sensoriales que se esperan en este tipo de producto.

**3.3.2 Tratamientos evaluados.** La evaluación sensorial contó con tres tratamientos y cada uno en duplicado, realizándose en forma paralela al análisis microbiológico.

**Tratamientos:**

**T1:** control.

**T2:** control con buffer fosfato.

**T3:** *C. piscicola* L103, concentración inicial de  $1,0 \times 10^7$  ufc/ml.

**3.3.3 Atributos evaluados en el panel.** Los panelistas evaluaron los atributos de olor a rancio, picante, ácido/fermentado, amoniacal, además de evaluar la firmeza e indicar su nivel de agrado o desagrado del producto por medio de la aceptación. Los atributos indicados anteriormente se evaluaron a través de escala hedónica para el caso de la aceptación y pruebas descriptivas para los restantes atributos. La cartilla utilizada por los panelistas se presenta en ANEXO 5.

**3.3.4 Preparación de las muestras para el panel sensorial.** Los filetes de salmón ahumado se cortaron en trozos de aproximadamente 3 cm x 3 cm y fueron inoculados bajo las mismas condiciones indicadas en la sección 3.2.4 y 3.2.5. Las evaluaciones se realizaron en el tiempo cero, a los 7, 14 y 21 días.

Por ser el salmón ahumado en frío un producto listo para su consumo, no se requirió una preparación especial de las muestras que se entregaron a los panelistas. Los trozos envasados al vacío de cada tratamiento se mantuvieron sin abrir, durante una hora a temperatura ambiente para la evaluación del olor, luego se les presentaron a los panelistas al azar, en forma individual y marcados con un código. Este atributo se evaluó cortando las bolsas selladas e interpretando la primera percepción de olor.

Para la evaluación de la textura los trozos fueron sacados de las bolsas y presentados a los panelistas a temperatura de refrigeración en platos individuales identificados con un código. La textura se evaluó por presión digital sobre los trozos.

### **3.4 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se consideraron los dos experimentos realizados como replica. Los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos y de evaluación sensorial, se analizaron estadísticamente mediante un ensayo de mediciones repetidas (modelo general lineal univariante) (MORRIS, 1999) y para las mediciones de pH obtenidas se empleó un diseño factorial con bloques (modelo general lineal univariante) (MORRIS, 1999). Estudiándose como factores principales los tratamientos, los experimentos, el tiempo, la interacción entre tratamientos y tiempo, entre otras interacciones.

Para aquellos factores que presentaron diferencias estadísticamente significativas se empleó la prueba de hipótesis específica de Tukey (nivel de significancia de 95%). Analizándose el efecto de los días para un mismo tratamiento y el efecto de los tratamientos para un mismo día. Para los resultados de los análisis microbiológicos se empleó un diseño experimental de 5 x 4 (5 tratamientos y 4 días de análisis), mientras que para los resultados de las mediciones de pH y de la evaluación sensorial se empleó un diseño experimental de 3 x 4 (3 tratamientos y 4 días de análisis). En el análisis de los resultados se empleó el programa estadístico SPSS versión 10.0.5 para Windows.



## 4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1 Estudio del efecto antagonista de la cepa láctica *C. piscicola* en contra de *L. monocytogenes* inoculada sobre trozos de salmón ahumado en frío

A continuación se presentan y discuten los resultados del estudio que tuvo por objetivo evaluar la capacidad antagonista de la cepa láctica *C. piscicola* L103 (FIGURA 4) productora de una bacteriocina (actividad en caldo de 400 UA/ml) con antagonismo en contra de *L. monocytogenes* L4/00 (FIGURA 4) y los efectos del desarrollo de esta cepa láctica sobre las características sensoriales del salmón ahumado en frío.

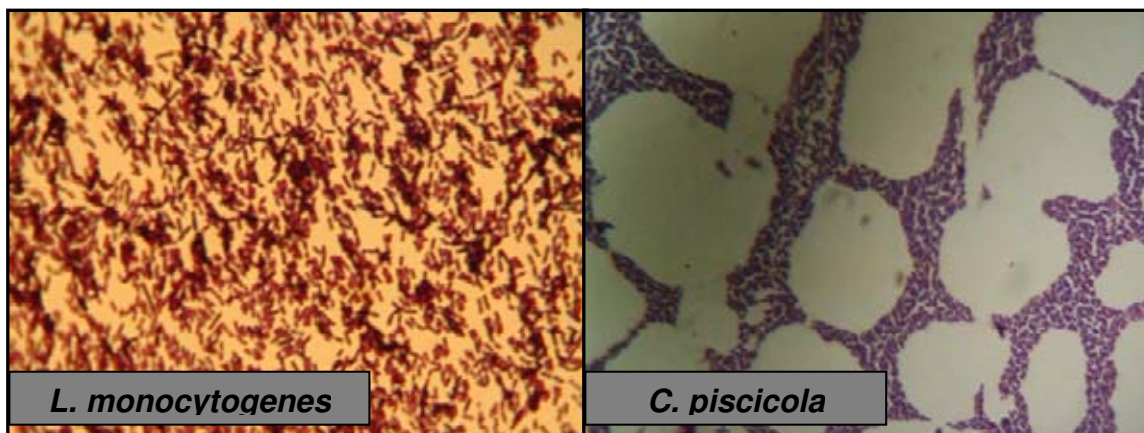


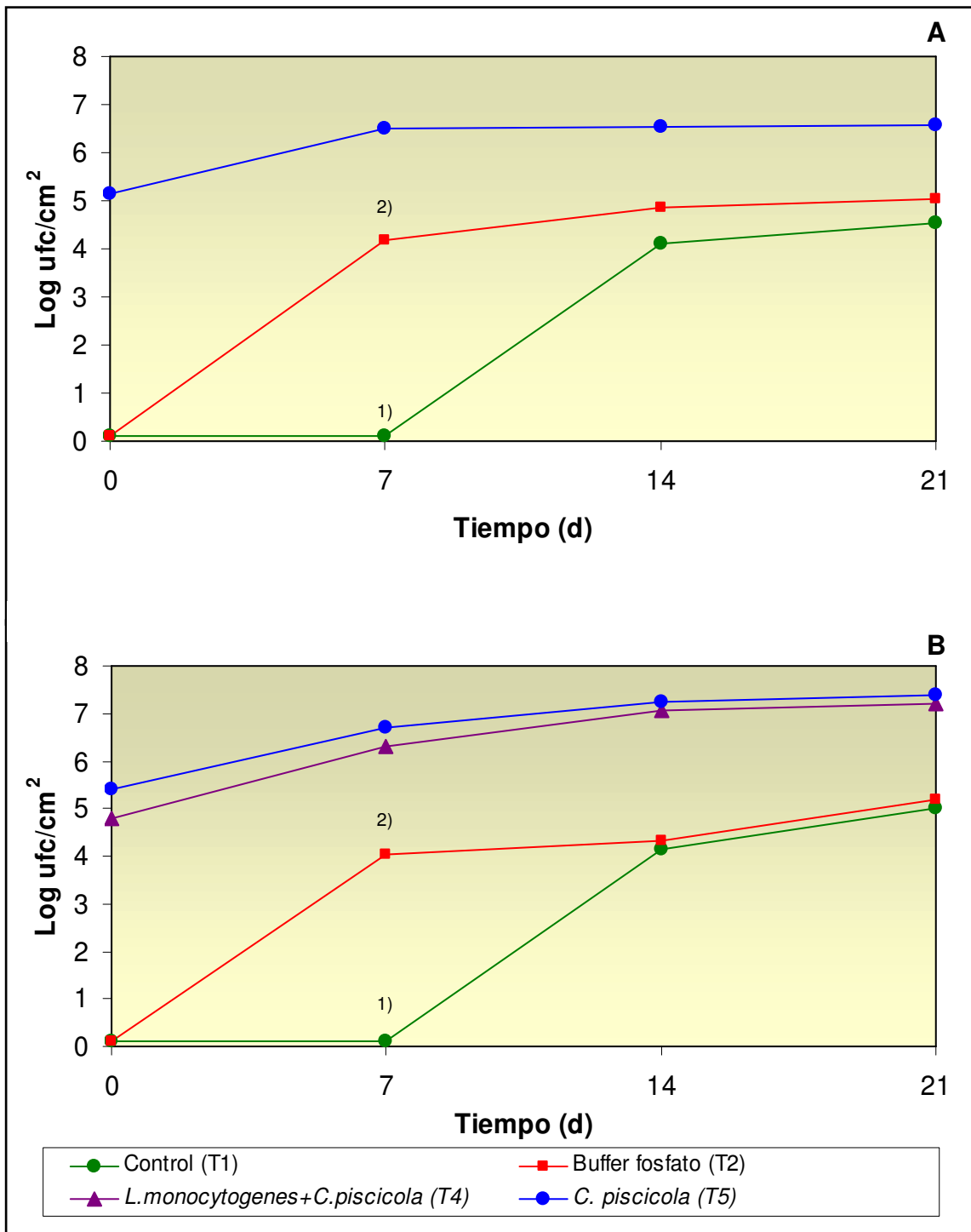
FIGURA 4 Tinción de Gram de *L. monocytogenes* L4/00 y de *C. piscicola* L103, observadas bajo el microscopio (aumento 100x).

En el modelo estadístico aplicado, se consideraron los dos experimentos realizados como réplicas sin embargo, tal análisis estadístico arrojó diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre experimentos en los recuentos microbiológicos, análisis físico y sensorial. Estas diferencias probablemente se debieron a la carga microbiana inicial de cada partida de filetes de salmón utilizados en el estudio. En los filetes de la primera partida, al efectuar los recuentos de BAL en medio D-MRS, el cual no es 100% selectivo para BAL, se observó gran contaminación bacteriana por colonias Gram negativas y levaduras, en mucha

mayor proporción que las observadas al efectuar los análisis con los filetes de la segunda partida. Al haber una mayor carga microbiana natural contaminante, se reduce la cantidad de nutrientes disponibles, lo cual puede significar un menor crecimiento sobre el salmón de las bacterias en estudio (BAL y/o *L. monocytogenes*).

Las diferencias encontradas entre experimentos, también pudieron deberse a las diferentes temperaturas de almacenamiento utilizadas, siendo la temperatura en el primer experimento de  $2,0 \pm 1,0$  °C, en tanto que en el segundo experimento fue de  $4,6 \pm 1,0$  °C, lo que influyó sobre el crecimiento de las bacterias en estudio. En un estudio realizado por DELGADO (2001), se destacó el lento crecimiento de *L. monocytogenes* a 4 °C. Por ello al incubar a 2 °C en este estudio hubo un crecimiento aún más lento de *Listeria*. Debido a la diferencia significativa entre experimentos, los resultados de éstos se presentarán y discutirán como dos experimentos separados.

En la FIGURA 5 se presentan los resultados del recuento de BAL (ANEXO 6), se observa que a partir del día 7 se obtuvieron recuentos de las bacterias lácticas nativas en los trozos de salmón con buffer fosfato (T2) y para el control (T1) a partir del día 14, obteniéndose diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) a partir del tiempo cero, entre estos tratamientos y los tratamientos con *L. monocytogenes* + *C. piscicola* (T4) y *C. piscicola* sola (T5). Este fenómeno se observó en los dos experimentos realizados y se mantuvo a lo largo del periodo de almacenamiento, siendo los recuentos en los dos últimos tratamientos significativamente mayores. Esto permitió ratificar el lento crecimiento de las BAL nativas y la ventaja de inocular una cepa láctica en una alta concentración para así obtener un rápido desarrollo de éstas y una mejor competencia con las bacterias contaminantes presentes en el salmón, ya que en ambos experimentos, en los trozos de salmón ahumado inoculados sólo con *C. piscicola* L103, no se observó la presencia de bacterias contaminantes como



<sup>1)</sup> Límite determinación técnica:  $\log < 0,1 \text{ ufc/cm}^2$ .

<sup>2)</sup> Valores corresponden al promedio de tres determinaciones.

**FIGURA 5** Recuento de BAL ( $\log \text{ ufc/cm}^2$ ) en trozos de salmón ahumado en frío, almacenados durante 21 días. (A) exp. 1 ( $2,0 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ); (B) exp. 2 ( $4,6 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

las levaduras. Ello coincide con lo señalado por LEROI et al. (1996), quienes no encontraron levaduras en aquellas muestras de salmón inoculadas con cepas de *C. piscicola*, no así en aquellas muestras control (sin inocular) donde observaron un gran desarrollo de éstas.

Los recuentos de los tratamientos T4 y T5 fueron significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre sí solamente en el tiempo cero, presentando mayores recuentos de BAL los trozos de salmón del tratamiento sólo con *C. piscicola* (T5). Cabe mencionar que el recuento de BAL en el T4 se efectuó solamente en el segundo experimento (ANEXO 6). También se pudo visualizar que a partir del día 14 se apreciaron diferencias significativas entre experimentos para T5, con mayores recuentos en el segundo experimento, lo cual refleja que una diferencia de aproximadamente 2,6 °C favorece el desarrollo de las BAL.

Los resultados no permiten aseverar claramente que el aumento de humedad evaluado en el tratamiento con buffer fosfato potenció el desarrollo de las BAL, pues solamente en el día 7 se observó una diferencia entre el control (sin inocular) y los trozos con buffer fosfato en ambos experimentos, en el día 14 solamente en el primer experimento se visualizó igual diferencia, sin embargo, para el día 21, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los experimentos entre ambos tratamientos. Por el contrario RODRIGUEZ (2002), encontró a partir del día 14 diferencias significativas más claras entre los trozos de trucha ahumada en frío inoculados con buffer fosfato y los trozos de trucha pertenecientes al tratamiento control, siendo los recuentos de BAL del tratamiento con buffer significativamente superiores.

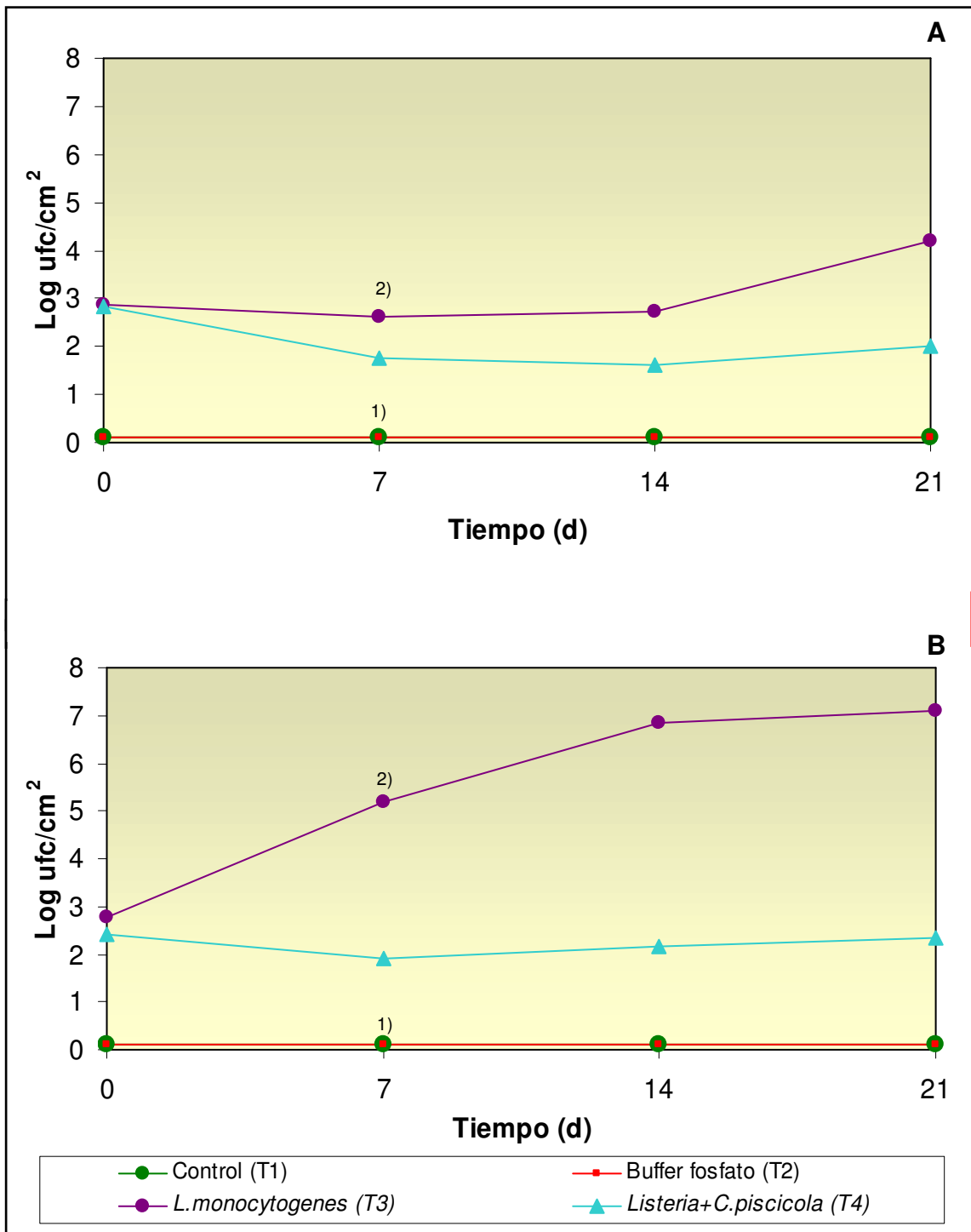
En la FIGURA 6 se presentan los resultados del recuento de *Listeria* (ANEXO 7). En los trozos correspondientes al control y con buffer fosfato se obtuvieron recuentos de  $\log < 0,1$  ufc/cm<sup>2</sup> de *Listeria* en todos los días de análisis de los dos experimentos. En la co-inoculación de *C. piscicola* L103 y

*L. monocytogenes* L4/00 (T4) (FIGURA 6), se observó en el día 21 para el experimento 1 una reducción de 2,2 ciclos log de este patógeno al compararse con el crecimiento en igual día con el tratamiento control inoculado sólo con *L. monocytogenes*, el cual presentó hasta el día 21 un aumento de 1,3 ciclos log. Mientras que en el experimento 2, en el día 21 la reducción obtenida fue de 4,8 ciclos log al compararse con el control inoculado sólo con *L. monocytogenes*, el cual alcanzó un crecimiento de 4,3 ciclos log en el transcurso de los 21 días de duración del estudio. Con ello se reafirma que un aumento de 2,6 °C en la temperatura de almacenamiento de los trozos de salmón favoreció el desarrollo de *L. monocytogenes* en ausencia de *C. piscicola*.

Por otra parte, este estudio permitió establecer que *C. piscicola* L103 mantuvo los recuentos de *L. monocytogenes* L4/00 en valores cercanos a log 2,0 ufc/cm<sup>2</sup> desde el día 7 hasta el día 21 en ambos experimentos, observándose por lo tanto, un efecto bacteriostático es decir, un impedimento del crecimiento del patógeno (SCHLEGEL, 1997), independientemente de las diferentes temperaturas de los experimentos.

GOMEZ (2002), al inocular la bacteriocina de *C. piscicola* L103 en salmón ahumado en frío obtuvo también un efecto bacteriostático sobre *L. monocytogenes* durante los días de almacenamiento a 5 °C. Ello coincidió con los resultados de BORQUEZ (2000) y de DELGADO (2001), quienes también encontraron que la bacteriocina de *C. piscicola* L103 ejercía un efecto bacteriostático sobre este patógeno al ser inoculada sobre salmón fresco.

Por tanto se obtiene un efecto antagonista similar sobre *L. monocytogenes* al usar la cepa láctica productora de bacteriocina o sólo su bacteriocina. Sin embargo, la supresión de *L. monocytogenes* al usar la cepa láctica aparentemente es mayor. Los resultados del presente estudio mostraron que al inocular la cepa láctica, los recuentos de *L. monocytogenes* se mantuvieron en



<sup>1)</sup> Límite determinación técnica:  $\log < 0,1 \text{ ufc/cm}^2$ .

<sup>2)</sup> Valores corresponden al promedio de tres determinaciones.

**FIGURA 6** Recuento de *Listeria* ( $\log \text{ ufc/cm}^2$ ) en trozos de salmón ahumado en frío, almacenados durante 21 días. (A) exp. 1 ( $2,0 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ); (B) exp. 2 ( $4,6 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

valores cercanos a  $\log 2,0 \text{ ufc/cm}^2$ , mientras que en el trabajo de RODRIGUEZ (2002) con igual concentración de inóculo ( $10^5 \text{ ufc/ml}$ ) de *L. monocytogenes*, pero utilizando la bacteriocina sola, los recuentos permanecieron próximos a  $\log 4,0 \text{ ufc/cm}^2$ , en trucha ahumada en frío.

En otros trabajos se han encontrado aún mejores efectos antilisteriales de cepas lácticas productoras de bacteriocinas, tal es el caso de BUCHANAN y KLAWITTER (1991) quienes encontraron que la bacteriocina producida por LK5 producía un efecto bactericida es decir, una destrucción de *L. monocytogenes* (SCHLEGEL, 1997) en altas concentraciones. NILSSON et al. (1999), al utilizar la cepa *C. piscicola* A9b productora de bacteriocina en jugo de salmón también obtuvieron un efecto bactericida sobre *L. monocytogenes*. Sin embargo, al usar la cepa *C. piscicola* A10a en salmón ahumado en frío sólo observaron un efecto bacteriostático, similar al obtenido en el presente estudio. Según BUCHANAN y KLAWITTER (1992) *C. piscicola* puede ser usada para el control de *L. monocytogenes* en salmón ahumado en frío y en una variedad de alimentos, particularmente aquellos almacenados a temperaturas de refrigeración ( $5^{\circ}\text{C}$ ) (BUCHANAN y BAGI, 1997), siendo la supresión del patógeno en aquellos alimentos en donde la microflora acompañante ha sido reducida a través del uso de irradiación o procesos térmicos aún más efectiva (BUCHANAN y KLAWITTER, 1992).

El hecho que en alimentos como el salmón al utilizar la cepa láctica sólo se obtenga un efecto bacteriostático sobre *Listeria* puede deberse según STOFFELS et al. (1993) y NILSSON et al. (1999), a que la distribución de la cepa puede ser menos eficiente y la actividad de su bacteriocina puede ser afectada por proteasas nativas de los alimentos o de origen microbiano, a la ligazón a componentes presentes en los alimentos y a la inactivación o reducción en la producción de las bacteriocinas en la presencia de moderadas concentraciones de NaCl. GOMEZ (2002), encontró que el aceite de salmón

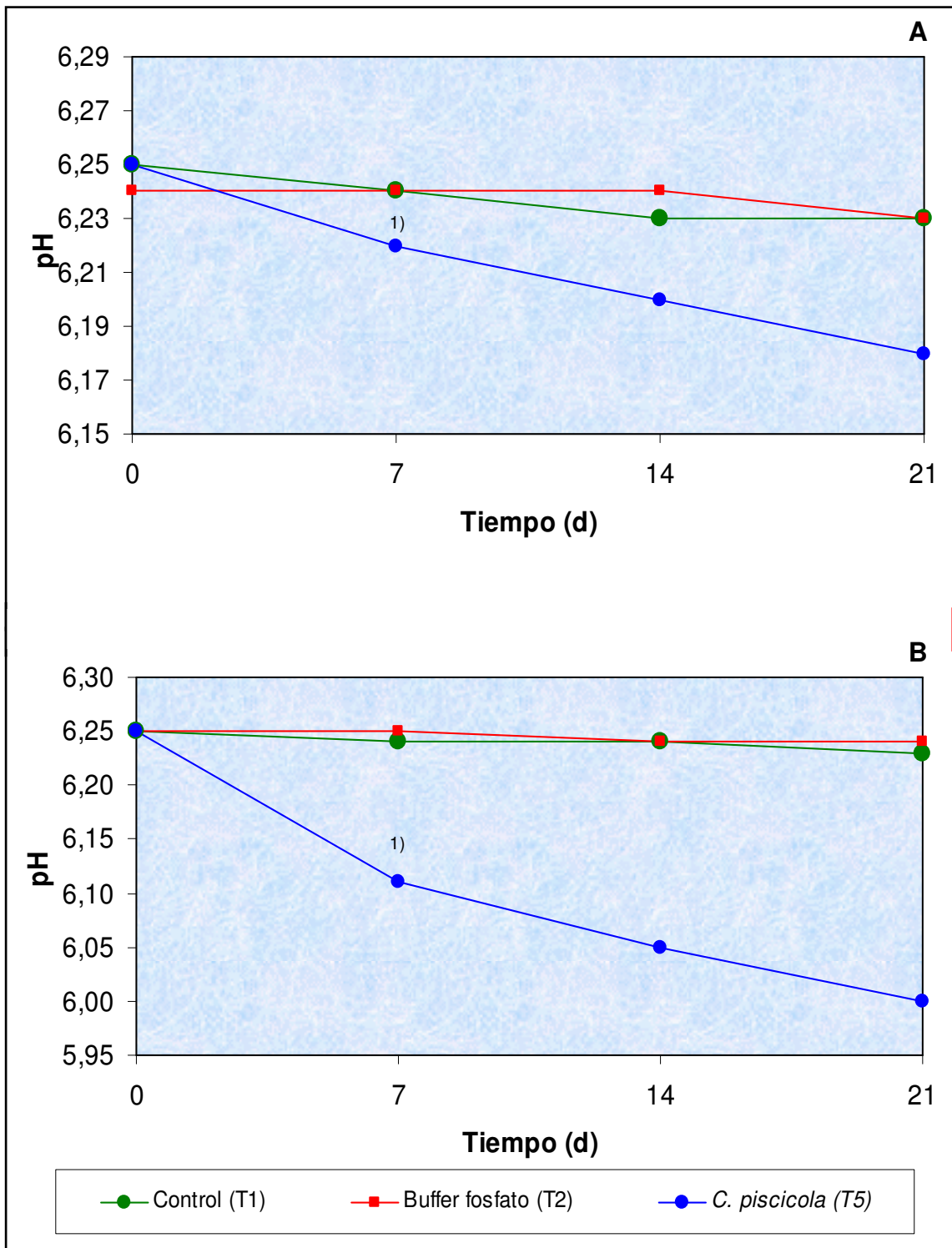
afectaba negativamente tanto la difusión como la capacidad antagonista de la bacteriocina de *C. piscicola*, en tanto las temperaturas altas (25°C) resultaron favorables para su difusión, no así para su actividad antilisterial, que fue afectada negativamente a altas temperaturas. La sal en cambio, presentó un efecto favorable sobre la difusión y la capacidad antagonista, aumentando tal actividad en presencia de altas concentraciones de NaCl (3%).

Diversos autores han sugerido que la inhibición de *L. monocytogenes* por cepas lácticas no siempre es atribuible a la producción de componentes antilisteriales (NILSSON et al., 1999), ya que también puede estar involucrada la disminución de nutrientes esenciales, mediante el antagonismo competitivo (DEGNAN et al., 1992; DUFFES et al., 1999). Asimismo BUCHANAN y BAGI (1997), sugirieron que la supresión de *L. monocytogenes* por *C. piscicola*, puede ser por una disminución de nutrientes producida por un crecimiento más rápido de *C. piscicola*, limitando de esta manera los nutrientes disponibles para *L. monocytogenes*.

Por lo tanto, en el presente estudio no es posible afirmar que el efecto bacteriostático de *C. piscicola* L103 sobre *L. monocytogenes* L4/00 observado, se deba exclusivamente a la bacteriocina, ya que una vez realizada la co-inoculación no se realizó un control de actividad de la bacteriocina en el salmón ahumado, por lo que el efecto antagonista se puede deber a la producción de la bacteriocina y/o a los factores antes mencionados o también debido a que esta BAL es heterofermentativa (GARCÍA et al., 1995).

En la FIGURA 7, se presentan los resultados del pH en los trozos de salmón (ANEXO 8). Se pudo observar que entre los trozos de salmón de los tratamientos control y con buffer no hubo diferencias significativas en ambos experimentos, resultados que concuerdan con los encontrados por BORQUEZ (2000) y RODRIGUEZ (2002). También LEROI et al. (1998) al analizar la





<sup>1)</sup> Valores corresponden al promedio de dos sesiones.

**FIGURA 7** Mediciones de pH en trozos de salmón ahumado en frío, almacenados durante 21 días. (A) exp. 1 ( $2,0 \pm 1,0$  °C); (B) exp. 2 ( $4,6 \pm 1,0$  °C).

variación del pH del salmón ahumado en frío envasado al vacío, almacenado a 8 °C durante 5 semanas, encontraron que el pH del salmón se mantuvo estable, cercano a 6,15. Aunque hubo desarrollo de BAL nativas, estas no fueron lo suficientemente acidúricas para cambiar significativamente el pH del salmón.

Por otra parte, en el segundo experimento a partir del día 7 se observaron diferencias significativas entre los trozos de salmón inoculados con *C. piscicola* (T5) y el control e inoculados con buffer fosfato, mientras que en el primer experimento se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre estos mismos tratamientos a partir del día 14. Por el contrario, al inocular sólo la bacteriocina de la cepa láctica en trucha ahumada en frío (RODRIGUEZ, 2002) y en salmón fresco envasado al vacío (BORQUEZ, 2000), no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre el control sin inocular, el control con buffer fosfato y los tratamientos inoculados con bacteriocinas. Esta es una de las ventajas de utilizar sólo la bacteriocina, ya que por ser macromoléculas de composición proteica (MANZANARES, 1997) no tendrían ningún efecto sobre el pH del producto. Contrariamente a lo que sucede al utilizar las cepas lácticas, que tienen entre sus metabolitos además de las bacteriocinas la producción de ácidos orgánicos (CAPLICE y FITZGERALD, 1999), que en este estudio redujeron el pH del salmón ahumado significativamente, en comparación con el pH de los trozos de salmón sin inocular.

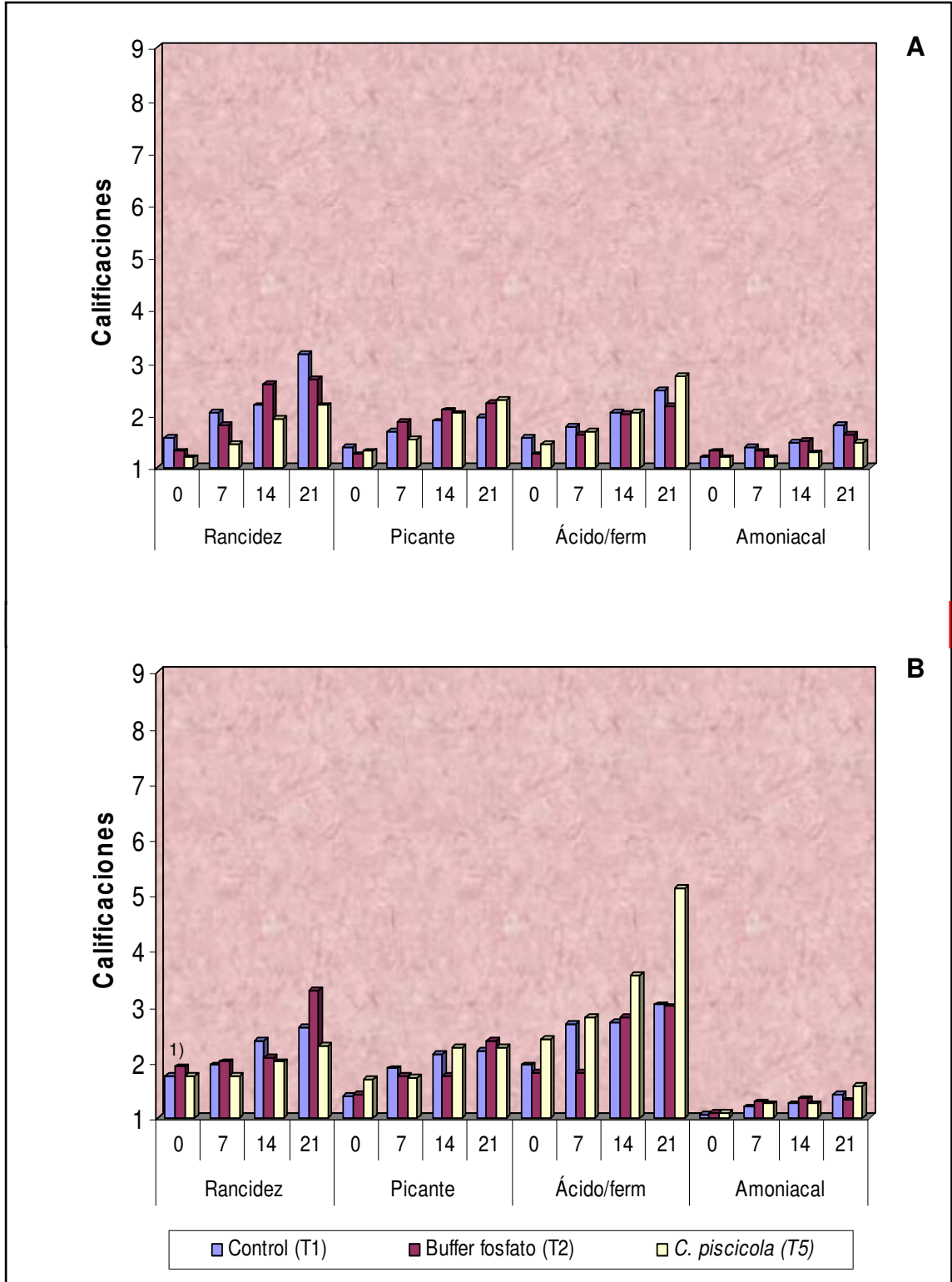
En los trozos de salmón inoculados sólo con *C. piscicola* (T5), se observó diferencias entre los dos experimentos, las que fueron significativas ( $p < 0,05$ ) a partir del día 7, obteniéndose valores de pH más bajos en el segundo experimento que en el primero. En los trozos de salmón ahumado inoculados con *C. piscicola* L103, se obtuvieron a los 21 días de almacenamiento valores de pH de 6,18 y 6,00 en el primer y segundo experimento, respectivamente. JOFFRAUD **et al.** (2001) y NILSSON **et al.** (1999), también observaron una reducción del pH en salmón inoculado con *C. piscicola*, obteniendo un valor

final del pH del salmón de 6,1 y 6,0 respectivamente. Contrariamente DUFFES **et al.** (2000) no encontraron cambios significativos en el pH del salmón ahumado en frío inoculado con *C. piscicola* SF668, manteniéndose éste constante en 6,2 durante los 28 días del estudio, asimismo en estudios de BUCHANAN y KLAWITTER (1992) se demostró que *C. piscicola* LK5 no era una fuerte productora de ácido y no disminuía el pH en los alimentos a menos que hubiesen niveles altos de carbohidratos disponibles. De esta manera a pesar que en el tratamiento inoculado sólo con *C. piscicola* se redujo significativamente el pH con respecto a los demás tratamientos, a un nivel de pH 6,0 *L. monocytogenes* se encuentra en el pH en que mejor crece (JAY, 1992), por lo cual esto no explicaría el efecto antilisterial demostrado por la cepa láctica. BUCHANAN y KLAWITTER (1992) además demostraron que la supresión de *L. monocytogenes* no era debido a la producción de ácido por *C. piscicola*.

#### **4.2 Evaluación sensorial**

Las calificaciones promedio otorgadas por los 8 panelistas, a cada uno de los atributos de olor indicadores del deterioro en salmón ahumado en frío (ANEXO 9), se presentan en la FIGURA 8. Los resultados arrojaron que solamente para el atributo ácido/fermentado se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos. La diferencia en este atributo radica en el tratamiento inoculado con la cepa *C. piscicola* (T5) del segundo panel sensorial.

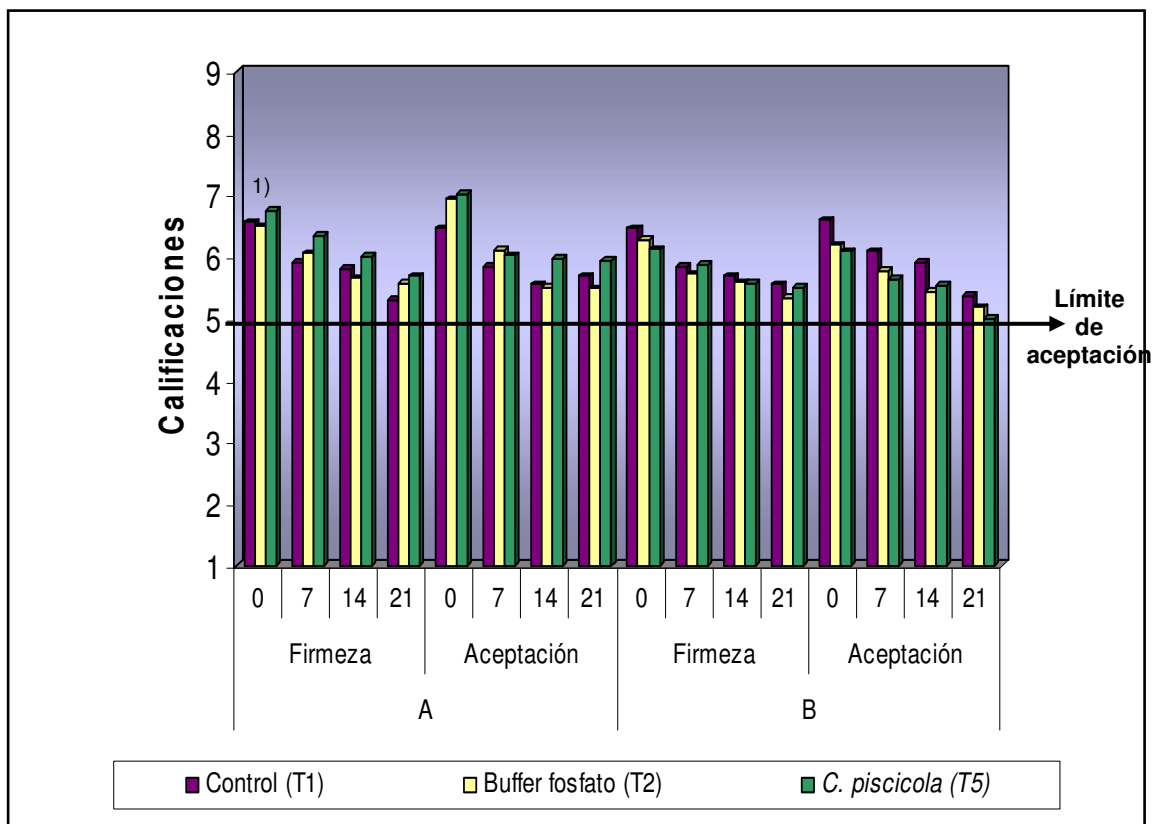
La percepción promedio de los 8 panelistas del olor a ácido/fermentado del tratamiento T5 del segundo panel sensorial se hace significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) a partir del día 7, siendo en este día solamente superior al tratamiento inoculado con buffer fosfato del primer panel, llegando en el día 21 a ser mayor el olor a ácido/fermentado (puntaje 5,13) en comparación con los restantes tratamientos del primer y segundo panel sensorial, los cuales fueron calificados como suavemente perceptible (puntaje promedio 3,0).



<sup>1)</sup> Valores corresponden al promedio de dos sesiones.

**FIGURA 8** Calificaciones promedio de 8 panelistas, para cada atributo de olor en estudio. (A) exp. 1 (2,0 ± 1,0 °C); (B) exp. 2 (4,6 ± 1,0 °C).

La mayor percepción de olor a ácido/fermentado indicada por los panelistas en los trozos de salmón inoculados con la cepa láctica del segundo panel, coincidió con la mayor reducción del pH del salmón presentada en este segundo experimento, por lo que los panelistas fueron capaces de ratificar lo medido de manera instrumental, reflejando lo idóneo del panel sensorial elegido para este estudio. No obstante, al ser la percepción del olor a ácido/fermentado de los trozos inoculados con *C. piscicola* significativamente mayor con respecto a los trozos de los otros dos tratamientos, esto no influyó significativamente sobre la aceptación del producto por los panelistas (FIGURA 9), quienes le otorgaron calificaciones similares a las de los otros tratamientos evaluados.



<sup>1)</sup> Valores corresponden al promedio de dos sesiones.

**FIGURA 9** Calificaciones promedio de 8 panelistas, para los atributos de firmeza y aceptación. (A) exp. 1 ( $2,0 \pm 1,0$  °C); (B) exp. 2 ( $4,6 \pm 1,0$  °C).

Las calificaciones de los panelistas superaron el valor 5 considerado como el límite de aceptación (no me gusta ni me disgusta) para el presente estudio y también utilizado en el estudio de EINARSSON y LAUZON (1995). Ello podría deberse a que el olor ácido percibido no fue desagradable. Una situación similar se obtuvo en el trabajo de JOFFRAUD **et al.** (2001), donde a los 40 días de almacenamiento de salmón ahumado en frío a 6 °C inoculado con *C. piscicola*, los panelistas describieron su percepción del olor del salmón con descriptores como olor a mantequilla y caramelo. Estos olores no fueron considerados desagradables por los panelistas, por lo cual las muestras no fueron calificadas como deterioradas.

De esta manera se puede señalar que en los atributos evaluados característicos del deterioro de salmón ahumado en frío, en este estudio no se encontraron diferencias significativas al comparar el tratamiento inoculado con *C. piscicola* con los controles. Por lo tanto se puede afirmar que la inoculación de salmón ahumado en frío con *C. piscicola* no aceleró la velocidad de su deterioro. Los resultados encontrados en la evaluación sensorial por NILSSON **et al.** (1999), concuerdan con los resultados encontrados en el presente estudio, quienes no encontraron diferencias significativas entre las muestras de salmón ahumado en frío inoculadas con cepas individuales de *C. piscicola* y la muestra control (no inoculada) durante un periodo de 4 semanas de almacenamiento a 5 °C. En el estudio de PALUDAN-MÜLLER **et al.** (1998), con *C. piscicola* en una concentración de inóculo de aproximadamente  $10^6$  ufc/g e incluso niveles superiores ( $10^7$ - $10^8$  ufc/g) por varias semanas no aceleró el proceso de deterioro de este producto. También BUCHANAN y KLAWITTER (1992), al inocular *C. piscicola* LK5 ( $10^4$  ufc/g) en varios alimentos como carne molida, camarón, salchichas, entre otros, encontraron que la cepa láctica no impartía olores fuertes a los productos.

En otros estudios se han encontrado resultados aún mejores que los obtenidos en este trabajo, tal es el caso de LEROI et al. (1996), quienes al inocular muestras de salmón ahumado con cepas de *C. piscicola*, lograron mejorar la calidad sensorial del salmón ahumado en frío, con un incremento en los olores específicos del salmón ahumado y una disminución de los olores característicos del deterioro como rancio, ácido/picante, agrio/fermentado y amino que las muestras control (sin inocular). En el presente estudio si bien las calificaciones para el atributo rancidez no se diferenciaron de las otorgadas a las muestras del tratamiento control, si se obtuvo una calificación que no varió significativamente ( $p > 0,05$ ) con el transcurso de los días de análisis, por el contrario en las muestras control se observó una diferencia significativa en las calificaciones promedio de los 8 panelistas entre el día 0 y el día 21, lo cual corrobora que esta BAL es débilmente proteolítica y lipolítica (CAPLICE y FITZGERALD, 1999).

Contrariamente a los resultados obtenidos en el actual estudio con la cepa *C. piscicola* L103, al inocular otro tipo de cepas lácticas en alimentos se han obtenido resultados desfavorables. NILSSON et al. (1999) y JOFFRAUD et al. (2001), al inocular con *Lactobacillus sake* LK5 y *Lactobacillus* spp., respectivamente, obtuvieron en las muestras de salmón ahumado olores desagradables descritos como astringentes, sulfurosos, aminos, fecales, agrio, ácido y picante. Así resulta muy importante la selección de la cepa láctica a utilizar, para no modificar o modificar escasamente las propiedades sensoriales del producto, por lo cual *C. piscicola* L103 parece reunir las características de un potencial cultivo bioprotector para salmón ahumado en frío.

## 5. CONCLUSIONES

- Un elevado inóculo inicial de la cepa láctica *C. piscicola* L103 sobre salmón ahumado en frío envasado al vacío, otorga un factor de protección más efectivo en contra de *L. monocytogenes* L4/00, que el manifestado por las bacterias lácticas nativas.
- La cepa *C. piscicola* L103 presentó un efecto bacteriostático sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* L4/00 a 2,0 °C y a 4,6 °C en salmón ahumado en frío envasado al vacío.
- La inoculación del salmón ahumado en frío con la cepa láctica disminuyó los valores de pH significativamente, sin embargo esto no afectó adversamente la aceptación del producto por los panelistas.
- La calidad sensorial medida por el olor, firmeza y aceptación general de los filetes de salmón ahumado en frío no se vio afectada negativamente por la inoculación con *C. piscicola* L103, durante los 21 días de almacenamiento a 2,0 °C y a 4,6 °C.
- La diferencia en la temperatura de almacenamiento de los filetes de salmón entre experimentos, afectó significativamente el crecimiento de las BAL y de *L. monocytogenes*, no así el efecto antagonista de *C. piscicola* L103 sobre *L. monocytogenes* L4/00.



## 6. RESUMEN

En este trabajo se estudió la capacidad antagonista de la cepa láctica *Carnobacterium piscicola* L103 en contra de *Listeria monocytogenes* L4/00, además se determinó el efecto del crecimiento de la cepa láctica sobre el pH y las características sensoriales del salmón ahumado en frío almacenado 21 días a 2,0 °C y a 4,6 °C. Para la determinación de la capacidad antagonista, se co-inocularon los trozos de salmón con *L. monocytogenes* en una concentración de  $10^5$  ufc/ml y *C. piscicola* en una concentración de  $10^7$  ufc/ml. En los dos experimentos se observó un efecto bacteriostático de *C. piscicola* sobre *L. monocytogenes*, manteniéndose los recuentos del patógeno en valores cercanos a  $\log 2,0$  ufc/cm<sup>2</sup>. En las determinaciones de pH y de evaluación sensorial, se inocularon trozos de salmón con *C. piscicola* en una concentración de  $10^7$  ufc/ml. La evaluación sensorial contó con 8 panelistas semientrenados, quienes evaluaron los atributos de olor a rancio, picante, ácido/fermentado, amoniacal, además de evaluar la firmeza e indicar su nivel de agrado o desagrado del producto por medio de la aceptación. En ambos experimentos, se visualizó una disminución del pH en los trozos inoculados con la cepa láctica, a diferencia de los controles en los cuales el pH se mantuvo constante. En tanto, en la evaluación sensorial no se observó un efecto adverso de *C. piscicola* sobre los trozos de salmón ahumado, con excepción del atributo olor a ácido/fermentado. No obstante esa percepción no influyó en la aceptación general del producto, que fue calificado con un puntaje sobre el límite de aceptación establecido. Se puede concluir que *C. piscicola* L103 podría ser aplicada eficazmente como bioprotector en contra de *L. monocytogenes* L4/00 en filetes de salmón ahumado en frío, sin afectar adversamente la calidad sensorial de este tipo de producto.

## SUMMARY

In this work the antagonistic capacity of the strain *Carnobacterium piscicola* L103 against *L. monocytogenes* L4/00 was studied, in addition the effect of the growth of the lactic strain on the pH and sensory characteristics of cold-smoked salmon stored 21 days at 2,0 °C and 4,6 °C, was evaluated. In order to determine the antagonistic capacity, a co-inoculation experiment of salmon pieces with *L. monocytogenes* in concentration of  $10^5$  cfu/ml and *C. piscicola* in concentration  $10^7$  cfu/ml was done. In both experiments a bacteriostatic effect of *C. piscicola* on *L. monocytogenes* was observed. The total counts of the pathogen stayed at values close to  $\log 2,0$  cfu/cm<sup>2</sup>. For the pH determination and the sensory evaluation, pieces of salmon were inoculated with *C. piscicola* in a concentration of  $10^7$  cfu/ml. For the sensory test a panel with eight semi-trained judges was used, who evaluated the attributes of odour (rancid, pungent, acid/fermented, amoniacal), the firmness, and general acceptability. In both experiments a decrease of pH was visualized in the pieces inoculated with the lactic strain, while for the controls the pH remained constant. In the sensory evaluation an adverse effect of *C. piscicola* on smoked salmon pieces was not observed, except in the attribute described as acid/fermented odour. Nevertheless, this perception did not influence the general acceptance of the product, which was qualified within the score of the limit of acceptance established. It can be concluded that *C. piscicola* L103 can be an efficient bioprotector against *L. monocytogenes* L4/00 when applied on cold-smoked salmon fillets, without adversely affecting the sensory quality of this type of products.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, M. R. y MOSS, M. O. 2000. Food Microbiology. Second edition. Royal Society of Chemistry. Guilford. 479 p.
- AHN, C. y STILES, M. E. 1990. Plasmid-Associated Bacteriocin Production by a Strain of *Carnobacterium piscicola* from Meat. Appl. Environ. Microbiol. 56 (8): 2503-2510.
- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food, 3 ed.
- ARIZCUN, C., VASSEUR, C. y LABADIE, J. C. 1998. Effect of Several Decontamination Procedures on *Listeria monocytogenes* Growing in Biofilms. J. Food Prot. 61(6): 731-734.
- BEN EMBAREK, P. 1994. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. Int. J. Food Microbiol. 23: 17-34.
- BORQUEZ, P. 2000. Producción Continua y Purificación parcial de la bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* L103 utilizando un fermentador modular. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 82 p.

BOURGEOIS, C. M. y LARPENT, J. P. 1994. Microbiología alimentaria. Volumen II: fermentaciones alimentarias. Ed. Acribia S. A. Zaragoza, España. 366 p.

BUCHANAN, R. L. y BAGI, L. K. 1997. Microbial Competition: Effect of Culture Conditions on the Suppression of *Listeria monocytogenes* Scout A by *Carnobacterium piscicola*. J. Food Prot. 60 (3): 254-261.

BUCHANAN, R. L. y KLAWITTER, L. A. 1992. Characterization of a lactic acid bacterium, *Carnobacterium piscicola* LK5, with activity against *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. J. Food Safety. 12: 199-217.

BUCHANAN, R. L. y KLAWITTER, L. A. 1991. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. Int. J. Food Microbiol. 12: 235-246.

CAPLICE, E. y FITZGERALD, G. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in Food production and preservation. Int. J. Food Microbiol. 50: 131-149.

CHILE, INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN, INN. 1978. NCh 1370/X. Norma Chilena oficial. Carne y productos carneos – Métodos de ensayo – Parte X: Determinación del pH. Primera edición. Inscripción N° 57.321. 4 p.

CHILE. MINISTERIO DE SALUD. 2004. Nuevo reglamento sanitario de los alimentos. Ediciones Publiley. Santiago, Chile. 208 p.

- CISTERNAS, A., LAGOS, N., GALSTUCH, J., GONZALEZ, C., GARCIA, C. y DIAZ, J. 2002. Infección por *Listeria monocytogenes* y embarazo con buen resultado perinatal. Rev. Chil. Obstet. Ginecol. 67 (3): 237-241.
- CORDANO, A. M. y ROCOURT, J. 2001. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Food in Chile. Int. J. Food Microbiol. 70: 175-178.
- DE MARTINIS, E., PUBLIO, M., SANTAROSA, P. y FREITAS, F. 2001. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged brazilian meat and meat products. Braz. J. Microbiol. 32 (1): 1-12.
- DEGNAN, A. J., YOUSEF, A. E. y LUCHANSKY, J. B. 1992. Use of *Pediococcus acidilactici* to control *Listeria monocytogenes* in temperature-abused vacuum-packaged wieners. J. Food Prot. 55: 98-103.
- DELGADO, R. 2001. Efecto de una bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* parcialmente purificada sobre salmón fresco refrigerado. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 142 p.
- DILLON, R. M. y PATEL, T. R. 1992. *Listeria* in Seafoods: A Review. J. Food Prot. 55 (12): 1009-1015.
- DUFFES, F., CORRE, CH., LEROI, F., DOUSSET, X. y BOYAVAL, P. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by In Situ Produced and Semipurified

Bacteriocins of *Carnobacterium spp.* on Vacuum-Packed, Refrigerated Cold-Smoked Salmon. J. Food Prot. 62 (12): 1394-1403.

DUFFES, F., LEROI, F., DOUSSET, X. y BOYAVAL, P. 2000. Use of a bacteriocin producing *Carnobacterium piscicola* strain, isolated from fish, to control *Listeria monocytogenes* development in vacuum-packed cold-smoked salmon stored at 4°C. Sci. Aliments. 20 (1): 153-158.

EKLUND, M. W., POYSKY, F. T., PARANJPYE, R. N., LASHBROOK, L. C., PETERSON, M. E. y PELROY, G. A. 1995. Incidence and Sources of *Listeria monocytogenes* in Cold-Smoked Fishery Products and Processing Plants. J. Food Prot. 58 (5): 502-508.

EINARSSON, H. y LAUZON, H. 1995. Biopreservation of Brined Shrimp (*Pandalus borealis*) by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 61 (2): 669-676.

FARBER, J. M. 1993. Current Research on *Listeria monocytogenes* in Foods: an overview. J. Food Prot. 56 (7): 640-643.

FARBER, J. y PETERKIN, P. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. Rev. 55(3): 476-511.

FENNEMA, O. R. 2000. Química de los Alimentos. Segunda Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1258 p.

- FUCHS, R. S. 1999. *Listeria monocytogenes* – A New Microbiology Hazard in Seafood?. Aquaculture and Biotechnology. Science Publishers, Inc. Plymouth, UK.. 13-32 p.
- GARCIA, T., MARTIN, R., SANZ, B. y HERNANDEZ, P. E. 1995. Extensión de la vida útil de la carne fresca. I: envasado en atmósfera modificadas y utilización de bacterias lácticas y bacteriocinas. Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment. 35 (1): 1-18.
- GARLAND, C. D. 1995. Microbiological quality of aquaculture products with special reference to *Listeria monocytogenes* in Atlantic salmon. Food Australia. 47: 559-563.
- GOMEZ, Y. 2002. Efecto del NaCl, Aceite de Salmón y Temperatura, sobre la Difusión y Capacidad Antagonista de la Bacteriocina de *Carnobacterium piscicola* L103. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 106 p.
- GUYER, S. y JEMMI, T. 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes* during Fabrication and Storage of Experimentally Contaminated Smoked Salmon. Appl. Environ. Microbiol. 57 (5): 1523-1527.
- HAYES, P. R. 1993. Microbiología e higiene de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 369 p.
- HOBBS, B. C. y ROBERTS, D. 1997. Higiene y toxicología de los alimentos. Tercera edición. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 478 p.

HUSS, H. H. 1998. El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. FAO. Roma, Italia. 202 p.

JAY, J.M. 1992. Microbiología moderna de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 804 p.

JEMMI, T. y KEUSCH, A. 1992. Behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage of experimentally contaminated hot-smoked trout. Int. J. Food Microbiol. 15: 339-346.

JOFFRAUD, J. J., LEROI, F., ROY, C. y BERDAGUE, J. L. 2001. Characterisation of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold-smoked salmon. Int. J. Food Microbiol. 66: 175-184.

LAIDLER, L. A. 2001. Microbiological Problems in the Salmon Processing Industry. Farmed Fish Quality. Scotland. 89-95.

LEROI, F. y JOFFRAUD, J. 2000. Salt and smoke simultaneously affect chemical and sensory quality of cold-smoked salmon during 5°C storage predicted using factorial design. J. Food Prot. 63 (9): 1222-1227.

LEROI, F., JOFFRAUD, J., CHEVALIER, F. y CARDINAL, M. 1998. Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. Int. J. Food Microbiol. 39: 111-121.



- LEROI, F., ARBEY, N., JOFFRAUD, J. y CHEVALIER, F. 1996. Effect of inoculation with lactic acid bacteria on extending the shelf-life of vacuum-packed cold smoked salmon. *Int. J. Food Sci. and Tech.* 31: 497-504.
- LUNDÉN, J., MIETTINEN, M., AUTIO, T. y KORKEALA, H. 2000. Persistent *Listeria monocytogenes* Strains Show Enhanced Adherence to Food Contact Surface after Short Contact Times. *J. Food Prot.* 63 (9): 1204-1207.
- LUPPENS, S., ABEE, T. y OOSTEROM, J. 2001. Effect of Benzalkonium Chloride on Viability and Energy Metabolism in Exponential-and Stationary-Growth-Phase Cells of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 64 (4): 476-482.
- MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M. y PARKER, J. 1998. *Biología de los microorganismos*. Edición española. Madrid, España. 986 p.
- MANZANARES, A. 1997. Bacterias Beneficiosas al Hombre. *La alimentación Latinoamericana*. Nº 218: 59-65.
- McCALLUM, P. D. y ARCHIBALD, B. S. 1994. Seminario sobre la cultura de la trucha: manejo de procesamiento y mercadeo. Canadá. 80 p.
- MCCARTHY, S. A. 1997. Incidence and Survival of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Seafood Products. *J. Food Prot.* 60 (4): 372-376.

- McMULLEN, L. y STILES, M. 1996. Potencial for use of bacteriocin-producing lactic Acid bacteria in the preservation of meats. J. Food Prot. (Suppl.): 64-79.
- MEDINA, M., GAYA, P. y NUÑEZ, M. 1992. Bacteriocinas producidas por bacterias lácticas. Revista Española de Lechería. Febrero: 29-32.
- MONTVILLE, T. y WINKOWSKI, K. 1997. Biologically based preservation System and probiotic bacteria. En: Food microbiology: fundamentals and frontiers. Editorial American Society for Microbiology. Washington D. C., Estados Unidos. 557-577 p.
- MORRIS, T. R. 1999. Experimental Design and Analysis in Animal Sciences. Published for CABI. Nueva York, Estados Unidos. 208 p.
- NILSSON, L., GRAM, L. y HUSS, H. H. 1999. Growth Control of *Listeria monocytogenes* on Cold-Smoked Salmon Using a Competitive Lactic Acid Bacteria Flora. J. Food Prot. 62 (4): 336-342.
- NØRRUNG, B., ANDERSEN, J. K. y SCHLUNDT, J. 1999. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. Int. J. Food Microbiol. 53: 195-203.
- PALUDAN-MÜLLER, CH., DELGAARD, P., HUSS, H. H. y GRAM, L. 1998. Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5°C. Int. J. Food Microbiol. 39: 155-166.

- PELROY, G. A., PETERSON, M. E., HOLLAND, P. J. y EKLUND, M. W. 1994. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Cold-process (Smoked) Salmon by Sodium lactate. J. Food Prot. 57 (2): 108-113.
- PHAN-THANH, L., MAHOUI, F. y ALIGÉ, S. 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 55: 121-126.
- PILET, M. F., DOUSSET, X., BARRE, R., NOVEL, G., DESMAZEAUD, M. y PIARD, J. C. 1995. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 58: 256-262.
- PRIMO, E. 1997. Química de los alimentos. Ed. Síntesis. Madrid, España. 461 p.
- REQUENA, T. y PELAEZ, C. 1995. Revisión: actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment. 35 (1): 19-44.
- RØRVIK, L. M. 2000. *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. Int. J. Food Microbiol. 62: 183-190.
- RODRIGUEZ, C. 2002. Efecto de una Bacteriocina de *Carnobacterium piscicola*, con Antagonismo en Contra de *Listeria monocytogenes*, Sobre la Conservación de Trucha ahumada. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 99 p.

- SCHILLINGER, U. y LÜCKE, F. 1991. El empleo de bacterias lácticas como cultivos protectores en productos cárnicos. *Fleischwirtsch* (español) 1:35-40.
- SCHILLINGER, U., STILES, M. E. y HOLZPAPFEL, W. H. 1993. Bacteriocin production by *C. piscicola* LV61. *Int. J. Food Microbiol.* 20 (3): 131-147.
- SCHLEGEL, H. G. 1997. *Microbiología General*. Nueva Edición. Ediciones Omega. Barcelona, España. 654 p.
- SCHLESINGER, G. 1993. Estudio de perecibilidad de salmón fresco envasado al vacío. *Alimentos*. 18 (2): 24-31.
- SCHÖBITZ, R., RADDATZ, M., TAMAYO, R. y MIRANDA, C. 1995. Actividad antibacteriana de cepas lácticas aisladas a partir de carne envasada al vacío. *Fleischwirtsch* (español) 2: 12-19.
- SCHÖBITZ, R., ZAROR, T., LEON, O. y COSTA, M. 1999. A Bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* for the control of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged meat. *Food Microbiol.* 16: 249-255.
- STANIER, R. Y., INGRAHAM, J. L., WHEELIS, M. L. y PAINTER, P. R. 1996. *Microbiología*. Segunda edición. Ed. Reverté. Barcelona, España. 750 p.
- STOFFELS, G., SAHL, H. y GUDMUNSDOTTIR, A. 1993. Carnocin U149, a potencial biopreservative produced by *Carnobacterium piscicola*: large

scale purification and activity against various Gram-positive bacteria including *Listeria sp.* Int. J. Food Microbiol. 20: 199-210.

VAZ-VELHO, M., DUARTE, G. y GIBBS, P. 1998. Occurrence of *Listeria* spp. in salmon-trout (*Onchorhyncus mykiss*) and salmon (*Salmo salar*). Food Sci. and Tech. Int. 4: 121-125.

VENEGAS, N., MARAMBIO, E., INSUNZA, M., SOTO, A. y ARRIETA, A. 1990. Control microbiológico de alimentos. Publ. Misc. Agr. Nº32. Univ. De Chile. Fac. Cs. Agr. y For. Santiago, Chile. 135 p.

VILLALOBOS, K. 2000. *Listeria monocytogenes* en productos pesqueros elaborados y su relación con indicadores bacterianos. Tesis de grado. Escuela de Pedagogía. Facultad de Filosofía y Humanidades. Universidad Austral de Chile. 54 p.

WILKINSON, B. J. y JONES, D. 1977. A numerical taxonomic survey of *Listeria* and related bacteria. J. Gen. Microbiol. 98: 399-421.

# **ANEXOS**

## ANEXO 1

### Composición del medio de cultivo D-MRS y Soya Trypticasa (S. T.)

Ingredientes	D-MRS <sup>1</sup> g/L	S. T. <sup>2</sup> g/L
Proteosa peptona N° 3 (Difco)	10	-----
Extracto de carne (BBL®)	10	-----
Extracto de levadura (Merck)	5	-----
Dextrosa	-----	2,5
Tween 80 (BBL®)	1	-----
Citrato de amonio (W & Z)	2	-----
*Sulfato de Mg x 7 H <sub>2</sub> O (W & Z)	0,1	-----
*Sulfato de Mn x 1 H <sub>2</sub> O (W & Z)	0,05	-----
Fosfato dipotásico (W & Z)	2	2,5
Triptona	-----	17
Cloruro de sodio	-----	5
Sacarosa (Merck)	20	-----
Agua destilada	1.000 ml	1.000 ml
pH final	6,5	7,2

**\* Solución salina: Sulfato de Magnesio 10g, Sulfato de Manganeso 5g en 100 ml de agua destilada. Se usa 1 ml por litro de medio.**

<sup>1</sup> FUENTE: SCHILLINGER y STILES, 1993

<sup>2</sup> FUENTE: WILKINSON y JONES, 1977.

## ANEXO 2

### Estandarización de las características de la cepa *C. piscicola* L103, utilizada en el estudio

Tiempo h	Recuento Ufc/ml	Absorbancia 660 nm	Actividad UA/ml <sup>1</sup>	Actividad UA/ml <sup>2</sup>
18	9,2 x 10 <sup>8</sup>	1,384	100	NR
<b>24</b>	<b>1,2 x 10<sup>9</sup></b>	<b>1,128</b>	<b>200</b>	<b>400</b>
27	5,2 x 10 <sup>8</sup>	1,104	100	NR

<sup>1</sup> Dilución 10<sup>7</sup> ufc/ml de *L. monocytogenes* L4/00 en el césped.

<sup>2</sup> Dilución 10<sup>5</sup> ufc/ml de *L. monocytogenes* L4/00 en el césped.

NR: No Realizado.



**ANEXO 3**  
**Determinación de la actividad de la bacteriocina producida por**  
***C. piscicola* L103.**

De un cultivo de 24 h de *C. piscicola* L103 en caldo D-MRS, incubado bajo agitación constante de aproximadamente 100 rpm a 25°C, se obtuvo el sobrenadante por centrifugación a 7.700 x g por 15 min a 4°C. Al sobrenadante se le ajustó el pH a 6,5 con NaOH 1N para eliminar el efecto de inhibición de la cepa debido a la acidez. El sobrenadante se esterilizó pasándolo por un filtro de 0,22 µm (Millipore Corporation, Bedford, M.A) para eliminar las células lácticas viables aún presentes.

Para comprobar la actividad de la bacteriocina se empleó la técnica de la gota sobre césped, para lo cual se utilizaron placas con agar ST y un césped de *L. monocytogenes* L4/00. Para la preparación del césped se inocularon 7 ml de agar ST semiblando (0,75% de agar) con 0,7 ml de un cultivo de 18 h de *L. monocytogenes*, diluido 1000 veces en buffer fosfato 0,05 M a pH 7,0 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), teniendo una concentración final de *L. monocytogenes* sobre el césped de 10<sup>6</sup> ufc/ml.

Sobre el césped colocaron 20 µL de la bacteriocina esterilizada por filtración sin diluir (control) y 20 µL de diluciones seriadas de ésta en buffer fosfato 0,05 M a pH 7,0 (1: 1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32). Las placas se secaron en una cámara de flujo laminar por 30 minutos y posteriormente fueron incubadas a 25°C por 24 h en una atmósfera con 10% de CO<sub>2</sub>.

Para la lectura se observó la formación de halos de inhibición en la zona donde fue inoculada la bacteriocina. Para el cálculo de la actividad se consideró una prueba positiva, cuando el halo se presentaba en forma nítida, con bordes delimitados, transparente y sin desarrollo en el interior. Por el contrario se

consideró como prueba negativa la ausencia completa de un halo de inhibición. Las unidades de actividad (UA/ml) se obtuvieron a partir del valor recíproco de la mayor dilución que presentó un halo de inhibición de la cepa indicadora, expresado por ml.

## ANEXO 4

### Área de los trozos de salmón ahumado en frío, utilizados para los recuentos microbiológicos del experimento 2

Tiempo	Tratamientos		
	Control (T1)	Buffer fosfato (T2)	<i>L.monocytogenes</i> (T3)
	Área (cm <sup>2</sup> )	Área (cm <sup>2</sup> )	Área (cm <sup>2</sup> )
0	25,00	25,00	25,00
	25,00	25,00	25,00
	25,00	25,00	25,00
7	18,13	18,65	25,57
	9,70	19,64	25,82
	12,15	16,25	24,54
14	22,99	16,77	26,88
	20,67	23,09	27,30
	21,19	22,94	26,78
21	22,40	23,42	28,10
	20,93	15,42	25,15
	19,67	16,76	22,64
Tiempo	<i>Listeria + C. piscicola</i> (T4)		<i>C. piscicola</i> (T5)
	Área (cm <sup>2</sup> )		Área (cm <sup>2</sup> )
0	25,00		25,00
	25,00		25,00
	25,00		25,00
7	25,02		22,38
	25,56		24,41
	23,23		23,06
14	25,06		18,81
	24,41		16,33
	27,17		23,13
21	26,10		19,78
	27,68		17,34
	26,52		21,53

\* En el **experimento 1**, el área de los trozos de salmón en todos los tratamientos fue de 25 cm<sup>2</sup>.

## ANEXO 5

### Ficha de evaluación sensorial

Nombre \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

A continuación se le presentarán 3 muestras de salmón ahumado en frío a temperatura ambiente de manera separada, de modo de evaluar independientemente en cada una los atributos de Olor, y además se le presentarán 3 muestras a temperatura de refrigeración para evaluar Textura. Evalúe las características sensoriales indicadas y escriba el valor de su percepción de acuerdo a la escala de calificación, pudiendo incluir valores intermedios en la escala de calificación si así lo considera.

### ANÁLISIS DESCRIPTIVO

Atributos	Calificación	Muestras		
		$\beta$	$\pi$	$\delta$
<b>OLOR</b>				
Rancidez	1. Inexistente			
	3. Suavemente perceptible			
	5. Regular			
	7. Intenso			
	9. Extremadamente intenso			
Picante	1. Inexistente			
	3. Suavemente perceptible			
	5. Regular			
	7. Intenso			
	9. Extremadamente intenso			
Ácido/fermentado	1. Inexistente			
	3. Suavemente perceptible			
	5. Regular			
	7. Intenso			
	9. Extremadamente intenso			

Atributos	Calificación	Muestras		
<b>OLOR</b>		$\beta$	$\pi$	$\delta$
Amoniaca	1. Inexistente			
	3. Suavemente perceptible			
	5. Regular			
	7. Intenso			
	9. Extremadamente intenso			
Otros atributos de	1. Inexistente			
Olor, señálelos	3. Suavemente perceptible			
	5. Regular			
	7. Intenso			
	9. Extremadamente intenso			
<b>TEXTURA</b>				
Firmeza	1. Extremadamente blando			
	3. Blando			
	5. Regular			
	7. Firme			
	9. Extremadamente firme			
Aceptación general	1. Me disgusta extremadamente			
( Olor / Textura)	2. Me disgusta mucho			
	3. Me disgusta moderadamente			
	4. Me disgusta ligeramente			
	5. No me gusta ni me disgusta			
	6. Me gusta ligeramente			
	7. Me gusta moderadamente			
	8. Me gusta mucho			
	9. Me gusta extremadamente			

Observaciones : \_\_\_\_\_

## ANEXO 6

### Recuento de BAL (log ufc/cm<sup>2</sup>) en los trozos de salmón ahumado en frío y análisis estadístico de los dos experimentos

EXPERIMENTO 1										
Tiempo	Control (T1)					Buffer fosfato (T2)				
	Replicas			Prom.	Desv.st.	Replicas			Prom.	Desv.st.
0	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	-----	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	-----
7	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	-----	4,43	4,39	3,68	<b>4,17</b>	0,42
14	4,18	4,12	4,00	<b>4,10</b>	0,09	5,00	4,64	4,90	<b>4,85</b>	0,18
21	4,38	4,25	5,00	<b>4,54</b>	0,40	5,45	4,86	4,86	<b>5,06</b>	0,34
Tiempo	<i>L. monocytogenes</i> + <i>C. piscicola</i> (T4)					<i>C. piscicola</i> (T5)				
	Replicas			Prom.	Desv.st.	Replicas			Prom.	Desv.st.
0	NR <sup>1</sup>	NR	NR	-----	-----	5,60	5,00	4,81	<b>5,14</b>	0,41
7	NR	NR	NR	-----	-----	6,81	6,43	6,26	<b>6,50</b>	0,28
14	NR	NR	NR	-----	-----	6,56	6,51	6,49	<b>6,52</b>	0,03
21	NR	NR	NR	-----	-----	6,38	6,48	6,83	<b>6,56</b>	0,24

<sup>1</sup> NR: no realizado.

EXPERIMENTO 2										
Tiempo	Control (T1)					Buffer fosfato (T2)				
	Replicas			Prom.	Desv.st.	Replicas			Prom.	Desv.st.
0	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	-----	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	-----
7	< 0,10	< 0,10	< 0,10	< 0,10	-----	4,05	3,96	4,03	<b>4,01</b>	0,05
14	4,19	4,14	4,09	<b>4,14</b>	0,05	4,14	4,52	4,36	<b>4,34</b>	0,19
21	4,96	5,05	5,04	<b>5,02</b>	0,05	5,03	5,26	5,32	<b>5,20</b>	0,15
Tiempo	<i>L. monocytogenes</i> + <i>C. piscicola</i> (T4)					<i>C. piscicola</i> (T5)				
	Replicas			Prom.	Desv.st.	Replicas			Prom.	Desv.st.
0	4,68	4,90	4,75	<b>4,78</b>	0,11	5,33	5,48	5,36	<b>5,39</b>	0,08
7	6,22	6,34	6,40	<b>6,32</b>	0,09	6,83	6,60	6,64	<b>6,69</b>	0,12
14	6,64	7,35	7,18	<b>7,06</b>	0,37	7,35	7,18	7,25	<b>7,26</b>	0,08
21	7,13	7,31	7,21	<b>7,22</b>	0,09	7,49	7,34	7,38	<b>7,40</b>	0,08

Análisis de varianza para recuento de BAL en salmón ahumado en frío, para los cuatro tratamientos, en ambos experimentos

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: BAL

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	1670,760	1	1670,760	2892,528	,000
	Error	1,733	3	,578 <sup>a</sup>		
TRAT	Hipótesis	273,216	3	91,072	157,669	,001
	Error	1,733	3	,578 <sup>a</sup>		
TIEMPO	Hipótesis	142,738	3	47,579	956,495	,000
	Error	3,233	65	4,974E-02 <sup>b</sup>		
EXP(TRAT)	Hipótesis	1,733	3	,578	11,612	,000
	Error	3,233	65	4,974E-02 <sup>b</sup>		
TRAT * TIEMPO	Hipótesis	62,227	9	6,914	138,996	,000
	Error	3,233	65	4,974E-02 <sup>b</sup>		

a. MS(EXP(TRAT))

b. MS(Error)

Análisis de varianza para recuento de BAL en salmón ahumado en frío, por tratamiento

Tratamientos	Significación
Control (T1)	0,000
Buffer fosfato (T2)	0,000
<i>L. monocytogenes</i> + <i>C. piscicola</i> (T4)	0,000
<i>C. piscicola</i> (T5)	0,000

## Subconjuntos homogéneos

- Control (T1)**

### BAL

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
11,00	3	,1000			
12,00	3	,1000			
71,00	3	,1000			
72,00	3	,1000			
141,00	3		4,1000		
142,00	3		4,1400	4,1400	
211,00	3			4,5433	
212,00	3				5,0167
Significación		1,000	1,000	,062	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 2,175E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

- Buffer fosfato (T2)**

### BAL

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
11,00	3	,1000			
12,00	3	,1000			
72,00	3		4,0133		
71,00	3		4,1667		
142,00	3		4,3400	4,3400	
141,00	3			4,8467	4,8467
211,00	3				5,0567
212,00	3				5,2033
Significación		1,000	,623	,161	,524

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 4,883E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.



- ***L. monocytogenes + C. piscicola (T4)***

**BAL**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto		
		1	2	3
,00	3	4,7767		
7,00	3		6,3200	
14,00	3			7,0567
21,00	3			7,2167
Significación		1,000	1,000	,775

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 4,165E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

- ***C. piscicola (T5)***

**BAL**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
11,00	3	5,1367			
12,00	3	5,3900			
71,00	3		6,5000		
141,00	3		6,5200		
211,00	3		6,5633		
72,00	3		6,6900	6,6900	
142,00	3			7,2600	7,2600
212,00	3				7,4033
Significación		,796	,941	,058	,987

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 4,265E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

Análisis de varianza para recuento de BAL en salmón ahumado en frío por día de análisis

Tiempo	Valor P
0	0,000
7	0,000
14	0,000
21	0,000

Subconjuntos homogéneos

- **Día 0**

**BAL**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TRAT	N	Subconjunto		
		1	2	3
11,00	3	,1000		
12,00	3	,1000		
21,00	3	,1000		
22,00	3	,1000		
42,00	3		4,7767	
51,00	3		5,1367	5,1367
52,00	3			5,3900
Significación		1,000	,173	,517

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 2,700E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

- **Día 7**

**BAL**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TRAT	N	Subconjunto		
		1	2	3
11,00	3	,1000		
12,00	3	,1000		
22,00	3		4,0133	
21,00	3		4,1667	
42,00	3			6,3200
51,00	3			6,5000
52,00	3			6,6900
Significación		1,000	,960	,329

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 4,044E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

- **Día 14**

**BAL**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TRAT	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
11,00	3	4,1000			
12,00	3	4,1400			
22,00	3	4,3400			
21,00	3		4,8467		
51,00	3			6,5200	
42,00	3				7,0567
52,00	3				7,2600
Significación		,668	1,000	1,000	,803

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 3,255E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

- **Día 21**

**BAL**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TRAT	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
11,00	3	4,5433			
12,00	3	5,0167	5,0167		
21,00	3	5,0567	5,0567		
22,00	3		5,2033		
51,00	3			6,5633	
42,00	3				7,2167
52,00	3				7,4033
Significación		,162	,948	1,000	,948

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 5,322E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

## ANEXO 7

### Recuento de *L. monocytogenes* (log ufc/cm<sup>2</sup>) en los trozos de salmón ahumado en frío y análisis estadístico de los dos experimentos

EXPERIMENTO 1										
Tiempo	Control (T1)					Buffer fosfato (T2)				
	Replicas			Prom.	Desv.st.	Replicas			Prom.	Desv.st.
0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-----	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-----
7	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-----	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-----
14	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-----	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-----
21	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-----	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-----
Tiempo	<i>L. monocytogenes</i> (T3)					<i>L. monocytogenes</i> + <i>C. piscicola</i> (T4)				
	Replicas			Prom.	Desv.st.	Replicas			Prom.	Desv.st.
0	2,90	3,08	2,60	<b>2,86</b>	0,24	2,86	2,78	2,86	<b>2,83</b>	0,05
7	2,23	2,86	2,81	<b>2,63</b>	0,35	1,60	2,02	1,60	<b>1,74</b>	0,24
14	2,68	2,86	2,60	<b>2,71</b>	0,13	1,60	1,68	1,60	<b>1,63</b>	0,05
21	3,92	4,54	4,08	<b>4,18</b>	0,32	2,06	2,11	1,88	<b>2,02</b>	0,12

EXPERIMENTO 2										
Tiempo	Control (T1)					Buffer fosfato (T2)				
	Replicas			Prom.	Desv.st.	Replicas			Prom.	Desv.st.
0	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-----	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-----
7	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-----	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-----
14	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-----	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-----
21	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-----	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	-----
Tiempo	<i>L. monocytogenes</i> (T3)					<i>L. monocytogenes</i> + <i>C. piscicola</i> (T4)				
	Replicas			Prom.	Desv.st.	Replicas			Prom.	Desv.st.
0	2,68	2,72	2,92	<b>2,77</b>	0,13	2,37	2,34	2,53	<b>2,41</b>	0,10
7	5,24	5,04	5,29	<b>5,19</b>	0,13	1,96	2,04	1,75	<b>1,92</b>	0,15
14	6,87	6,68	6,99	<b>6,85</b>	0,16	2,29	2,25	1,98	<b>2,17</b>	0,17
21	7,37	7,03	6,92	<b>7,11</b>	0,23	2,42	2,26	2,33	<b>2,34</b>	0,08

Análisis de varianza para recuento de *L. monocytogenes* en salmón ahumado en frío, para los dos tratamientos en ambos experimentos

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: LISTERIA

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	494,597	1	494,597	28,921	,033
	Error	34,204	2	17,102 <sup>a</sup>		
TRAT	Hipótesis	55,771	1	55,771	3,261	,213
	Error	34,204	2	17,102 <sup>a</sup>		
TIEMPO	Hipótesis	10,351	3	3,450	8,132	,000
	Error	16,124	38	,424 <sup>b</sup>		
EXP(TRAT)	Hipótesis	34,204	2	17,102	40,304	,000
	Error	16,124	38	,424 <sup>b</sup>		
TRAT * TIEMPO	Hipótesis	18,298	3	6,099	14,375	,000
	Error	16,124	38	,424 <sup>b</sup>		

a. MS(EXP(TRAT))

b. MS(Error)

Análisis de varianza para recuento de *L. monocytogenes* en salmón ahumado en frío, por tratamiento en ambos experimentos

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: LISTERIA

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	74,603 <sup>a</sup>	7	10,658	204,823	,000
Intersección	441,270	1	441,270	8480,516	,000
TIEMPO	74,603	7	10,658	204,823	,000
Error	,833	16	5,203E-02		
Total	516,706	24			
Total corregida	75,436	23			

a. R cuadrado = ,989 (R cuadrado corregida = ,984)

- L. monocytogenes* (T3)**

**LISTERIA**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
71,00	3	2,6333			
141,00	3	2,7133			
12,00	3	2,7733			
11,00	3	2,8600			
211,00	3		4,1800		
72,00	3			5,1900	
142,00	3				6,8467
212,00	3				7,1067
Significación		,915	1,000	1,000	,846

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 5,203E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

Subconjuntos homogéneos

- ***L. monocytogenes + C. piscicola (T4)***

### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: LISTERIA

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	3,250 <sup>a</sup>	7	,464	25,539	,000
Intersección	109,099	1	109,099	6001,304	,000
TIEMPO	3,250	7	,464	25,539	,000
Error	,291	16	1,818E-02		
Total	112,640	24			
Total corregida	3,541	23			

a. R cuadrado = ,918 (R cuadrado corregida = ,882)

### LISTERIA

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
141,00	3	1,6267					
71,00	3	1,7400	1,7400				
72,00	3	1,9167	1,9167	1,9167			
211,00	3		2,0167	2,0167	2,0167		
142,00	3			2,1733	2,1733	2,1733	
212,00	3				2,3367	2,3367	
12,00	3					2,4133	
11,00	3						2,8333
Significación		,213	,257	,335	,136	,411	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 1,818E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

Subconjuntos homogéneos



Análisis de varianza para recuento de *L. monocytogenes* en salmón ahumado en frío por día de análisis, para los dos tratamientos

Tiempo	Valor P
0	0,020
7	0,000
14	0,000
21	0,000

Subconjuntos homogéneos

- **Día 0**

### LIST\_0

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

T34	N	Subconjunto	
		1	2
42,00	3	2,4133	
32,00	3	2,7733	2,7733
41,00	3		2,8333
31,00	3		2,8600
Significación		,069	,888

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 2,197E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

- **Día 7**

**LIST\_7**

DHS de Tukey <sup>a,b</sup>

T34	N	Subconjunto		
		1	2	3
41,00	3	1,7400		
42,00	3	1,9167		
31,00	3		2,6333	
32,00	3			5,1900
Significación		,796	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 5,534E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

- **Día 14**

**LIST\_14**

DHS de Tukey <sup>a,b</sup>

T34	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
41,00	3	1,6267			
42,00	3		2,1733		
31,00	3			2,7133	
32,00	3				6,8467
Significación		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 1,818E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

- **Día 21**

**LIST21**

DHS de Tukey <sup>a,b</sup>

T34	N	Subconjunto		
		1	2	3
41,00	3	2,0167		
42,00	3	2,3367		
31,00	3		4,1800	
32,00	3			7,1067
Significación		,320	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 4,493E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000

b. Alfa = ,05.

## ANEXO 8

### Valores de pH en las muestras de salmón ahumado en frío y análisis estadístico de los dos experimentos

<b>EXPERIMENTO 1</b>								
Tiempo	<b>Control (T1)</b>				<b>Buffer fosfato (T2)</b>			
	Replicas		Prom.	Desv. stand	Replicas		Prom.	Desv. stand
0	6,25	6,24	6,25	0,01	6,25	6,23	6,24	0,01
7	6,24	6,23	6,24	0,01	6,24	6,24	6,24	0,00
14	6,23	6,24	6,24	0,01	6,23	6,24	6,24	0,01
21	6,23	6,23	6,23	0,00	6,23	6,23	6,23	0,00

Tiempo	<b><i>C. piscicola</i> (T5)</b>			
	Replicas		Prom.	Desv. stand
0	6,24	6,25	6,25	0,01
7	6,23	6,22	6,23	0,01
14	6,20	6,20	6,20	0,00
21	6,18	6,18	6,18	0,00

<b>EXPERIMENTO 2</b>								
Tiempo	<b>Control (T1)</b>				<b>Buffer fosfato (T2)</b>			
	Replicas		Prom.	Desv. stand	Replicas		Prom.	Desv. stand
0	6,25	6,24	6,24	0,01	6,25	6,25	6,25	0,00
7	6,24	6,24	6,24	0,00	6,24	6,25	6,25	0,01
14	6,23	6,24	6,24	0,01	6,23	6,24	6,24	0,01
21	6,23	6,23	6,23	0,00	6,23	6,24	6,24	0,01

Tiempo	<b><i>C. piscicola</i> (T5)</b>			
	Replicas		Prom.	Desv. stand
0	6,25	6,25	6,25	0,00
7	6,12	6,10	6,11	0,01
14	6,05	6,05	6,05	0,00
21	6,00	6,00	6,00	0,00

Análisis de varianza para las mediciones de pH en salmón ahumado en frío, para los tres tratamientos, en ambos experimentos

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: PH

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	1851,698	1	1851,698	129019,4	,002
	Error	1,435E-02	1	1,435E-02 <sup>a</sup>		
TRAT	Hipótesis	6,883E-02	2	3,441E-02	2,015	,332
	Error	3,415E-02	2	1,708E-02 <sup>b</sup>		
TIEMPO	Hipótesis	2,541E-02	3	8,469E-03	3,575	,162
	Error	7,106E-03	3	2,369E-03 <sup>c</sup>		
EXP	Hipótesis	1,435E-02	1	1,435E-02	,828	,458
	Error	3,505E-02	2,023	1,733E-02 <sup>d</sup>		
TRAT * TIEMPO	Hipótesis	3,074E-02	6	5,123E-03	2,418	,153
	Error	1,271E-02	6	2,119E-03 <sup>e</sup>		
TRAT * EXP	Hipótesis	3,415E-02	2	1,708E-02	8,060	,020
	Error	1,271E-02	6	2,119E-03 <sup>e</sup>		
TIEMPO * EXP	Hipótesis	7,106E-03	3	2,369E-03	1,118	,413
	Error	1,271E-02	6	2,119E-03 <sup>e</sup>		
TRAT * TIEMPO * EXP	Hipótesis	1,271E-02	6	2,119E-03	53,526	,000
	Error	9,500E-04	24	3,958E-05 <sup>f</sup>		

a. MS(EXP)

b. MS(TRAT \* EXP)

c. MS(TIEMPO \* EXP)

d.  $MS(TRAT * EXP) + MS(TIEMPO * EXP) - MS(TRAT * TIEMPO * EXP)$

e. MS(TRAT \* TIEMPO \* EXP)

f. MS(Error)

Análisis de varianza para mediciones de pH en salmón ahumado en frío por día de análisis

Tiempo	Significación
0	0,777
7	0,000
14	0,000
21	0,000

Subconjuntos homogéneos

- **Día 7**

### PH\_7

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TRAT_7	N	Subconjunto	
		1	2
52,00	2	6,1100	
51,00	2		6,2250
11,00	2		6,2350
12,00	2		6,2400
21,00	2		6,2400
22,00	2		6,2450
Significación		1,000	,225

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 5,833E-05.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Día 14**

**PH\_14**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TRAT_14	N	Subconjunto		
		1	2	3
52,00	2	6,0500		
51,00	2		6,2000	
11,00	2			6,2350
12,00	2			6,2350
21,00	2			6,2350
22,00	2			6,2350
Significación		1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 3,333E-05.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Día 21**

**PH\_21**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TRAT_21	N	Subconjunto		
		1	2	3
52,00	2	6,0000		
51,00	2		6,1800	
11,00	2			6,2300
12,00	2			6,2300
21,00	2			6,2300
22,00	2			6,2350
Significación		1,000	1,000	,559

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 8,333E-06.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

## ANEXO 9

### Calificaciones promedio obtenidas de la evaluación sensorial de salmón ahumado en frío, para cada atributo y análisis estadístico en ambos paneles sensoriales

Tiempo	<b>RANCIDEZ</b>											
	<b>Control (T1)</b>				<b>Buffer fosfato (T2)</b>				<b><i>C. piscicola</i> (T5)</b>			
	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2
0	1,56 <sup>1</sup>	0,87	1,75	1,18	1,31	0,70	1,91	0,93	1,19	0,40	1,75	1,39
7	2,06	1,48	1,94	0,75	1,81	1,22	2,00	1,59	1,44	0,81	1,75	1,39
14	2,19	2,01	2,38	1,78	2,59	2,32	2,09	1,37	1,94	1,48	2,00	1,10
21	3,16	2,47	2,63	1,49	2,69	1,92	3,28	1,03	2,19	1,83	2,28	1,21

<sup>1</sup> Calificación corresponde al promedio de la evaluación de 8 panelistas de dos sesiones realizadas.

Tiempo	<b>PICANTE</b>											
	<b>Control (T1)</b>				<b>Buffer fosfato (T2)</b>				<b><i>C. piscicola</i> (T5)</b>			
	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2
0	1,38 <sup>1</sup>	0,81	1,38	0,72	1,25	0,58	1,41	0,71	1,31	1,01	1,69	1,01
7	1,69	1,54	1,88	0,81	1,88	1,59	1,75	1,06	1,53	1,15	1,72	1,18
14	1,88	1,26	2,13	1,15	2,09	1,37	1,75	1,06	2,03	1,53	2,25	1,76
21	1,97	1,16	2,19	1,76	2,22	1,59	2,38	1,88	2,28	1,79	2,25	1,76

<sup>1</sup> Calificación corresponde al promedio de la evaluación de 8 panelistas de dos sesiones realizadas.

Tiempo	<b>ÁCIDO/FERMENTADO</b>											
	<b>Control (T1)</b>				<b>Buffer fosfato (T2)</b>				<b><i>C. piscicola</i> (T5)</b>			
	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2
0	1,56 <sup>1</sup>	1,36	1,94	0,93	1,25	0,58	1,81	1,11	1,44	1,09	2,41	1,43
7	1,78	0,98	2,69	0,93	1,63	0,81	1,81	1,11	1,69	1,20	2,81	1,59
14	2,06	1,18	2,72	1,21	2,03	1,04	2,81	1,97	2,06	1,44	3,56	1,49
21	2,47	1,48	3,03	1,16	2,16	1,21	3,00	1,68	2,75	1,77	5,13	1,02

<sup>1</sup> Calificación corresponde al promedio de la evaluación de 8 panelistas de dos sesiones realizadas.



Tiempo	<b>AMONIACAL</b>											
	<b>Control (T1)</b>				<b>Buffer fosfato (T2)</b>				<b><i>C. piscicola</i> (T5)</b>			
	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2
0	1,19 <sup>1</sup>	0,54	1,06	0,25	1,31	0,70	1,09	0,27	1,19	0,40	1,09	0,27
7	1,38	0,72	1,19	0,40	1,31	1,01	1,28	0,52	1,19	0,54	1,25	0,58
14	1,47	1,20	1,25	0,45	1,50	0,82	1,34	0,70	1,28	0,58	1,25	0,58
21	1,81	1,76	1,41	0,76	1,63	1,26	1,31	0,60	1,47	1,28	1,56	1,26

<sup>1</sup> Calificación corresponde al promedio de la evaluación de 8 panelistas de dos sesiones realizadas.

Tiempo	<b>FIRMEZA</b>											
	<b>Control (T1)</b>				<b>Buffer fosfato (T2)</b>				<b><i>C. piscicola</i> (T5)</b>			
	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2
0	6,56 <sup>1</sup>	1,26	6,47	0,46	6,50	0,97	6,28	0,97	6,75	0,95	6,13	1,09
7	5,91	1,86	5,84	1,41	6,06	1,48	5,72	1,44	6,34	1,01	5,88	1,50
14	5,81	1,56	5,69	1,39	5,66	1,80	5,59	1,17	6,00	1,75	5,56	1,46
21	5,31	1,82	5,56	1,26	5,56	1,49	5,34	1,35	5,69	1,58	5,50	0,73

<sup>1</sup> Calificación corresponde al promedio de la evaluación de 8 panelistas de dos sesiones realizadas.

Tiempo	<b>ACEPTACIÓN</b>											
	<b>Control (T1)</b>				<b>Buffer fosfato (T2)</b>				<b><i>C. piscicola</i> (T5)</b>			
	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2	Panel 1	D. E. 1	Panel 2	D. E. 2
0	6,46 <sup>1</sup>	1,28	6,59	0,76	6,93	1,22	6,19	1,52	7,02	1,35	6,09	1,29
7	5,84	0,91	6,09	1,29	6,11	1,10	5,78	0,84	6,03	1,55	5,63	1,67
14	5,56	1,38	5,91	0,82	5,50	1,75	5,44	1,15	5,97	1,94	5,53	0,96
21	5,69	1,47	5,38	2,10	5,49	1,59	5,19	1,97	5,94	1,88	5,00	0,97

<sup>1</sup> Calificación corresponde al promedio de la evaluación de 8 panelistas de dos sesiones realizadas.

Análisis de varianza para la evaluación sensorial en salmón ahumado en frío para los tres tratamientos, por atributo en ambos experimentos

### a) Rancidez

#### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: RANCIDEZ

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	207,626	1	207,626	1330,276	,000
	Error	,468	3	,156 <sup>a</sup>		
TRAT	Hipótesis	1,651	2	,826	5,290	,104
	Error	,468	3	,156 <sup>a</sup>		
TIEMPO	Hipótesis	8,591	3	2,864	26,910	,000
	Error	3,512	33	,106 <sup>b</sup>		
EXP(TRAT)	Hipótesis	,468	3	,156	1,467	,241
	Error	3,512	33	,106 <sup>b</sup>		
TRAT * TIEMPO	Hipótesis	,457	6	7,609E-02	,715	,640
	Error	3,512	33	,106 <sup>b</sup>		

a. MS(EXP(TRAT))

b. MS(Error)

### b) Picante

#### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PICANTE

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	163,319	1	163,319	1914,460	,000
	Error	,256	3	8,531E-02 <sup>a</sup>		
TRAT	Hipótesis	4,527E-02	2	2,263E-02	,265	,783
	Error	,256	3	8,531E-02 <sup>a</sup>		
TIEMPO	Hipótesis	4,496	3	1,499	19,577	,000
	Error	2,526	33	7,655E-02 <sup>b</sup>		
EXP(TRAT)	Hipótesis	,256	3	8,531E-02	1,114	,357
	Error	2,526	33	7,655E-02 <sup>b</sup>		
TRAT * TIEMPO	Hipótesis	,309	6	5,149E-02	,673	,672
	Error	2,526	33	7,655E-02 <sup>b</sup>		

a. MS(EXP(TRAT))

b. MS(Error)

### c) Ácido/ fermentado

#### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: ACIDO

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	267,246	1	267,246	67,453	,004
	Error	11,886	3	3,962 <sup>a</sup>		
TRAT	Hipótesis	3,734	2	1,867	,471	,664
	Error	11,886	3	3,962 <sup>a</sup>		
TIEMPO	Hipótesis	12,502	3	4,167	25,798	,000
	Error	5,331	33	,162 <sup>b</sup>		
EXP(TRAT)	Hipótesis	11,886	3	3,962	24,527	,000
	Error	5,331	33	,162 <sup>b</sup>		
TRAT * TIEMPO	Hipótesis	2,142	6	,357	2,210	,067
	Error	5,331	33	,162 <sup>b</sup>		

a. MS(EXP(TRAT))

b. MS(Error)

### d) Amoniaca

#### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: AMONIACA

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	84,615	1	84,615	733,377	,000
	Error	,346	3	,115 <sup>a</sup>		
TRAT	Hipótesis	4,013E-02	2	2,006E-02	,174	,848
	Error	,346	3	,115 <sup>a</sup>		
TIEMPO	Hipótesis	,902	3	,301	4,222	,012
	Error	2,350	33	7,121E-02 <sup>b</sup>		
EXP(TRAT)	Hipótesis	,346	3	,115	1,620	,203
	Error	2,350	33	7,121E-02 <sup>b</sup>		
TRAT * TIEMPO	Hipótesis	7,997E-02	6	1,333E-02	,187	,978
	Error	2,350	33	7,121E-02 <sup>b</sup>		

a. MS(EXP(TRAT))

b. MS(Error)

## e) Firmeza

### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: FIRMEZA

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	1674,776	1	1674,776	5471,151	,000
	Error	,918	3	,306 <sup>a</sup>		
TRAT	Hipótesis	,167	2	8,329E-02	,272	,779
	Error	,918	3	,306 <sup>a</sup>		
TIEMPO	Hipótesis	6,023	3	2,008	24,522	,000
	Error	2,702	33	8,187E-02 <sup>b</sup>		
EXP(TRAT)	Hipótesis	,918	3	,306	3,739	,020
	Error	2,702	33	8,187E-02 <sup>b</sup>		
TRAT * TIEMPO	Hipótesis	,122	6	2,042E-02	,249	,956
	Error	2,702	33	8,187E-02 <sup>b</sup>		

a. MS(EXP(TRAT))

b. MS(Error)

## f) Aceptación

### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: ACEPT

Fuente		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Intersección	Hipótesis	1660,042	1	1660,042	2047,517	,000
	Error	2,432	3	,811 <sup>a</sup>		
TRAT	Hipótesis	6,952E-02	2	3,476E-02	,043	,959
	Error	2,432	3	,811 <sup>a</sup>		
TIEMPO	Hipótesis	8,619	3	2,873	22,639	,000
	Error	4,188	33	,127 <sup>b</sup>		
EXP(TRAT)	Hipótesis	2,432	3	,811	6,389	,002
	Error	4,188	33	,127 <sup>b</sup>		
TRAT * TIEMPO	Hipótesis	,216	6	3,597E-02	,283	,941
	Error	4,188	33	,127 <sup>b</sup>		

a. MS(EXP(TRAT))

b. MS(Error)

Análisis de varianza para la evaluación sensorial en salmón ahumado en frío por tratamiento, para cada atributo evaluado

**a) Control (T1)**

- Rancidez**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: RANCIDEZ

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	3,655 <sup>a</sup>	7	,522	3,933	,037
Intersección	78,101	1	78,101	588,251	,000
TIEMPO	3,655	7	,522	3,933	,037
Error	1,062	8	,133		
Total	82,819	16			
Total corregida	4,717	15			

a. R cuadrado = ,775 (R cuadrado corregida = ,578)

Subconjuntos homogéneos

**RANCIDEZ**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto	
		1	2
11,00	2	1,5600	
12,00	2	1,7550	1,7550
72,00	2	1,9400	1,9400
71,00	2	2,0650	2,0650
141,00	2	2,1900	2,1900
142,00	2	2,3800	2,3800
212,00	2	2,6250	2,6250
211,00	2		3,1600
Significación		,187	,057

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,133.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Picante**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: PICANTE

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	1,343 <sup>a</sup>	7	,192	3,174	,064
Intersección	52,345	1	52,345	865,747	,000
TIEMPO	1,343	7	,192	3,174	,064
Error	,484	8	6,046E-02		
Total	54,172	16			
Total corregida	1,827	15			

a. R cuadrado = ,735 (R cuadrado corregida = ,504)

Subconjuntos homogéneos

**PICANTE**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto
		1
11,00	2	1,3750
12,00	2	1,3750
71,00	2	1,6850
72,00	2	1,8750
141,00	2	1,8750
211,00	2	1,9700
142,00	2	2,1250
212,00	2	2,1900
Significación		,114

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basados en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 6,046E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Ácido/fermentado**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: ACIDO

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	3,774 <sup>a</sup>	7	,539	3,361	,055
Intersección	83,357	1	83,357	519,681	,000
TIEMPO	3,773	7	,539	3,361	,055
Error	1,283	8	,160		
Total	88,414	16			
Total corregida	5,057	15			

a. R cuadrado = ,746 (R cuadrado corregida = ,524)

Subconjuntos homogéneos

**ACIDO**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto
		1
11,00	2	1,5650
71,00	2	1,7800
12,00	2	1,9400
141,00	2	2,0650
211,00	2	2,4700
72,00	2	2,6850
142,00	2	2,7200
212,00	2	3,0350
Significación		,072

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,160.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Amoniacal**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: AMONIAC

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,752 <sup>a</sup>	7	,107	,727	,656
Intersección	28,998	1	28,998	196,199	,000
TIEMPO	,752	7	,107	,727	,656
Error	1,182	8	,148		
Total	30,933	16			
Total corregida	1,935	15			

a. R cuadrado = ,389 (R cuadrado corregida = -,146)

Subconjuntos homogéneos

**AMONIAC**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto
		1
12,00	2	1,0650
11,00	2	1,1900
72,00	2	1,1900
142,00	2	1,2550
71,00	2	1,3750
212,00	2	1,4100
141,00	2	1,4700
211,00	2	1,8150
Significación		,558

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,148.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.



- Firmeza**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: FIRMEZA

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	2,552 <sup>a</sup>	7	,365	4,088	,033
Intersección	556,252	1	556,252	6238,634	,000
TIEMPO	2,552	7	,365	4,088	,033
Error	,713	8	8,916E-02		
Total	559,517	16			
Total corregida	3,265	15			

a. R cuadrado = ,782 (R cuadrado corregida = ,590)

Subconjuntos homogéneos

**FIRMEZA**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto	
		1	2
211,00	2	5,3150	
212,00	2	5,5650	5,5650
142,00	2	5,6900	5,6900
141,00	2	5,8150	5,8150
72,00	2	5,8450	5,8450
71,00	2	5,9050	5,9050
12,00	2	6,4700	6,4700
11,00	2		6,5650
Significación		,056	,109

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 8,916E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- Aceptación**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: ACEPT

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	2,804 <sup>a</sup>	7	,401	19,856	,000
Intersección	559,559	1	559,559	27735,268	,000
TIEMPO	2,804	7	,401	19,856	,000
Error	,161	8	2,018E-02		
Total	562,525	16			
Total corregida	2,966	15			

a. R cuadrado = ,946 (R cuadrado corregida = ,898)

Subconjuntos homogéneos

**ACEPT**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
212,00	2	5,3750			
211,00	2	5,4700			
141,00	2	5,5650	5,5650		
71,00	2	5,8450	5,8450		
142,00	2	5,9100	5,9100	5,9100	
72,00	2		6,0950	6,0950	6,0950
11,00	2			6,4600	6,4600
12,00	2				6,5900
Significación		,064	,067	,056	,091

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 2,018E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

## b) Buffer fosfato (T2)

- Rancidez**

### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: RANCIDEZ

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	5,283 <sup>a</sup>	7	,755	16,740	,000
Intersección	78,322	1	78,322	1737,122	,000
TIEMPO	5,283	7	,755	16,740	,000
Error	,361	8	4,509E-02		
Total	83,966	16			
Total corregida	5,644	15			

a. R cuadrado = ,936 (R cuadrado corregida = ,880)

### Subconjuntos homogéneos

#### RANCIDEZ

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
11,00	2	1,3150			
71,00	2	1,8150	1,8150		
12,00	2	1,9050	1,9050	1,9050	
72,00	2	2,0000	2,0000	2,0000	
142,00	2	2,0950	2,0950	2,0950	
141,00	2		2,5950	2,5950	2,5950
211,00	2			2,6900	2,6900
212,00	2				3,2850
Significación		,072	,072	,070	,123

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 4,509E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Picante**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: PICANTE

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	2,093 <sup>a</sup>	7	,299	4,817	,021
Intersección	54,243	1	54,243	874,010	,000
TIEMPO	2,093	7	,299	4,817	,021
Error	,497	8	6,206E-02		
Total	56,833	16			
Total corregida	2,589	15			

a. R cuadrado = ,808 (R cuadrado corregida = ,640)

Subconjuntos homogéneos

**PICANTE**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto	
		1	2
11,00	2	1,2500	
12,00	2	1,4100	1,4100
72,00	2	1,7500	1,7500
142,00	2	1,7500	1,7500
71,00	2	1,8800	1,8800
141,00	2	2,0950	2,0950
211,00	2	2,2200	2,2200
212,00	2		2,3750
Significación		,054	,056

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basados en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 6,206E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Ácido/ fermentado**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: ACIDO

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	4,853 <sup>a</sup>	7	,693	18,908	,000
Intersección	68,104	1	68,104	1857,270	,000
TIEMPO	4,853	7	,693	18,908	,000
Error	,293	8	3,667E-02		
Total	73,251	16			
Total corregida	5,147	15			

a. R cuadrado = ,943 (R cuadrado corregida = ,893)

Subconjuntos homogéneos

**ACIDO**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
11,00	2	1,2550			
71,00	2	1,6250	1,6250		
12,00	2	1,8100	1,8100		
72,00	2	1,8100	1,8100		
141,00	2		2,0300		
211,00	2		2,1600	2,1600	
142,00	2			2,8150	2,8150
212,00	2				3,0000
Significación		,192	,219	,099	,968

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 3,667E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Amoniacal**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: AMONIAC

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,345 <sup>a</sup>	7	4,931E-02	,797	,611
Intersección	29,160	1	29,160	471,082	,000
TIEMPO	,345	7	4,931E-02	,797	,611
Error	,495	8	6,190E-02		
Total	30,000	16			
Total corregida	,840	15			

a. R cuadrado = ,411 (R cuadrado corregida = -,105)

Subconjuntos homogéneos

**AMONIAC**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto
		1
12,00	2	1,0950
72,00	2	1,2850
11,00	2	1,3150
71,00	2	1,3150
212,00	2	1,3150
142,00	2	1,3450
141,00	2	1,5050
211,00	2	1,6250
Significación		,468

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 6,190E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- Firmeza**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: FIRMEZA

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	2,237 <sup>a</sup>	7	,320	2,172	,150
Intersección	545,806	1	545,806	3710,287	,000
TIEMPO	2,237	7	,320	2,172	,150
Error	1,177	8	,147		
Total	549,220	16			
Total corregida	3,414	15			

a. R cuadrado = ,655 (R cuadrado corregida = ,354)

**Subconjuntos homogéneos**

**FIRMEZA**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto
		1
212,00	2	5,3450
211,00	2	5,5600
142,00	2	5,5950
141,00	2	5,6550
72,00	2	5,7200
71,00	2	6,0650
12,00	2	6,2800
11,00	2	6,5050
Significación		,164

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,147.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Aceptación**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: ACEPT

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	4,392 <sup>a</sup>	7	,627	6,662	,008
Intersección	543,356	1	543,356	5769,643	,000
TIEMPO	4,392	7	,627	6,662	,008
Error	,753	8	9,418E-02		
Total	548,501	16			
Total corregida	5,145	15			

a. R cuadrado = ,854 (R cuadrado corregida = ,725)

Subconjuntos homogéneos

**ACEPT**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto	
		1	2
212,00	2	5,1900	
142,00	2	5,4400	
211,00	2	5,4850	
141,00	2	5,5000	
72,00	2	5,7850	5,7850
71,00	2	6,1050	6,1050
12,00	2	6,1900	6,1900
11,00	2		6,9250
Significación		,122	,068

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 9,418E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.



**c) *C. piscicola* (T5)**

- Rancidez**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: RANCIDEZ

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	1,893 <sup>a</sup>	7	,270	2,798	,086
Intersección	52,853	1	52,853	546,848	,000
TIEMPO	1,893	7	,270	2,798	,086
Error	,773	8	9,665E-02		
Total	55,519	16			
Total corregida	2,666	15			

a. R cuadrado = ,710 (R cuadrado corregida = ,456)

**Subconjuntos homogéneos**

**RANCIDEZ**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto
		1
11,00	2	1,1900
71,00	2	1,4400
12,00	2	1,7500
72,00	2	1,7500
141,00	2	1,9400
142,00	2	2,0000
211,00	2	2,1900
212,00	2	2,2800
Significación		,089

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 9,665E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Picante**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: PICANTE

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	1,927 <sup>a</sup>	7	,275	1,772	,220
Intersección	56,776	1	56,776	365,444	,000
TIEMPO	1,927	7	,275	1,772	,220
Error	1,243	8	,155		
Total	59,946	16			
Total corregida	3,170	15			

a. R cuadrado = ,608 (R cuadrado corregida = ,265)

**Subconjuntos homogéneos**

**PICANTE**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto
		1
11,00	2	1,3150
71,00	2	1,5300
12,00	2	1,6900
72,00	2	1,7200
141,00	2	2,0300
142,00	2	2,2500
212,00	2	2,2500
211,00	2	2,2850
Significación		,326

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,155.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Ácido/ fermentado**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: ACIDO

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	19,510 <sup>a</sup>	7	2,787	10,385	,002
Intersección	119,520	1	119,520	445,314	,000
TIEMPO	19,510	7	2,787	10,385	,002
Error	2,147	8	,268		
Total	141,177	16			
Total corregida	21,657	15			

a. R cuadrado = ,901 (R cuadrado corregida = ,814)

Subconjuntos homogéneos

**ACIDO**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto		
		1	2	3
11,00	2	1,4400		
71,00	2	1,6900	1,6900	
141,00	2	2,0650	2,0650	
12,00	2	2,4100	2,4100	
211,00	2	2,7500	2,7500	
72,00	2	2,8150	2,8150	
142,00	2		3,5650	3,5650
212,00	2			5,1300
Significación		,260	,077	,165

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,268.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Amoniacal**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: AMONIAC

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,338 <sup>a</sup>	7	4,826E-02	,683	,686
Intersección	26,497	1	26,497	375,076	,000
TIEMPO	,338	7	4,826E-02	,683	,686
Error	,565	8	7,064E-02		
Total	27,400	16			
Total corregida	,903	15			

a. R cuadrado = ,374 (R cuadrado corregida = -,174)

**Subconjuntos homogéneos**

**AMONIAC**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto
		1
12,00	2	1,0950
11,00	2	1,1900
71,00	2	1,1900
72,00	2	1,2500
142,00	2	1,2550
141,00	2	1,2800
211,00	2	1,4700
212,00	2	1,5650
Significación		,653

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 7,064E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- Firmeza**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: FIRMEZA

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	2,506 <sup>a</sup>	7	,358	4,933	,020
Intersección	572,884	1	572,884	7893,685	,000
TIEMPO	2,506	7	,358	4,933	,020
Error	,581	8	7,257E-02		
Total	575,971	16			
Total corregida	3,087	15			

a. R cuadrado = ,812 (R cuadrado corregida = ,647)

Subconjuntos homogéneos

**FIRMEZA**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto	
		1	2
212,00	2	5,5050	
142,00	2	5,5600	
211,00	2	5,6900	5,6900
72,00	2	5,8800	5,8800
141,00	2	6,0050	6,0050
12,00	2	6,1300	6,1300
71,00	2	6,3450	6,3450
11,00	2		6,7550
Significación		,146	,050

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 7,257E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Aceptación**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: ACEPT

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	4,677 <sup>a</sup>	7	,668	2,003	,175
Intersección	557,196	1	557,196	1670,815	,000
TIEMPO	4,677	7	,668	2,003	,175
Error	2,668	8	,333		
Total	564,541	16			
Total corregida	7,345	15			

a. R cuadrado = ,637 (R cuadrado corregida = ,319)

Subconjuntos homogéneos

**ACEPT**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TIEMPO	N	Subconjunto
		1
212,00	2	5,0000
142,00	2	5,5300
72,00	2	5,6250
211,00	2	5,9400
141,00	2	5,9700
71,00	2	6,0300
12,00	2	6,0950
11,00	2	7,0200
Significación		,090

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,333.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

Análisis de varianza para la evaluación sensorial en salmón ahumado en frío por día de análisis, para cada atributo evaluado

**a) Día 0**

- Rancidez**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: RANCIDEZ

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,776 <sup>a</sup>	5	,155	3,340	,087
Intersección	29,925	1	29,925	644,130	,000
TRAT	,776	5	,155	3,340	,087
Error	,279	6	4,646E-02		
Total	30,980	12			
Total corregida	1,054	11			

a. R cuadrado = ,736 (R cuadrado corregida = ,515)

Subconjuntos homogéneos

**RANCIDEZ**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TRAT	N	Subconjunto
		1
51,00	2	1,1900
21,00	2	1,3150
11,00	2	1,5600
52,00	2	1,7500
12,00	2	1,7550
22,00	2	1,9050
Significación		,103

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 4,646E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Picante**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: PICANTE

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,230 <sup>a</sup>	5	4,606E-02	,700	,644
Intersección	23,604	1	23,604	358,588	,000
TRAT	,230	5	4,605E-02	,700	,644
Error	,395	6	6,582E-02		
Total	24,229	12			
Total corregida	,625	11			

a. R cuadrado = ,368 (R cuadrado corregida = -,158)

Subconjuntos homogéneos

**PICANTE**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TRAT	N	Subconjunto
		1
21,00	2	1,2500
51,00	2	1,3150
11,00	2	1,3750
12,00	2	1,3750
22,00	2	1,4100
52,00	2	1,6900
Significación		,568

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 6,582E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.



- **Ácido/ fermentado**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: ACIDO

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	1,699 <sup>a</sup>	5	,340	1,927	,224
Intersección	36,192	1	36,192	205,229	,000
TRAT	1,699	5	,340	1,927	,224
Error	1,058	6	,176		
Total	38,949	12			
Total corregida	2,757	11			

a. R cuadrado = ,616 (R cuadrado corregida = ,296)

Subconjuntos homogéneos

**ACIDO**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TRAT	N	Subconjunto
		1
21,00	2	1,2550
51,00	2	1,4400
11,00	2	1,5650
22,00	2	1,8100
12,00	2	1,9400
52,00	2	2,4100
Significación		,194

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,176.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Amoniacal**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: AMONIAC

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	8,657E-02 <sup>a</sup>	5	1,731E-02	2,005	,211
Intersección	16,101	1	16,101	1864,961	,000
TRAT	8,657E-02	5	1,731E-02	2,005	,211
Error	5,180E-02	6	8,633E-03		
Total	16,239	12			
Total corregida	,138	11			

a. R cuadrado = ,626 (R cuadrado corregida = ,314)

Subconjuntos homogéneos

**AMONIAC**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TRAT	N	Subconjunto
		1
12,00	2	1,0650
22,00	2	1,0950
52,00	2	1,0950
11,00	2	1,1900
51,00	2	1,1900
21,00	2	1,3150
Significación		,207

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 8,633E-03.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- Firmeza**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: FIRMEZA

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,482 <sup>a</sup>	5	9,639E-02	1,072	,459
Intersección	499,359	1	499,359	5553,061	,000
TRAT	,482	5	9,639E-02	1,072	,459
Error	,540	6	8,993E-02		
Total	500,381	12			
Total corregida	1,021	11			

a. R cuadrado = ,472 (R cuadrado corregida = ,032)

Subconjuntos homogéneos

**FIRMEZA**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TRAT	N	Subconjunto
		1
52,00	2	6,1300
22,00	2	6,2800
12,00	2	6,4700
21,00	2	6,5050
11,00	2	6,5650
51,00	2	6,7550
Significación		,399

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 8,993E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Aceptación**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: ACEPT

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	1,416 <sup>a</sup>	5	,283	3,082	,102
Intersección	514,306	1	514,306	5599,414	,000
TRAT	1,416	5	,283	3,082	,102
Error	,551	6	9,185E-02		
Total	516,273	12			
Total corregida	1,967	11			

a. R cuadrado = ,720 (R cuadrado corregida = ,486)

Subconjuntos homogéneos

**ACEPT**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TRAT	N	Subconjunto
		1
52,00	2	6,0950
22,00	2	6,1900
11,00	2	6,4600
12,00	2	6,5900
21,00	2	6,9250
51,00	2	7,0200
Significación		,138

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 9,185E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

## b) Día 7

- **Rancidez**

### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: RANCIDEZ

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,510 <sup>a</sup>	5	,102	,695	,647
Intersección	40,407	1	40,407	275,469	,000
TRAT	,510	5	,102	,695	,647
Error	,880	6	,147		
Total	41,796	12			
Total corregida	1,390	11			

a. R cuadrado = ,367 (R cuadrado corregida = -,161)

- **Picante**

### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PICANTE

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,171 <sup>a</sup>	5	3,418E-02	,511	,761
Intersección	36,331	1	36,331	542,932	,000
TRAT	,171	5	3,418E-02	,511	,761
Error	,402	6	6,692E-02		
Total	36,904	12			
Total corregida	,572	11			

a. R cuadrado = ,299 (R cuadrado corregida = -,286)

- **Ácido/ fermentado**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: ACIDO

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	2,855 <sup>a</sup>	5	,571	6,652	,020
Intersección	51,295	1	51,295	597,666	,000
TRAT	2,855	5	,571	6,652	,020
Error	,515	6	8,583E-02		
Total	54,664	12			
Total corregida	3,370	11			

a. R cuadrado = ,847 (R cuadrado corregida = ,720)

Subconjuntos homogéneos

**ACIDO**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TRAT	N	Subconjunto	
		1	2
21,00	2	1,6250	
51,00	2	1,6900	1,6900
11,00	2	1,7800	1,7800
22,00	2	1,8100	1,8100
12,00	2	2,6850	2,6850
52,00	2		2,8150
Significación		,074	,058

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 8,583E-02.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Amoniacal**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: AMONIAC

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	5,287E-02 <sup>a</sup>	5	1,057E-02	,194	,954
Intersección	19,279	1	19,279	353,575	,000
TRAT	5,288E-02	5	1,058E-02	,194	,954
Error	,327	6	5,452E-02		
Total	19,659	12			
Total corregida	,380	11			

a. R cuadrado = ,139 (R cuadrado corregida = -,578)

- **Firmeza**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: FIRMEZA

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,479 <sup>a</sup>	5	9,580E-02	1,675	,273
Intersección	426,259	1	426,259	7452,084	,000
TRAT	,479	5	9,580E-02	1,675	,273
Error	,343	6	5,720E-02		
Total	427,081	12			
Total corregida	,822	11			

a. R cuadrado = ,583 (R cuadrado corregida = ,235)

- **Aceptación**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: ACEPT

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,375 <sup>a</sup>	5	7,505E-02	1,530	,308
Intersección	419,728	1	419,728	8558,608	,000
TRAT	,375	5	7,505E-02	1,530	,308
Error	,294	6	4,904E-02		
Total	420,398	12			
Total corregida	,669	11			

a. R cuadrado = ,560 (R cuadrado corregida = ,194)

### c) Día 14

- **Rancidez**

#### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: RANCIDEZ

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,614 <sup>a</sup>	5	,123	3,782	,068
Intersección	58,080	1	58,080	1787,994	,000
TRAT	,614	5	,123	3,782	,068
Error	,195	6	3,248E-02		
Total	58,889	12			
Total corregida	,809	11			

a. R cuadrado = ,759 (R cuadrado corregida = ,558)

- **Picante**

#### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PICANTE

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,327 <sup>a</sup>	5	6,543E-02	,397	,835
Intersección	49,005	1	49,005	297,678	,000
TRAT	,327	5	6,543E-02	,397	,835
Error	,988	6	,165		
Total	50,320	12			
Total corregida	1,315	11			

a. R cuadrado = ,249 (R cuadrado corregida = -,377)



- **Ácido/ fermentado**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: ACIDO

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	3,740 <sup>a</sup>	5	,748	5,952	,025
Intersección	77,623	1	77,623	617,686	,000
TRAT	3,740	5	,748	5,952	,025
Error	,754	6	,126		
Total	82,116	12			
Total corregida	4,494	11			

a. R cuadrado = ,832 (R cuadrado corregida = ,692)

**Subconjuntos homogéneos**

**ACIDO**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TRAT	N	Subconjunto	
		1	2
21,00	2	2,0300	
11,00	2	2,0650	
51,00	2	2,0650	
12,00	2	2,7200	2,7200
22,00	2	2,8150	2,8150
52,00	2		3,5650
Significación		,349	,291

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,126.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- **Amoniacal**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: AMONIAC

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,123 <sup>a</sup>	5	2,455E-02	,776	,601
Intersección	21,924	1	21,924	693,067	,000
TRAT	,123	5	2,455E-02	,776	,601
Error	,190	6	3,163E-02		
Total	22,237	12			
Total corregida	,313	11			

a. R cuadrado = ,393 (R cuadrado corregida = -,113)

- **Firmeza**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: FIRMEZA

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,273 <sup>a</sup>	5	5,464E-02	,819	,577
Intersección	392,621	1	392,621	5886,369	,000
TRAT	,273	5	5,464E-02	,819	,577
Error	,400	6	6,670E-02		
Total	393,294	12			
Total corregida	,673	11			

a. R cuadrado = ,406 (R cuadrado corregida = -,090)

- **Aceptación**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: ACEPT

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,516 <sup>a</sup>	5	,103	,857	,558
Intersección	383,409	1	383,409	3180,718	,000
TRAT	,516	5	,103	,857	,558
Error	,723	6	,121		
Total	384,649	12			
Total corregida	1,240	11			

a. R cuadrado = ,417 (R cuadrado corregida = -,070)

## d) Día 21

- **Rancidez**

### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: RANCIDEZ

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	1,992 <sup>a</sup>	5	,398	2,838	,118
Intersección	87,804	1	87,804	625,461	,000
TRAT	1,992	5	,398	2,838	,118
Error	,842	6	,140		
Total	90,638	12			
Total corregida	2,834	11			

a. R cuadrado = ,703 (R cuadrado corregida = ,455)

- **Picante**

### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: PICANTE

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,185 <sup>a</sup>	5	3,696E-02	,505	,765
Intersección	58,875	1	58,875	804,849	,000
TRAT	,185	5	3,696E-02	,505	,765
Error	,439	6	7,315E-02		
Total	59,498	12			
Total corregida	,624	11			

a. R cuadrado = ,296 (R cuadrado corregida = -,290)

- **Ácido/ fermentado**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: ACIDO

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	11,075 <sup>a</sup>	5	2,215	9,516	,008
Intersección	114,639	1	114,639	492,488	,000
TRAT	11,075	5	2,215	9,516	,008
Error	1,397	6	,233		
Total	127,111	12			
Total corregida	12,472	11			

a. R cuadrado = ,888 (R cuadrado corregida = ,795)

Subconjuntos homogéneos

**ACIDO**

DHS de Tukey<sup>a,b</sup>

TRAT	N	Subconjunto	
		1	2
21,00	2	2,1600	
11,00	2	2,4700	
51,00	2	2,7500	
22,00	2	3,0000	
12,00	2	3,0350	
52,00	2		5,1300
Significación		,520	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,233.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 2,000

b. Alfa = ,05.

- Amoniacal**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: AMONIAC

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,311 <sup>a</sup>	5	6,225E-02	,223	,939
Intersección	28,213	1	28,213	101,123	,000
TRAT	,311	5	6,225E-02	,223	,939
Error	1,674	6	,279		
Total	30,199	12			
Total corregida	1,985	11			

a. R cuadrado = ,157 (R cuadrado corregida = -,546)

- Firmeza**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: FIRMEZA

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,204 <sup>a</sup>	5	4,085E-02	,206	,948
Intersección	362,560	1	362,560	1831,420	,000
TRAT	,204	5	4,085E-02	,206	,948
Error	1,188	6	,198		
Total	363,952	12			
Total corregida	1,392	11			

a. R cuadrado = ,147 (R cuadrado corregida = -,564)

**Aceptación**

**Pruebas de los efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: ACEPT

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	1,016 <sup>a</sup>	5	,203	,605	,701
Intersección	351,217	1	351,217	1046,275	,000
TRAT	1,016	5	,203	,605	,701
Error	2,014	6	,336		
Total	354,247	12			
Total corregida	3,030	11			

a. R cuadrado = ,335 (R cuadrado corregida = -,219)