



Universitat de Girona

**MEJORA DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA EN
PRODUCTOS CÁRNICOS LISTOS PARA EL
CONSUMO MEDIANTE LA APLICACIÓN
COMBINADA DE TECNOLOGÍAS DE
CONSERVACIÓN EMERGENTES**

Begoña MARCOS MUNTAL

ISBN: 978-84-690-8261-4
Dipòsit legal: GI-I 187-2007



Universitat de Girona

Departament d'Enginyeria Química,
Agrària i Tecnologia Agroalimentària

Tesis Doctoral

Mejora de la seguridad alimentaria en productos cárnicos listos para el consumo mediante la aplicación combinada de tecnologías de conservación emergentes

Memoria presentada por Begoña Marcos Muntal, inscrita en el programa de doctorado de Ciencias Experimentales y de la salud, itinerario de Biotecnología para optar al grado de Doctor por la Universitat de Girona. El presente trabajo se ha realizado en la Unidad de Microbiología Alimentaria del IRTA Tecnología de los Alimentos.

Begoña Marcos Muntal

Girona, mayo 2007

Begoña Marcos Muntal

Tesis doctoral: *Mejora de la seguridad alimentaria en productos cárnicos listos para el consumo mediante la aplicación combinada de tecnologías de conservación emergentes.*

Portada: Fotografía chorizo extraída del Banco de Imágenes, Centro Nacional de Información y Comunicación Educativa, Ministerio de Educación y Ciencia.

**Mejora de la seguridad alimentaria en
productos cárnicos listos para el consumo
mediante la aplicación combinada de
tecnologías de conservación emergentes**

Dra. Margarita Garriga
Co-Directora de la Tesis

Dra. Teresa Aymerich
Co-Directora de la Tesis

Dr. Josep M^a Monfort
Tutor de la Tesis

Girona, mayo 2007

El trabajo expuesto en esta memoria ha sido subvencionado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria a través de la concesión de una beca predoctoral y de los proyectos INIA RTA 01-084 y INIA RTA04-10, y por el Ministerio de Ciencia y Tecnología por el proyecto MCYT AGL2002-03496.

Expressar sentiments per escrit no és una tasca senzilla, espero que aquestes quatre ratlles transmetin el meu sincer agraïment a tots els que d'una manera més o menys directa han contribuït a que aquesta tesi arribés a bon port.

En primer lloc vull agrair a en Josep M^a Monfort, Director de l'IRTA Tecnologia dels aliments i tutor d'aquesta tesi, per haver-me obert les portes del CTC per a realitzar-hi el meu doctorat.

A les meves directores. Tere, gràcies per cuidar-me científica i humanament, i sobretot gràcies per ser sempre al meu costat, sense cap mena de dubte has estat el motor impulsor d'aquesta tesi. Margarita, gràcies per integrar-me a l'equip de micro i per conduir-me a través d'aquest apassionant món de la microbiologia càrnia.

A les nenes de micro, gràcies per tot. Yoli, per la teva gran qualitat humana. Anna i Belén, pel vostre suport tècnic i moral sempre que l' he necessitat. Sara, el fitxatge estrella, un privilegi. Raquel, per aguantar el colze a colze. No m'oblido dels 'fugitius': David i Andreas, pels riures, i l'Anna C., per patir els inicis dels films actius...

A en Lluís i en Pere, per el vostre assessorament estadístic, infinita paciència i bon humor.

A la Dolors i en Lluís de nou, pel suport sensorial, així com als valents catadors que veu tenir el plaer de degustar els meus fuetes i xoriços...

A l'Elena i la Carme, per la vostra disposició i l'ajut en temes informàtics.

Als companys que durant aquests cinc anys hem respirat el mateix aire de la Polivalent: Xevi, Mònica, Josep, Ire, Nuri, Laura, Marta, Pedro, Anna, Manel, Elena..., gràcies per ser tant bons companys, per les rialles compartides, pel recolzament científic i moral en moments crítics, però sobretot, per a compartir el monsturarí Kinder!

En general, a tots els companys del CTC, i en especial a les grans amigues que hi he trobat Carolina, Nuri, Mire, Silvina, Cris, Vale, Béné, Alexandra, Bri, Elsa, i ...no em penso posar tova!

Je voudrais remercier l'équipe du CRITT-Bioindustries, de Toulouse pour leur aide pendant mon stage. Tout particulièrement à Sébastien Leduc pour avoir partagé ses connaissances sur le monde des fermentations et pour son soutien moral pendant cette production massive de bactériocines. A Filippa, Maite y Vicente, gracias por compartir esas frías soirées toulousianas, tan pis!

Vorrei ringraziare il Professore del Nobile e Amalia, m'hanno fatto capire come si poteva fare un film attivo. Grazie Stef, Inco, Carmela, Anto Masaro, Anto Benedetto, Pascuale e CoNstantino. Molte grazie per i vostri sorrisi, per la compagnia e amicizia nel tempo passato a Foggia e per aver sopportato il mio italiano!

Als papes, pel vostre incondicional suport en totes les meves aventures.

A en David, en Marc, la Marieta i com no, a en Gerard, el nino que ens alegra dia si dia també.

A la iaia i la Nibe... m'hauria agradat que ho veiéssim plegades.

Als amics, TOTS, per haver-hi estat sempre, en els bons moments i sobretot en els no tant bons. I tot i que darrerament reconec ser una mica cara de veure, vull agrair-vos el fet de ser els meus companys de ruta.

A la ciutat de Girona, que ha esdevingut la meua llar durant cinc anys, però sobretot als qui m'hi heu fet sentir com a casa: Mònica, Josep, Adrià, Laura, Oriol, Xavier, Chantale, als teatrers, Sònia, Gina, Esteve, Pol... per les "rises" i per contribuir cada dijous a la recàrrega setmanal de piles.

Però sobretot vull agrair al destí el fet d'haver-me portat fins aquí.

Resumen

La creciente demanda de productos mínimamente procesados y listos para el consumo plantea un importante reto para la seguridad alimentaria y ha conducido al desarrollo de tratamientos post-procesado suaves, que permitan inhibir el crecimiento microbiano manteniendo la calidad y frescor de los alimentos. En este contexto adquiere una especial importancia el uso combinado de barreras contra el crecimiento de microorganismos que aseguren la calidad higiénica y la seguridad de los alimentos, sin afectar las propiedades organolépticas. En los trabajos recogidos en la presente tesis se plantearon diversas estrategias consistentes en la combinación de barreras al crecimiento microbiano para mejorar la seguridad de productos cárnicos listos para el consumo.

Durante la maduración, los embutidos crudos-curados se convierten en alimentos más estables y seguros como consecuencia de la sucesión de barreras al crecimiento microbiano. Sin embargo, en los embutidos poco ácidos, caracterizados por presentar valores finales de $\text{pH} \geq 5,3$, se ha minimizado una de las barreras al crecimiento de microorganismos. Con el objetivo de mejorar la seguridad de este tipo de producto se valoró la aplicación del tratamiento por alta presión hidrostática y la adición de cultivos iniciadores en dos tipos de embutidos poco ácidos (fuet y chorizo). El tratamiento por alta presión hidrostática (300 MPa), previo a la maduración de los embutidos crudos, constituyó una barrera adicional para controlar la población de *Salmonella*, pero ejerció un efecto contraproducente en el desarrollo de la microbiota de interés tecnológico y en el control de *L. monocytogenes*. La presurización (400 MPa), aplicada después del proceso de maduración, permitió obtener ausencia de *Salmonella* spp. en el producto acabado. La adición de cultivos iniciadores permitió mejorar la higiene (*Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, aminas biógenas) y la seguridad (*L. monocytogenes*, *S. aureus*) de los embutidos. Ambas tecnologías, aplicadas de forma combinada, ejercieron un efecto complementario, sin alterar la calidad final de los embutidos.

Por otro lado, el jamón cocido, es un alimento con un bajo contenido de sal (~2%), valores de pH en torno a 6,0 y actividad de agua superior a 0,95, factores incapaces de inhibir por sí solos los microorganismos relacionados con la contaminación post-procesado. Con el objetivo de reducir el riesgo de *L. monocytogenes* en el jamón cocido loncheado, se evaluó el efecto de los antimicrobianos naturales (lactatato-diacetato y enterocinas) y el tratamiento por alta presión hidrostática. Al aplicar los antimicrobianos como aditivos de fabricación, se observaron resultados óptimos en la combinación triple de tratamiento por alta presión hidrostática (400 MPa), antimicrobianos naturales y refrigeración a 1°C. Este tratamiento resultó eficaz, a pesar de la rotura de la cadena de frío, para reducir la contaminación inicial y evitar la recuperación de *L. monocytogenes* a lo largo de la vida útil del jamón. Por otro lado, al incluir las enterocinas en láminas biodegradables, el tratamiento combinado por alta presión hidrostática y envasado antimicrobiano, derivó en bajos niveles del patógeno (≤ 100 ufc/g) durante tres meses de conservación a 6°C. Finalmente, la combinación de alta presión hidrostática, envasado antimicrobiano y refrigeración a 1°C resultó efectiva, no sólo para controlar y reducir los recuentos de *L. monocytogenes*, sino para superar el efecto de la rotura de la cadena de frío.

Índice General

1	Introducción General	3
1.1	Patógenos transmitidos por los alimentos	5
1.2	Productos cárnicos listos para el consumo	9
1.3	Tecnologías de conservación emergentes	19
1.4	Bibliografía	29
2	Objetivo del estudio	41
2.1	Justificación	43
2.2	Objetivos específicos	43
2.3	Diseño experimental	44
2.4	Bibliografía	45
3	Resultados	47
3.1	Embutidos crudos-curados poco ácidos	49
3.2	Jamón cocido loncheado	77
4	Discusión general	119
4.1	Embutidos crudos-curados poco ácidos	121
4.2	Jamón cocido loncheado	130
4.3	Bibliografía	136
5	Conclusiones	143
	Abreviaturas	145

1 Introducción General

ÍNDICE

1.1	Patógenos transmitidos por los alimentos	5
1.1.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	6
1.1.2	<i>Salmonella</i> spp.	7
1.1.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.2	Productos cárnicos listos para el consumo	9
1.2.1	Embutidos crudos-curados	9
1.2.1.1	Tecnología de los embutidos crudos-curados	10
1.2.1.2	Microbiología de los embutidos crudos-curados	12
1.2.1.3	Seguridad de los embutidos crudos-curados	15
1.2.2	Productos cárnicos tratados por calor	16
1.2.2.1	Tecnología de los productos cárnicos tratados por calor	16
1.2.2.2	Microbiología de los productos cárnicos tratados por calor	18
1.3	Tecnologías de conservación emergentes	19
1.3.1	Tratamiento de los alimentos por alta presión hidrostática	19
1.3.1.1	Principios generales y equipos de alta presión hidrostática	20
1.3.1.2	Efecto de la APH sobre los microorganismos	20
1.3.1.3	Presurización de productos cárnicos	22
1.3.2	Adición de antimicrobianos naturales	23
1.3.2.1	Lactato- Diacetato	23
1.3.2.2	Bacteriocinas	24
1.3.2.3	Envasado activo	25
1.3.3.	Combinación de tecnologías de conservación	28
1.4	Bibliografía	29

El incremento de las enfermedades transmitidas por los alimentos en los últimos años, con una especial emergencia de microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* verocitotoxigénica, ha aumentado la preocupación sobre la seguridad alimentaria tanto entre las autoridades, como en el sector productivo y entre los consumidores. Resulta poco realista esperar que estos patógenos, con una amplia distribución en el medio ambiente, tanto en los animales como en los hombres, puedan ser eliminados completamente de todos los estadios de la cadena alimentaria. Por otro lado, el cambio en los estilos de vida acentúa también el riesgo de contaminación microbiana durante nuestra vida diaria. Las nuevas formas de cocinar, con periodos de cocción muy cortos, así como la tendencia de consumir alimentos crudos y congelados contribuyen al aumento del riesgo alimentario. Además, la prolongación de la esperanza de vida, ha provocado el aumento de un sector de la población denominada “de riesgo” (ancianos y enfermos inmunodeprimidos, principalmente), más susceptible a la contaminación. Será necesario, por tanto, introducir la tecnología adecuada y diseñar el proceso de fabricación de los alimentos de manera tal, que los riesgos de toxiinfección alimentaria se reduzcan a un nivel aceptable, asegurando al máximo la calidad microbiológica de los alimentos y su inocuidad para el consumo humano.

Los métodos tradicionales para controlar los microorganismos alterantes y patógenos incluyen, entre otros, la fermentación, el secado, la pasteurización y la adición de conservantes. Sin embargo, existe una demanda creciente de productos frescos de alta calidad, mínimamente procesados, con un uso mínimo de conservantes y listos para el consumo, y con una prolongada vida útil. Un correcto plan de APPCC y unas buenas prácticas de fabricación resultan esenciales, aunque no suficientes, para asegurar la calidad de los alimentos. En este contexto, el desarrollo de tecnologías de transformación, conservación y envasado suaves que aseguren la calidad higiénica y la seguridad, sin afectar las propiedades organolépticas de los alimentos, supone un reto para la industria alimentaria. Tecnologías suaves de conservación como las altas presiones hidrostáticas, los pulsos eléctricos, el envasado en atmósferas modificadas y el envasado antimicrobiano, entre otras, constituyen alternativas y/o complementos a los tratamientos térmicos para la obtención de productos seguros con un procesado mínimo.

1.1 PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR LOS ALIMENTOS

La zoonosis es una enfermedad que se puede transmitir de otros animales a los seres humanos. La infección se puede producir directamente a través de los animales o por medio de alimentos contaminados. Para prevenir estas enfermedades, resulta esencial identificar los animales y alimentos responsables de estas infecciones. Las infecciones causadas por *Salmonella* y *Campylobacter* (192.703 y 183.961 casos, respectivamente) constituyen las dos enfermedades zoonóticas más frecuentemente detectadas en Europa durante el 2005.

Infecciones causadas por *Yersinia* spp., *Escherichia coli* verocitotoxigénica y *Listeria monocytogenes* tuvieron, comparativamente, menor incidencia. Asimismo, si en vez de la morbilidad consideramos la mortalidad, *L. monocytogenes* es el responsable del mayor porcentaje de mortalidad en humanos. El número de personas afectadas en Europa en el 2005 fue relativamente bajo, con 1.267 casos descritos. Sin embargo, la mortalidad fue superior al 8%, más del doble de la esperada para el resto de infecciones por patógenos (EFSA, 2006a). El número de casos de enfermedad por *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *L. monocytogenes* notificados al Sistema de Información Microbiológica español durante el 2005 fueron 5.960, 545 y 69, respectivamente (CNE, 2005a). La carne y los productos cárnicos fueron el alimento implicado como vehículo de transmisión en un 9,4% de los brotes alimentarios descritos en España entre los años 1993 y 2002 (CNE, 2005b).

1.1.1 LISTERIA MONOCYTOGENES

Listeria es un bacilo corto, Gram-positivo, anaerobio facultativo, no esporulado, y móvil por medio de flagelos. Se han identificado seis especies, entre las que *Listeria monocytogenes*, es la principal causante de infecciones en los humanos (ICMSF, 1996). No todas las cepas de *L. monocytogenes* son patógenas, sólo las cepas hemolíticas. Entre los 13 serotipos identificados, 1/2a, 1/2b y 4b, son los más importantes desde el punto de vista epidemiológico. La temperatura óptima de crecimiento de *Listeria* se encuentra alrededor de 30-37°C, aunque puede crecer y sobrevivir en un rango de temperaturas de -0,4 a 45°C. El límite de crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos con pH neutro y un alto contenido en nutrientes, se establece en 0°C (Walker y col., 1990). Los valores limitantes de a_w dependen del ambiente; en productos cárnicos se ha descrito el límite de crecimiento en torno a 0,93 (ICMSF, 1996). *L. monocytogenes* presenta crecimiento en un amplio rango de pH (4,5-9,2). Es un microorganismo resistente, capaz de crecer en las condiciones en que se encuentran muchos alimentos. Por ello, resulta interesante la combinación de factores limitantes para evitar su crecimiento (ICMSF, 1996). Una directiva del *Food Safety and Inspection Service* (FSIS, 2002) fija como límite de crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos valores de: pH<4,5, pH<5 con refrigeración, a_w <0,90, a_w <0,92 con refrigeración, o a_w <0,95 y pH<5,5. Recientemente, en el Reglamento (CE) 2073/2005 se ha establecido que los alimentos con pH≤4,4 o a_w ≤0,92, o alimentos con a_w ≤0,94 y pH≤5,0, no pueden favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* (CE, 2005).

La distribución de *Listeria* en la naturaleza es ubicua. Se ha aislado en diversos ambientes incluyendo tierra, agua, múltiples fuentes animales y vegetales, pienso y aguas residuales. Además *L. monocytogenes* forma parte de la microbiota intestinal de un 1-10% de la población (Forsythe, 2000). Se encuentra en una gran variedad de alimentos, tanto crudos como procesados, donde puede sobrevivir y multiplicarse rápidamente durante el almacenaje. Los productos cárnicos listos para el consumo, los productos lácteos y el pescado parecen ser las fuentes más significativas de *L. monocytogenes* (EFSA, 2006b). Durante el 2005 se registró un

moderado incremento de las notificaciones por *L. monocytogenes* en la carne y los productos cárnicos distintos al pollo (RASFF, 2006). La mayor parte de las notificaciones (65%) estuvieron relacionadas con productos listos para el consumo tales como el salami, el jamón y productos cárnicos cocidos.

L. monocytogenes es responsable de infecciones oportunistas. La población de riesgo incluye: individuos con el sistema inmunológico alterado, mujeres embarazadas, bebés y ancianos. Los principales síntomas de la listeriosis son meningitis, encefalitis, bacteriemias o aborto. La gravedad de los síntomas es variable, va desde un cuadro leve, parecido a una gripe, hasta una sepsis grave, en el caso de población de riesgo. La dosis infectiva de *L. monocytogenes* no es bien conocida, parece ser superior a las 100 células, aunque puede variar según la cepa y la susceptibilidad del paciente. El tiempo de incubación es extremadamente largo de 1 a 90 días. La mortalidad global de la listeriosis en adultos es elevada, pudiendo llegar a situarse en torno al 33-62% (Nollas, 2002).

1.1.2 SALMONELLA SPP.

Salmonella, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, es una bacteria Gram-negativa, anaerobia facultativa, no esporulada, de forma bacilar. *Salmonella* fermenta la glucosa con producción de ácido y gas. Basándose en criterios fenotípicos el género *Salmonella* se divide en dos especies *Salmonella enterica* y *S. bongori* (CE, 2003). En Europa, los serotipos más comunes involucrados en brotes de salmonelosis son *S. enterica* serovar Enteritidis y *S. enterica* serovar Thyphimurium. Del total de casos de salmonelosis declarados en España durante el 2003, *S. Enteritidis* y *S. Thyphimurium* fueron los causantes de un 55% y un 9%, respectivamente.

Salmonella es capaz de multiplicarse en un amplio rango de temperaturas (5-46°C), aunque el óptimo de crecimiento se encuentra entre 35 y 43°C. Los valores mínimos de crecimiento descritos en medio de cultivo y en alimentos son de 5,2 y 6,7°C, respectivamente (CE, 2003). La actividad de agua afecta de manera importante al crecimiento de *Salmonella*. El óptimo de crecimiento se encuentra en torno a una a_w de 0,99; valores inferiores a 0,94 inhiben su crecimiento. El valor de pH óptimo para su crecimiento se encuentra alrededor de 7-7,5. A medida que el pH se aleja del valor óptimo, la tasa de crecimiento empieza a disminuir, hasta llegar al valor mínimo de crecimiento de 3,8. (ICMSF, 1996).

La distribución de *Salmonella* en el ambiente es ubicua. Muchos alimentos, principalmente de origen animal o contaminados por aguas residuales, se han identificado como vehículos de transmisión de este patógeno a los humanos. *Salmonella* vive en el tracto intestinal de los animales como comensal o como patógeno. Raramente la contaminación de la carne por *Salmonella* se produce a través de un animal infectado, sino que la contaminación es provocada por contaminación cruzada a través del ambiente y de equipos contaminados (ICMSF, 1996). Las principales causas de infección por *Salmonella* durante el 2005 fueron los huevos y la carne fresca, procedente de aves de corral y de cerdo (EFSA, 2006b).

Coincidiendo con estos datos, el sistema europeo de alerta alimentaria informó de un aumento del número de notificaciones debidas a *Salmonella* en carne y derivados cárnicos en el 2005 (RASFF, 2006).

Salmonella puede causar gastroenteritis, fiebres entéricas y septicemia. La dosis infectiva puede variar desde 20 hasta 10^6 células según el serotipo, alimento y vulnerabilidad del huésped (Forsythe, 2000). La dosis infectiva varía con la edad, el estado de salud del paciente, el alimento y la cepa de *Salmonella* implicada. Se han observado dosis infectivas muy bajas (inferiores a 100 células) en agua y alimentos grasos o con capacidad tampón (ICMSF, 1996). El periodo de incubación de la enfermedad se encuentra entre las 16-72 horas y puede durar de 2 a 7 días.

1.1.3 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram-positiva, esférica que puede encontrarse en parejas o agrupada en forma de racimos. Es anaerobio facultativo y se divide en un número de biotipos en función de las pruebas bioquímicas y los patrones de resistencia. *S. aureus* produce un amplio rango de factores de virulencia y patogenicidad: estafiloquinasa, hialuronidasas, fosfatasas, coagulasas y hemolisinas.

S. aureus es un microorganismo muy resistente y extremadamente difícil de eliminar. Soporta bien condiciones extremas, pero es inactivado a temperatura de congelación y puede eliminarse con una cocción adecuada. *S. aureus* crece a temperaturas de 7-48°C, valores de pH de 4-10 y a_w de 0,83-0,99. Las condiciones de producción de toxinas son más limitadas, temperaturas de 10-48°C, pH de 4,5-9,6 y a_w de 0,87-0,99. Las enterotoxinas producidas por *S. aureus* son proteínas de bajo peso molecular (26-34 kDa), muy resistentes al calor y a los enzimas proteolíticos. El microorganismo muestra una baja resistencia al calor ($D_{65,5}=0,2-2$ min), pero es halotolerante y resistente al secado. *S. aureus* es un pobre competidor contra otras bacterias presentes en los alimentos.

Staphylococcus es ubicuo en los animales y, como tal, es un contaminante habitual de la carne, de los productos cárnicos, y de la leche. *S. aureus* vive en el aire, el polvo, aguas residuales, agua, leche, y otros alimentos. Los humanos y los animales son reservorios primarios; un 30 % de la población sana es portador de *S. aureus*. Si *S. aureus* puede multiplicarse en el alimento, aumenta el riesgo de producción de toxinas. La intoxicación se produce normalmente por el consumo de alimentos sometidos tratamientos térmicos inadecuados ($\leq 60^\circ\text{C}$), o sometidos a una manipulación considerable, o refrigerados a insuficiente temperatura ($\geq 7,2^\circ\text{C}$) (Forsythe, 2000).

La intoxicación en humanos se debe, normalmente, a la ingesta de toxinas producidas en el alimento. Los síntomas de la intoxicación estafilocócica incluyen diarrea, vómitos y calambres abdominales. Éstos pueden ser muy graves, dependiendo de la susceptibilidad de cada individuo a la toxina, la cantidad de alimento ingerida, la cantidad de toxina presente en el alimento y la salud general del individuo. Los síntomas aparecen normalmente de forma rápida

a las pocas horas de la ingesta (entre 30 min y 8 h). La enfermedad normalmente dura 2-3 días. La dosis infectiva es inferior a 1 µg de toxina, nivel alcanzado cuando la población de *S. aureus* supera las 10⁵ ufc/g (ICMSF, 1996).

1.2 PRODUCTOS CÁRNICOS LISTOS PARA EL CONSUMO

La carne fresca se caracteriza por contener una elevada cantidad de nutrientes, presentar valores de pH alrededor de 5,6-6,0, y valores de actividad de agua superiores a 0,98. Estas condiciones la convierten en un excelente medio de cultivo en el que prácticamente todos los microorganismos son capaces de crecer (Campbell-Platt, 1995). En consecuencia, el proceso de transformación de la carne y las condiciones de conservación del producto acabado, deben dirigirse a mantener una serie de condiciones que impidan el crecimiento de microorganismos patógenos y que retrasen al máximo el crecimiento de microorganismos alterantes. En los productos cárnicos crudos los procesos de fermentación, secado o salado, inducen los cambios necesarios para estabilizar el producto y obtener unas propiedades organolépticas características y una seguridad sanitaria satisfactoria. En los productos tratados por calor el tratamiento térmico, aparte de la modificación de las propiedades organolépticas, tiene como objetivo principal eliminar microorganismos e inactivar enzimas presentes en la carne; aspectos fundamentales para garantizar la durabilidad, la calidad y la seguridad de estos productos.

En los últimos años se ha extendido el uso del concepto de alimentos listos para el consumo (LPC). El reglamento (CE) 2073/2005 define a los alimentos listos para el consumo como aquellos alimentos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos (CE, 2005). Entre los productos cárnicos LPC encontramos los embutidos crudos-curados (p.e. fuet, chorizo, jamón) y los productos cárnicos tratados por calor (p.e. jamón cocido, fiambre, salchichas tipo frankfurt).

1.2.1 EMBUTIDOS CRUDOS-CURADOS

Los embutidos crudos-curados son productos cárnicos elaborados por selección, troceado y picado de las carnes y de la grasa del cerdo, incorporación de condimentos, especias y aditivos autorizados, embutido, maduración y secado (Presidencia del Gobierno, 1980). La estabilidad y el bajo riesgo sanitario de este tipo de productos se basa fundamentalmente en (Ordóñez y de la Hoz, 2001): (1) el descenso de los valores de pH por la fermentación microbiana de los hidratos de carbono, (2) la disminución de la actividad de agua a causa de los solutos añadidos y de la deshidratación producida durante la maduración, (3) la adición de nitratos y nitritos contribuye a prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes (4) las especias, con cierta actividad antimicrobiana.

1.2.1.1 Tecnología de los embutidos crudos-curados

Ingredientes

La sal proporciona cierto efecto antimicrobiano, al provocar un descenso inmediato de la actividad de agua hasta valores de 0,96-0,97 (Nychas y Arkoudelos, 1990). El cloruro sódico, añadido en un 2,2-3%, ejerce un papel muy importante desde el punto de vista tecnológico, como potenciador del sabor y por inducir la solubilización de las proteínas miofibrilares del músculo, favoreciendo la formación de la textura de gel (Lücke, 1998). Por otro lado, se añaden hidratos de carbono fermentables (p.e. glucosa), necesarios para reducir los valores de pH. La cantidad de hidratos de carbono recomendada es de un 0,5-2% (Lücke, 1998). El nitrito, añadido directamente o proveniente de la reducción del nitrato, actúa como agente antimicrobiano y contribuye a la formación del color típico del curado. El nitrito, al igual que el ascorbato, actúa como antioxidante, inhibiendo los procesos auto-oxidativos que conducen a la rancidez del producto. El ascorbato, añadido en forma de ascorbato sódico, funciona como coadyuvante del curado para mejorar el color, el aroma y el sabor del producto (Ordóñez y de la Hoz, 2001). Las especias se utilizan en la mayoría de embutidos para potenciar el sabor, por su actividad antioxidante y antimicrobiana, localizada en la fracción de aceites esenciales (Lueck, 1980; Cowan, 1999; Verluyten y col., 2004). Los embutidos tradicionales se obtienen por la acción de los microorganismos endógenos de la carne, mientras que en los productos industriales se acostumbra a utilizar cultivos iniciadores de la fermentación.

Proceso de fabricación

El proceso de fabricación de los embutidos crudos-curados comprende diversas etapas, detalladas a continuación. En un primer momento, la carne y la grasa se pican a baja temperatura en una picadora de placas o una picadora de cuchillas (*cutter*). Después del picado, la carne se mezcla con los demás ingredientes para obtener el producto deseado. La mezcla puede realizarse en una amasadora, en la *cutter* o en molinos coloidales. A continuación la masa cárnica es embutida en tripa natural o artificial (colágeno y/o celulosa, son las más habituales). Es importante extraer el máximo de oxígeno de la mezcla cárnica para evitar posteriores defectos en la formación del color y el aroma durante la maduración, por lo que la mezcladora y embutidora acostumbran a trabajar bajo vacío. A continuación se colocan los embutidos en las cámaras de secado. La maduración se realiza en unas condiciones de temperatura, humedad relativa y circulación de aire determinadas según el tipo de embutidos a fabricar. En una primera etapa, llamada de fermentación, los embutidos se someten a unas condiciones de temperatura entre 20-28°C y de humedad relativa alrededor de 90-95% durante un periodo de tiempo variable de 24-72 horas. Transcurrida esta etapa, la temperatura y humedad relativa se reducen progresivamente hasta unos 10-17°C y un 70-85%, respectivamente, favoreciéndose de esta manera el proceso de secado y maduración (Ordóñez y de la Hoz, 2001).

Embutidos fermentados de baja acidez

En los países europeos del área mediterránea existe una preferencia por los embutidos de sabor poco ácido. Así, en países como España, Francia e Italia, existe un mayor consumo de embutidos fermentados ligeramente acidificados. El proceso de fabricación de este tipo de embutidos prescinde de la etapa de fermentación, realizándose una sola etapa de maduración a bajas temperaturas (<10-12 °C) con el fin de evitar una intensa y rápida fermentación (Sanz y col., 1998). Este tipo de embutidos de pequeño calibre (<30-40 mm) ligeramente acidificados, presentan valores finales de pH de 5,3-6,2 (Aymerich y col., 2003) y cortos periodos de maduración, normalmente inferiores a 1 mes.

Fenómenos madurativos

La fermentación de los hidratos de carbono por parte de las bacterias ácido lácticas (BAL) se produce de forma más intensa durante los primeros días del proceso. La producción de ácido láctico como consecuencia de la fermentación provoca un descenso del pH que inhibe el desarrollo de microorganismos indeseables, acelera el proceso de deshidratación disminuyendo la capacidad de retención de agua de las proteínas musculares, gobierna las reacciones enzimáticas e influye en la formación del color y en su estabilidad (Ordóñez y de la Hoz, 2001). Debido al descenso del pH, las proteínas solubilizadas se acercan a su punto isoeléctrico y coagulan (Lücke y Hechelmann, 1987).

Otro fenómeno importante durante la maduración de los embutidos es la estabilización del color. La aparición del color típico de curado se produce, básicamente, por la unión del óxido nítrico (NO) con el grupo hemo de la mioglobina (Mb) dando lugar a la nitrosomioglobina (NOMb). Por lo tanto es necesario que previamente se produzca la reducción del nitrito a NO, que se puede producir por acción de las nitrito reductasas, aunque normalmente se produce de manera espontánea en medio ácido (Nychas y Arkoudelos, 1990). Otra vía de formación de la NOMb es a partir de la metamioglobina (MetMb). La MetMb proviene, a su vez, de la oxidación directa de la mioglobina o de la oximioglobina, forma oxigenada de la Mb (Bard y Townsend, 1976).

La proteólisis que se produce durante la maduración afecta, principalmente, a las proteínas miofibrilares. La degradación de las proteínas a péptidos se debe principalmente a la actividad de las enzimas endógenas de la carne. Durante la maduración, las BAL, *Staphylococcus* y *Kocuria* contribuyen a la degradación de las proteínas sarcoplasmáticas, pero tienen una baja actividad proteolítica sobre las proteínas miofibrilares. Las BAL, gracias al descenso de los valores de pH, contribuyen de manera indirecta a la degradación de las proteínas miofibrilares, aumentando la actividad de la cathepsina D de la carne. Por consiguiente, los fenómenos proteolíticos producidos son el resultado de la acción conjunta de las enzimas tisulares y de los microorganismos (Ordóñez y de la Hoz, 2001). El papel de los aminoácidos, como precursores del sabor, resulta cada vez más evidente (Talon y col., 2002).

Los lípidos, por su parte, constituyen una fracción importante de los embutidos crudos-curados y son los precursores de numerosos compuestos aromáticos derivados de los fenómenos hidrolíticos y oxidativos producidos durante la maduración. La lipólisis implica la degradación total o parcial de los enlaces éster de los triglicéridos y fosfolípidos. Los lípidos pueden ser hidrolizados por las lipasas microbianas o tisulares. Los microorganismos lipolíticos, tales como *Staphylococcus* y *Kocuria*, son los que contribuyen mayoritariamente a la hidrólisis lipídica. Los ácidos grasos libres son precursores de las moléculas aromáticas (Talon y col., 2002). Asimismo, cierto grado de oxidación lipídica contribuye a la formación del aroma y sabor típico de los embutidos. El principal problema de la oxidación se encuentra en la formación de compuestos volátiles que, superadas unas determinadas tasas, proporcionan un aroma y un sabor rancio, desagradables para el consumidor (Ordóñez y col., 1999).

1.2.1.2 Microbiología de los embutidos crudos-curados

Teoría de los obstáculos

Los embutidos crudos-curados son productos estables desde el punto de vista microbiológico. El secreto de su seguridad e higiene se basa en la secuencia de obstáculos al crecimiento de microorganismos que se suceden durante la fermentación y que permiten la conservación de este tipo de producto.

La microbiota inicial de la masa cárnica es muy heterogénea, variable en función de los ingredientes utilizados y de las condiciones establecidas durante las operaciones previas al embutido. La microbiota inicial puede comprender lactobacilos, micrococos, enterobacterias, enterococos, pediococos, hongos, levaduras y patógenos, tales como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Ordóñez y de la Hoz, 2001).

La actividad de agua del producto se reduce hasta valores en torno a 0,96-0,97 después del embutido, gracias a acción de la sal (Nychas y Arkoudelos, 1990). La presencia de nitrito, por su actividad antimicrobiana, es importante al inicio de la maduración, cuando todavía no se han establecido los demás obstáculos al crecimiento de microorganismos. Los nitratos y nitritos se descomponen durante el proceso de fermentación, por lo que su acción antimicrobiana se va reduciendo a medida que avanza la maduración (Leistner, 1995). La siguiente barrera en aparecer es la reducción del potencial redox (Eh). Durante los primeros días de maduración el oxígeno presente en la mezcla cárnica se agota a causa del crecimiento microbiano. La reducción del Eh inhibe el crecimiento de *Pseudomonadaceae*, aerobios provenientes de la carne cruda. El bajo nivel de oxígeno intensifica el efecto bactericida del nitrito que, junto al descenso de pH, contribuye a inhibir *Enterobacteriaceae* (Smith y col., 1975; Lücke, 1998). Gracias a la reducción del Eh se favorece el dominio de las BAL, constituyéndose así la microbiota competitiva como otro obstáculo importante (Leistner, 1995). La producción de ácido láctico por parte de las BAL comporta un descenso de los valores de pH. El pH es indudablemente un factor clave para la estabilidad de los embutidos. El grado de descenso de

pH dependerá principalmente de la cantidad de azúcares añadidos y de la temperatura de maduración. La barrera final al crecimiento microbiano es la reducción de la a_w , el único obstáculo que continua ganando importancia a medida que evoluciona el proceso. El grado de reducción de la a_w de los embutidos depende de la formulación, la temperatura y, sobre todo, de la humedad relativa de la cámara de maduración (Lücke, 1998; Leistner, 1995). El descenso de a_w resulta más importante que el pH, para estabilizar los embutidos poco ácidos. La secuencia de obstáculos descrita, permite mejorar la seguridad e higiene de los embutidos, y favorece el desarrollo de la microbiota tecnológica, principalmente las BAL, que disfrutan una ventaja selectiva y se convierten en la microbiota dominante del proceso (Leistner, 1995).

Cultivos iniciadores de la fermentación

La fabricación de embutidos tradicionales de excelente calidad es posible si se utiliza carne de buena calidad higiénica, y se mantienen unas condiciones de maduración adecuadas. Asimismo, el uso de cultivos iniciadores es una práctica industrial cada vez más utilizada con el objetivo de obtener una mayor homogeneidad entre los productos y para mejorar su estabilidad y seguridad (Leistner, 1995). Los cultivos iniciadores más utilizados en Europa se componen de una mezcla de bacterias ácido lácticas, cocos Gram-positivos catalasa positivos, levaduras y mohos. Es importante destacar que los cultivos iniciadores son considerados un ingrediente más de los embutidos, por lo que las cepas utilizadas deben de ser reconocidas como GRAS, (*Generally Recognized as Safe*) (Caplice y Fitzgerald, 1999).

Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen la microbiota mayoritaria del embutido y participan en prácticamente todos los fenómenos madurativos (Hammes y col., 1990). Los recuentos de BAL aumentan rápidamente durante la maduración, hasta valores del orden de 10^8 - 10^9 ufc/g. Las especies más comunes son *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *Pediococcus acidilactici* y *P. pentasaceus* (Geisen y col., 1992), siendo las tres primeras las más frecuentes en los embutidos españoles (Hugas y Monfort, 1997). Las BAL son microorganismos típicamente fermentativos que pueden seguir dos rutas metabólicas para hidrolizar los hidratos de carbono: homofermentativa y heterofermentativa. La primera es la que, prácticamente de manera exclusiva, produce ácido láctico, responsable del descenso de pH durante la fermentación. La acidificación implica diversos efectos beneficiosos (Bacus y Brown, 1982; Geisen y col., 1992; Hugas y Monfort, 1997):

- Inhibición del crecimiento de microorganismos indeseables y patógenos, facilitando la conservación.
- Coagulación proteica, a un pH próximo al punto isoeléctrico de las proteínas cárnicas, que permite el desarrollo de la textura y cohesión características de este tipo de producto.

- Reducción de la capacidad de retención de agua de las proteínas cárnicas, acelerando el proceso de secado.
- Inducción de las reacciones de reducción de nitratos y nitritos a óxido nítrico.
- Modulación las reacciones enzimáticas que contribuyen al desarrollo del aroma y flavor¹.

Las BAL también pueden expresar cierta actividad lipolítica y proteolítica contribuyendo directamente a la formación de compuestos aromáticos y por tanto al desarrollo del aroma y flavor característicos, aunque suelen presentar más peptidasas que proteasas (Hammes y col., 1990; Nychas y Arkoudelos, 1990).

Cocos Gram-positivos catalasa-positivos

Simultáneamente al crecimiento de las BAL, se observa el desarrollo de otro grupo microbiano importante: los cocos Gram-positivos catalasa positivos (CGC+) con actividad nitrato y nitrito reductasa. Dentro de este grupo los más abundantes, gracias a su mejor crecimiento en anaerobiosis, son los estafilococos coagulasa-negativos (*S. xylosus*, *S. carnosus*). Los recuentos de este tipo de microorganismos pueden alcanzar recuentos de 10^5 - 10^7 ufc/g. La acidificación del medio inhibe su crecimiento a medida que avanza la maduración de los embutidos (Leistner, 1995).

El papel de estos microorganismos en los procesos de fermentación de la carne se centra principalmente en (Nychas y Arkoudelos, 1990; Leistner, 1995; Ordóñez y de la Hoz, 2001):

- Actividad nitrato y nitrito reductasa: convierten los nitratos a nitritos y, éstos a óxido nítrico que contribuye a la formación del color de curado.
- Actividad catalasa, degrada los peróxidos, evitando posibles alteraciones de color por oxidación de pigmentos, así como las reacciones de oxidación lipídica que podría provocar defectos organolépticos en el producto final.
- Actividad proteolítica y lipolítica, que generan una amplia variedad de precursores de sustancias aromáticas y compuestos volátiles que contribuyen a la obtención de las propiedades organolépticas características.

Se han descrito especies de *Staphylococcus* capaces fermentar azúcares y producir ácido láctico. Sin embargo, la contribución de los CGC+ a la degradación de los hidratos de carbono es mínima (Talon y col., 2002).

1.2.1.3 Seguridad de los embutidos crudos-curados

Riesgos microbiológicos

El riesgo de *Salmonella* en embutidos fermentados se considera generalmente bajo (CE, 2003). Los embutidos fermentados permiten el control de *Salmonella* gracias a la reducción de la a_w y al rápido desarrollo de las BAL, que reducen el pH. Sin embargo, a pesar de que se trata de un alimento estable, *Salmonella* puede sobrevivir en este tipo de productos (Smith y col., 1975; Levine y col., 2001), habiéndose descrito diversos brotes causados por *Salmonella* en embutidos (Van Netten y col., 1997; Moore, 2004). En cuanto a *L. monocytogenes*, se ha descrito su crecimiento durante la fermentación y supervivencia en el producto acabado (Johnson y col., 1988; Junttila y col., 1989; Aymerich y col., 2003). Los obstáculos presentes en los embutidos en general son insuficientes para evitar el crecimiento de *L. monocytogenes* (Farber y Peterkin 1991; Farber y col., 1993), así como de *E. coli* O157:H7 (Glass y col., 1992; Nissen y Holck, 1998). En Estados Unidos se asoció un brote de *L. monocytogenes* con el consumo de salami (Schwartz y col., 1989). *S. aureus* puede tolerar las condiciones ambientales de los embutidos, pero resulta un pobre competidor frente a las BAL y CGC+ utilizados como cultivos iniciadores (Metaxopoulos y col., 1981a; Metaxopoulos y col., 1981b). Por otra parte, el crecimiento de esporas de *Bacillus* y *Clostridium*, procedentes principalmente de las especias utilizadas como ingredientes y, en menor medida, de la carne se puede controlar por acción de los nitritos y valores bajos de pH y a_w (Nordal y Gudding, 1975).

Producción de aminas biógenas

Las aminas biógenas (AB) se forman a partir de aminoácidos precursores, por la acción de enzimas de origen microbiano. Existen aminas de estructura aromática: histamina, tiramina, feniletilamina y triptamina, provenientes de la descarboxilación de la histidina, tirosina, fenilalanina y triptofano, respectivamente; y aminas de estructura alifática: putrescina, cadaverina y agmatina, provenientes de la descarboxilación de la lisina, ornitina y arginina, respectivamente. Entre los microorganismos capaces de formar AB, *Enterobacteriaceae* se asocia a la producción de cadaverina y/o histamina, y las BAL (en especial *Enterococcus*) a la producción de tiramina (Bover-Cid y col., 2005). Es importante destacar que la capacidad para formar una o más aminas, así como la intensidad aminogénica varían ampliamente entre especies e incluso entre cepas bacterianas (Bover-Cid y col., 2001).

El consumo de grandes cantidades de AB, tales como histamina y tiramina, puede causar efectos toxicológicos. Se han observado crisis hipertensivas graves provocadas por interacción de las AB con los medicamentos inhibidores de la mono-aminoxidasa (IMAO), utilizados básicamente como antidepresivos. Un riesgo adicional indirecto de algunas AB es su contribución a la formación de nitrosaminas potencialmente cancerígenas, especialmente en

los productos cárnicos con nitratos y nitritos añadidos, tratados térmicamente o ahumados. Aunque las concentraciones de nitrosaminas en carne y productos cárnicos, exceptuando el bacon, suelen ser bajas (Scanlan, 1995).

La carne, los productos frescos y los productos tratados térmicamente no deberían contener aminas biógenas. La presencia de diaminas (cadaverina y putrescina) e histamina en la carne se relaciona con su alteración, al ser producidas generalmente por enterobacterias y pseudomonas, que son también los principales causantes del deterioro de la carne. Consecuentemente, las AB son útiles indicadores para valorar el estado higiénico de los productos cárnicos (Hernández-Jover y col., 1996). Sin embargo, en los productos cárnicos crudos-curados, la fermentación favorece la formación de AB como consecuencia del desarrollo de una gran variedad de microorganismos potencialmente aminogénicos, y a la proteólisis y consecuente mayor disponibilidad de aminoácidos precursores. La presencia de AB en alimentos fermentados se ha demostrado ampliamente (Montel y col., 1999; Parente y col., 2001; Bover-Cid y col., 2005). Los microorganismos fermentativos, especialmente la microbiota endógena, juegan un papel importante en la acumulación de AB (Roig-Sagués y col., 1996; Bover-Cid y col., 2001; Parente y col., 2001). Por consiguiente, la selección de cultivos iniciadores no amigénicos resulta esencial para prevenir la acumulación de aminas biógenas en los embutidos (Maijala y col., 1995; Bover-Cid y col., 2000).

1.2.2 PRODUCTOS CÁRNICOS TRATADOS POR CALOR

La norma de calidad específica de los productos cárnicos tratados por calor establece que el tratamiento térmico aplicado a estos productos debe de ser suficiente para lograr la coagulación de las proteínas cárnicas, y su envasado debe asegurar que el producto se mantenga inalterado en las condiciones normales de almacenamiento y conservación (Presidencia del Gobierno, 1983).

1.2.2.1 Tecnología de los productos cárnicos tratados por calor

Ingredientes

La sal común (NaCl) actúa como agente depresor de la actividad de agua facilitando la conservación del producto y contribuyendo al sabor del mismo. Además, la sal juega un papel esencial en la solubilización de las proteínas cárnicas y en la expansión de sus estructuras cuaternarias, contribuyendo por tanto, a la retención de agua y a la ligazón en el producto terminado. En productos cárnicos cocidos se añade en torno al 2% de sal. Los azúcares se usan fundamentalmente como depresores de la actividad de agua, aunque también influyen de manera importante en el sabor del producto. El papel fundamental del nitrito está relacionado con la formación del color típico de los productos cocidos. Tal y como se había descrito para los embutidos crudos-curados, a partir del nitrito se forma el óxido nítrico que reacciona

principalmente con la Mb formando NOMb. Como consecuencia del tratamiento térmico se produce la desnaturalización de la NOMb dando lugar a la aparición del nitrosil hemocromo, pigmento de color rosado. El nitrito ejerce un efecto bactericida sobre *Enterobacteriaceae*, *Clostridium perfringens* y *S. aureus*, siendo especialmente letal para *Clostridium botulinum* (López y col., 2001). El ascorbato sódico tiene tres funciones básicas: reductor frente al nitrito, permitiendo la formación de nitrosomioglobina de manera más rápida y con menores cantidades de nitrito, estabiliza el color del producto acabado y contribuye a evitar la formación de las nitrosaminas cancerígenas. Finalmente, los fosfatos aumentan la capacidad de retención de agua y favorecen la solubilización y extracción de proteínas miofibrilares, responsables de la ligazón.

Proceso de fabricación

El proceso descrito a continuación corresponde a la fabricación de jamón picado cocido extra. El jamón cocido de categoría extra se caracteriza por presentar: un valor máximo relación humedad/proteína de 4,13, azúcares totales máximos de 1,5%, ausencia proteínas añadidas, agar-agar, alginatos y carragenatos en cantidad máxima de 0,2% y fosfatos totales máximos de 7.500 ppm (Presidencia del Gobierno, 1983).

En la primera etapa del proceso se procede a acondicionar las materias primas. Tales operaciones incluyen, entre otras, el deshuesado y troceado de la carne. A continuación se procede al picado de la carne. Durante esta operación se rompen las fibras musculares permitiendo al medio solvente (agua y cloruro sódico) extraer las proteínas solubles. Para ello se emplea una picadora de placas o una picadora de cuchillas (*cutter*). Las proteínas disueltas tienen propiedades fijadoras de agua y grasa, formando emulsiones con una textura adecuada (López y col., 2001). Después del picado, la carne se mezcla con los demás ingredientes para obtener el producto deseado. La mezcla puede realizarse en una amasadora, en la *cutter* o en molinos coloidales. Es importante que esta etapa se realice en ausencia de aire para evitar oxidaciones indeseables, por ello normalmente se utilizan equipos de picado y amasado que trabajen al vacío (Rodríguez Rebollo, 1998). A continuación se procede al embutido de la masa de carne en tripas o en envases flexibles. Una vez realizada la embutición, se procede al tratamiento térmico de los productos. El proceso de cocción se puede realizar tanto por inmersión del producto en agua caliente como en cámaras de vapor que actúan como un horno-armario de cocción.

A continuación se detallan los principales objetivos de la cocción (López y col., 2001):

- Coagulación de las proteínas cárnicas, para ello se debe obtener una temperatura mínima de calentamiento en el centro del producto de 65°C.
- Inactivación de las enzimas de la carne (entre 60-70°C), responsables del deterioro de la textura y características organolépticas del producto.

- Obtención de las características organolépticas, color, sabor y consistencia adecuadas.
- Reducción del número de microorganismos.

El proceso de cocción debe diseñarse de manera eficiente para optimizar la capacidad de conservación y estabilidad del color con un rendimiento y sabor aceptables.

Tras la cocción, los productos deben someterse a un enfriamiento hasta alcanzar una temperatura entre 0-2°C. Un enfriamiento lento, a temperatura ambiente, resulta de interés para obtener una mayor cohesión del producto. Sin embargo, este proceso acostumbra a ser demasiado largo y podría permitir el desarrollo de microorganismos. Para acelerar el descenso de la temperatura se pueden utilizar túneles de enfriamiento o duchas de agua (Rodríguez Rebollo, 1998).

El producto se envasa al vacío en un material con baja permeabilidad al oxígeno, con el objetivo de evitar deterioro del color durante su conservación (Rodríguez Rebollo, 1998). El almacenamiento resulta decisivo para la calidad del producto y para impedir el crecimiento de microorganismos. Es aconsejable conservar los productos cárnicos tratados por calor a temperaturas entre 0 y 5°C.

Es posible que el producto se someta a una manipulación posterior al procesado, consistente en loncheado o troceado y reenvasado. Las operaciones post-procesado deben realizarse en locales especialmente destinados a tal fin para evitar la recontaminación del producto y a temperaturas no superiores a los 12°C, siendo recomendable realizar la manipulación en salas blancas.

1.2.2.2 Microbiología de los productos cárnicos tratados por calor

Los productos cárnicos pasteurizados son productos sensibles al deterioro. El bajo contenido de sal (alrededor del 2%), valores de pH en torno a 6,0 y valores de actividad de agua superiores a 0,95, son sólo pequeñas barreras para inhibir el crecimiento de microorganismos (Mataragas y col., 2003). Las BAL, capaces de crecer en condiciones de refrigeración, son las principales responsables del deterioro de los productos cárnicos cocidos envasados en atmósferas libres de oxígeno (Devlieghere y col., 2000). El deterioro del producto se manifiesta a través del agriado, aparición de limo, exudado de jugo y frecuente hinchazón del envase, que acostumbra a producirse antes de la fecha de caducidad del producto.

Un estudio financiado por la CE detectó recuentos de microorganismos totales de 10^8 ufc/g en un 95% de las muestras de jamón cocido loncheado tomadas en comercios minoristas. Éstos resultados pusieron de manifiesto la sensibilidad de este tipo de productos a la contaminación microbiana (Anónimo, 1996). En el mismo estudio se detectó la presencia de *L. monocytogenes* en el 16% de las muestras. Para prevenir la presencia de *L. monocytogenes* en el jamón cocido, es necesario no sólo asegurar una adecuada cocción (temperatura mínima de 65°C en el centro durante un mínimo de 40 min (Carlier y col., 1996), sino también prevenir

la recontaminación durante el loncheado y envasado. Por otro lado, Samelis y col. (1998) describieron a *Lactobacillus sakei* y *Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides*, provenientes de la recontaminación durante el loncheado, como principales agentes causantes de alteración en jamón cocido almaceando a 4°C y 12°C. Mientras que la principal causa de deterioro del jamón cocido entero fue un grupo no identificado de *Leuconostoc*. Aparte de las BAL, no detectaron crecimiento de otros microorganismos en el jamón envasado al vacío, ni entero ni loncheado. La formación de limo constituye otro problema de calidad derivado del crecimiento microbiano. Diversas cepas productoras de limo (*Leuconostoc carnosum* CTC747 y *L. sakei* CTC746) han sido aisladas a partir de muestras de jamón cocido defectuoso (Aymerich y col., 2002).

Las causas de contaminación en embutidos cocidos pueden deberse a la supervivencia de los microorganismos al tratamiento térmico a causa de la aplicación de una temperatura o tiempos de cocción inadecuados. Sin embargo, la mayor causa de contaminación por patógenos se debe a la contaminación cruzada durante la manipulación posterior al tratamiento térmico (CFIA, 1998). La exposición del producto durante el pelado, loncheado y reenvasado supone un riesgo de recontaminación para los productos cárnicos listos para el consumo. En el supuesto de contaminación por *L. monocytogenes*, su capacidad para crecer a bajas temperaturas permite su multiplicación en alimentos refrigerados.

1.3 TECNOLOGÍAS DE CONSERVACIÓN EMERGENTES

El desarrollo de tecnologías no térmicas, alternativas y/o complementarias a los tratamientos de conservación tradicionales, responde a la demanda creciente de alimentos mínimamente procesados. Entre estas tecnologías se tratará con detalle el tratamiento de alta presión hidrostática y la aplicación de antimicrobianos naturales.

1.3.1 TRATAMIENTO DE LOS ALIMENTOS POR ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA

La alta presión hidrostática (APH) es una tecnología no térmica que permite aumentar la seguridad microbiológica de los alimentos y alargar su vida útil. El tratamiento APH es especialmente interesante para aquellos alimentos con características funcionales y sensoriales sensibles al calor. La presión no deteriora nutrientes termolábiles tales como las vitaminas, ni altera los compuestos de bajo peso molecular, fundamentalmente aquéllos responsables del aroma y el sabor (Smelt, 1998). Sin embargo, se produce la desnaturalización o modificación de las proteínas, inactivación de enzimas, cambios en las interacciones sustrato-enzima, así como en hidratos de carbono y grasas (Butz y Tauscher, 2002).

1.3.1.1 Principios generales y equipos de alta presión hidrostática

Los efectos de la alta presión hidrostática están gobernados por dos principios: el principio de Le Chatelier y el principio de Pascal. El principio de Le Chatelier mantiene que cualquier fenómeno que implique una reducción de volumen se verá potenciado cuando se aplica presión. Por otro lado, el principio de Pascal sostiene que el incremento de presión aplicado a una superficie de un fluido incompresible, contenido en un recipiente indeformable, se transmite de manera instantánea y con el mismo valor a cada una de las partes del mismo, por lo que se transmitirá de manera uniforme al alimento, independientemente de su tamaño y geometría (Smelt, 1998).

Un equipo típico de APH consiste en una cámara de presurización, fluido transmisor de la presión (normalmente agua para usos alimentarios) y bombas para generar la presión. Las cámaras de presurización para uso comercial acostumbran a tener capacidades de 35 a 350 litros. Los alimentos, previamente envasados, se introducen en la cámara de presurización, ésta se cierra y se carga el fluido transmisor. Una vez se ha alcanzado la presión deseada, el bombeo de fluido se para, las válvulas se cierran y la presión se mantiene sin necesidad de aportación adicional de energía. Las presiones utilizadas habitualmente en la industria alimentaria se sitúan en el intervalo de 300 a 700 MPa (Ordóñez y col., 2004).

1.3.1.2 Efecto de la APH sobre los microorganismos

Factores intrínsecos

Existen numerosas referencias sobre los cambios inducidos por el tratamiento de presión en las células microbianas, incluyendo alteraciones en la membrana celular, en la morfología de las células, efectos sobre las proteínas, enzimas y mecanismos genéticos (Hoover y col., 1989; Smelt, 1998; Tewari y col., 1999). Sin embargo, los mecanismos de inactivación microbiana todavía no se han clarificado por completo (Patterson, 2005).

La presión no inhibe o destruye una función celular específica sino que afecta una combinación de procesos. Como consecuencia de la presurización se han observado diversos efectos: compresión del gas de las vacuolas, separación de la membrana y la pared celular, formación de poros en la pared celular, modificaciones en los núcleos y los orgánulos intracelulares, coagulación de la proteína citoplasmática y liberación de constituyentes intracelulares (Téllez y col., 2001). Por otro lado, existen evidencias del daño físico y la pérdida de funcionalidad provocados por la presión sobre la membrana celular (Smelt, 1998; Wouters y col., 1998). Parece que las células en fase exponencial de crecimiento son inactivadas de manera irreversible a causa de la presión. Al contrario, las células en fase estacionaria tienen una membrana citoplasmática más robusta que les proporcionaría una mayor resistencia a la presión (Mañas y Mackey, 2004). La membrana celular juega un papel muy importante en el transporte y respiración celular. La desestabilización de la membrana aumenta su permeabilidad, causando importantes daños en la célula. La pared celular se ve afectada en

menor medida que la membrana y, normalmente, no se detectan cambios morfológicos en procariotas.

La formación de enlaces de hidrógeno implica una reducción de volumen y se ve por tanto favorecida por el aumento de la presión. La presurización favorece la desnaturalización proteica. A presiones bajas o moderadas (<100 MPa), la formación de enlaces de hidrógeno permite mantener la estructura helicoidal de las proteínas, minimizándose así los efectos sobre éstas. Presiones del orden de 100-300 MPa comportan una desnaturalización reversible, y presiones superiores a 300 MPa provocan la desnaturalización irreversible de las proteínas (Hoover y col., 1989). La presión afecta también a las interacciones hidrofóbicas. A presiones inferiores a 100 MPa, éstas experimentan un aumento de volumen y se disocian, mientras que a presiones superiores, las interacciones hidrofóbicas van acompañadas de una reducción de volumen y acostumbran a estabilizarse (Hoover y col., 1989). Los efectos inhibidores de la presión sobre los microorganismos también se podrían atribuir a la inactivación de enzimas. Las principales razones de la inactivación de las enzimas son la alteración intramolecular de las estructuras y cambios conformacionales en el centro activo. Los ácidos nucleicos, aún siendo sensibles a la presión, resultan más resistentes que las proteínas, posiblemente a causa de la mayor cantidad de enlaces intramoleculares de hidrógeno presentes en el ADN. A pesar de la estabilidad del ADN frente a la presión, los procesos de replicación y transcripción, mediados por enzimas, se pueden interrumpir a causa de la presión (Smelt, 1998).

El grado de inactivación microbiana provocado por la APH depende, en primer lugar, del tipo de microorganismo afectado. La sensibilidad de los microorganismos a la presión se puede ordenar, de mayor a menor: mohos y levaduras, bacterias Gram-negativas, bacterias Gram-positivas, virus y esporas bacterianas (Ordóñez y col., 2004). Los mohos y levaduras son inactivados a presiones entre 200-300 MPa. Las bacterias Gram-negativas son destruidas generalmente a presiones entre 300-400 MPa, aunque patógenos de interés alimentario como *E. coli* O157:H7 presentan una elevada resistencia a la presión (Patterson y col., 1995). Entre las bacterias Gram-positivas merecen especial mención las especies del género *Staphylococcus*, que pueden sobrevivir tras la aplicación de presiones de 500 MPa durante 60 min (Earnshaw y col., 1995). Los virus son muy heterogéneos por lo que su resistencia es muy variable. Las esporas microbianas pueden resistir presiones superiores a 1.000 MPa (Kalchayanand y col., 1998).

Factores extrínsecos

Son numerosos los factores que pueden condicionar los efectos de la APH sobre los microorganismos. Entre ellos se encuentran: la temperatura, el tiempo de tratamiento, la presión aplicada, la presencia de sustancias antimicrobianas y la matriz alimentaria utilizada. Valores de pH ácidos aumentan la sensibilidad frente a la APH (Smelt, 1998; Alpas y col., 2000). Además valores bajos de pH retrasan el inicio del crecimiento de las células dañadas por la presión. Otro factor de gran importancia es la actividad de agua que, por sí misma, inhibe eficazmente el crecimiento microbiano. Sin embargo, ésta se comporta de forma antagónica,

dado que a menor a_w , mayor es la resistencia a la presión (Ordóñez y col., 2004). La composición del medio también influye de manera decisiva sobre el efecto de la presión. Medios ricos en nutrientes acostumbra a aumentar la tolerancia de los microorganismos a las altas presiones (Hoover y col., 1989).

Las células bacterianas sometidas a un tratamiento por APH sufren un daño que puede ser reversible si se dan condiciones favorables durante un almacenamiento prolongado en un sustrato adecuado (Styles y col., 1991; Patterson y col., 1995; Chen y Hoover, 2003). La posible resistencia a la presurización de las células microbianas implica la necesidad de realizar un seguimiento microbiológico del producto tratado por alta presión durante su conservación, para evaluar la posible recuperación de las células dañadas durante la vida útil del producto (Garriga y col., 2002a).

1.3.1.3 Presurización de productos cárnicos

El efecto antimicrobiano de la presión se presenta como el principal atractivo para aplicar la alta presión hidrostática a los productos cárnicos. Garriga y col. (2002a) describieron una reducción de *E. coli*, *S. aureus* y levaduras después de un tratamiento APH (600 MPa, 6 min, 31°C) de jamón cocido loncheado, sin recuperación durante 120 días en refrigeración. En el producto acabado no se detectó *Campylobacter*, pero sí prevalencia de *L. monocytogenes* y *Salmonella*. Por su parte, Shigehisa y col. (1991) observaron la eliminación de *S. Thyphimurium* en homogeneizados cárnicos tratados a 300 MPa (10 min, 25°C). Carlez y col. (1993) observaron la total inactivación de *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* y *L. innocua* a 20°C, aplicando presiones superiores a 280, 200 y 400 MPa, respectivamente. A su vez, el tratamiento de carne picada a 400-450 MPa descrito por Carlez y col. (1994) inhibió totalmente el crecimiento de microorganismos. No obstante, pasados 3-9 días del tratamiento, se detectó *Pseudomonas* spp. en la carne refrigerada a 3°C, demostrándose así que las células no quedaron completamente inactivadas, y pudieron recuperar la viabilidad.

El efecto de la presión en el color y en el contenido de la mioglobina de carne picada envasada al vacío, en aire y en oxígeno fue investigado por Carlez y col. (1995). Se observó decoloración de la carne sometida a 200-350 MPa. Presiones entre 200-500 MPa provocaron un descenso del contenido de mioglobina y oximioglobina, mientras que a 400-500 MPa aumentó de metamioglobina. Por otro lado, Brunn y Skibsted (1996) describieron un descenso de la oxidación de la nitrosomioglobina al aumentar la presión en un modelo cárnico curado. Finalmente, Cheah y Ledward (1996) relacionaron el efecto de la presión sobre la oxidación lipídica de la carne picada de cerdo. Las muestras presurizadas mostraron una oxidación más rápida que los controles a presiones superiores a 300 MPa. La presurización aumentó la desnaturalización de las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas, así como la oxidación de la mioglobina/ oximioglobina a metamioglobina.

1.3.2 ADICIÓN DE ANTIMICROBIANOS NATURALES

La tendencia general a reducir los niveles de aditivos sintéticos añadidos a los alimentos ha aumentado el interés hacia los antimicrobianos naturales, producidos por bacterias seleccionadas.

1.3.2.1 Lactato- Diacetato

Los lactatos sódico y potásico son sales del ácido láctico presentes de forma natural en el tejido animal. El lactato actúa como agente bacteriostático incrementando la fase de latencia de los microorganismos. La acción específica del lactato se atribuye a mecanismos que interfieren en el metabolismo microbiano tales como la acidificación intracelular y la interferencia del transporte de protones a través de la membrana celular. El lactato tiene un espectro de actuación amplio, mostrándose efectivo contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos. Entre ellos, se ha descrito su capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos tales como *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Clostridium*. Además, el lactato provoca una reducción de los valores de a_w de los alimentos (Rodríguez, 2005). La adición de lactato a alimentos con valores de pH neutros favorece la extensión de su vida útil (Houtsma y col., 1993). Los lactatos presentan, en general, un pH neutro, de manera que su aplicación no altera el pH del alimento. La presencia de lactato en los productos cárnicos reduce la formación de exudados debido a su capacidad tamponadora, que estabiliza los valores de pH a lo largo de su vida útil (Rodríguez, 2005). Diversos autores han descrito los efectos antimicrobianos de los lactatos añadidos a productos cárnicos (Shelef y Potluri, 1995; Eckert y col., 1997; Devlieghere y col., 2000). Cantidades de lactato entre un 2-4% inhibieron el crecimiento de *L. monocytogenes* en productos cárnicos refrigerados entre 1 y 10°C (Weaver y Shelef, 1993; Miller y Acuff, 1994; Blom y col., 1997).

Por otro lado, el diacetato sódico, acidificante de origen natural, es también un potente agente antimicrobiano. Diversos estudios han descrito su capacidad para inhibir *L. monocytogenes*, a concentraciones iguales o superiores al 0,2%, en productos cárnicos (Schlyter y col., 1993; Blom y col., 1997). La aplicación combinada del lactato y diacetato sódico provoca un efecto sinérgico que incrementa su efecto inhibitorio contra *L. monocytogenes* (Samelis y col., 2000; Mbandi y Shelef, 2002).

El uso del lactato sódico (E-325), el lactato potásico (E-326) y el diacetato sódico (E-262-II) como aditivos para la fabricación de productos cárnicos está permitido en Europa (CE, 1995) y en EEUU (FSIS/USDA, 2000). Desde el punto de vista sensorial, para evitar la aparición de sabores anormales en los productos cárnicos, se recomienda añadir una cantidad de diacetato entre el 0,10 y el 0,12%. En cuanto al lactato, no se han detectado connotaciones sensoriales negativas derivadas de su aplicación.

1.3.2.2 Bacteriocinas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) forman parte de la microbiota endógena de la carne y juegan un importante papel en su conservación. Las BAL inhiben del crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos, gracias a la competencia por los nutrientes y a la producción de metabolitos antimicrobianos tales como: ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, etanol y bacteriocinas (Hugas y col., 2002). Las bacteriocinas producidas por las BAL son péptidos de bajo peso molecular, catiónicos, hidrofóbicos, anfipáticos. La producción de bacteriocinas responde a una función protectora, en la medida que inhibe el crecimiento de microorganismos competidores por el mismo nicho ecológico o los mismos nutrientes. Por este motivo, las bacteriocinas normalmente acostumbran a ser efectivas contra un pequeño espectro de microorganismos, similares al productor y que compiten con él por un mismo y escaso recurso (Deegan y col., 2006).

Las bacteriocinas producidas por las BAL se pueden clasificar en diversos grupos, aunque la mayoría pertenecen a las clases I y II. En los últimos años se ha producido una emergencia de las bacteriocinas pertenecientes al grupo IIa, que se presentan como uno de los grupos de péptidos antimicrobianos más interesantes para usar en la conservación de alimentos (Cleveland y col., 2001).

Las bacteriocinas de la clase IIa son péptidos pequeños (<10 kDa), compuestos por 37 a 48 aminoácidos, no-lantibióticos, termoestables, catiónicos y con valores de pI situados en un rango de pH de 8 a 10. Su estructura consistente en un grupo hidrofílico N-terminal y un grupo hidrofóbico y/o anfifílico C-terminal. Las bacteriocinas pertenecientes a la clase IIa, por su homología a la pediocina PA-1, son denominadas como bacteriocinas afines a la pediocina (Hugas y col., 2002).

Las bacteriocinas inducen la permeabilización de la membrana celular, probablemente derivada de la formación de poros ión-selectivos que provocan la pérdida de la fuerza motriz protónica y el agotamiento del ATP intracelular (Dridger y col., 2006). En un primer momento, la bacteriocina interactúa con las estructuras superficiales de la célula diana, tales como la membrana y/o una molécula receptora. La unión inicial viene influenciada por la composición y carga de la membrana, y la presencia, disponibilidad y estructura de un receptor. El siguiente efecto se produce a nivel de composición de la membrana, la estructura de la C-terminal de las bacteriocinas y la presencia de proteínas inmunes (Dridger y col., 2006).

El espectro antimicrobiano se define como el grupo de cepas que muestran sensibilidad frente a una bacteriocina. Las bacteriocinas de la clase IIa tienen un espectro de actividad bastante limitado. Todas las bacteriocinas de la clase IIa descritas hasta el momento presentan actividad antagonista contra *L. monocytogenes* (Dridger y col., 2006). También se ha descrito su actividad contra otras bacterias Gram-positivas tales como *Enterococcus*, *Bacillus cereus*, y *Staphylococcus aureus*.

Enterocinas

Las enterocinas A y B son producidas por *Enterococcus faecium* CTC492 (Aymerich y col., 1996; Nilsen y col., 1998). Ambas han mostrado su actividad contra bacterias Gram-positivas como *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Propionibacterium* spp., *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Casaus y col., 1997). Sin embargo, no se ha observado efecto inhibitorio alguno sobre bacterias Gram-negativas. La enterocina A pertenece al grupo de bacteriocinas afines a la pediocina (peso molecular de 4.829 Da), mientras que la enterocina B es una bacteriocina no afín a la pediocina (peso molecular de 5.465 Da) (Aymerich y col., 2000). Entre ellas, la enterocina A es la que presenta mayor actividad, especialmente frente a *L. monocytogenes* y *S. aureus* (Casaus y col., 1997).

Aplicación en alimentos

Las bacteriocinas se pueden aplicar a los alimentos de maneras muy diversas: como cultivos iniciadores, como envase activo incluidas en un envase o tripa, en la masa cárnica y/o pulverizado en la superficie del alimento (Hugas y col., 2002).

La nisina (E-234) es la única bacteriocina incluida en la lista positiva de aditivos alimentarios, RD 142/2002 (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002). Esta normativa limita el uso de la nisina como conservante a los siguientes alimentos, en las cantidades máximas especificadas: postres a base de semolina y tapioca (3 mg/Kg), queso fundido y curado (12,5 mg/Kg), *mascarpone* y *clotted cream* (10 mg/Kg). La nisina es la única bacteriocina producida industrialmente, comercializada en dos formatos Nisaplin™ y Crisin®. En el mercado se pueden encontrar productos derivados de fermentaciones microbianas que contienen bacteriocinas (p.e. ALTA™ y Microgard®). Al tratarse de productos derivados de la fermentación, éstos pueden ser utilizados como ingredientes para alargar la vida útil de los alimentos (Aymerich y col., 1998).

La efectiva inhibición de *L. monocytogenes* por parte de bacteriocinas se ha demostrado en gran variedad de productos cárnicos: en carne fresca (Nielsen y col., 1990), en embutidos fermentados (Campanini y col., 1993; Hugas y col., 1995), en salchichas tipo frankfurt (Yousef y col., 1991; Degnan y col., 1992) y en jamón cocido (Aymerich y col., 2005).

1.3.2.3 Envasado activo

El envasado activo es un concepto innovador que puede definirse como un tipo de envasado en que el envase, el producto y el entorno que lo rodea interactúan para alargar la vida útil de los alimentos, mejorar las propiedades organolépticas y/o seguridad alimentaria, manteniendo la calidad del producto (Vermeiren y col., 1999; Suppakul y col., 2003). El envasado activo permite mejorar la funcionalidad del envase gracias a la adición de una sustancia activa al material de envasado (Appendini y Hotchkiss, 2002). Los componentes activos incorporados al envase pueden ser capaces, por ejemplo, de absorber oxígeno, controlar la concentración de dióxido de carbono o etileno, desprender etanol, liberar antioxidantes, regular la humedad o

controlar el crecimiento de microorganismos (Gennadios y col., 1997; Vermeiren y col., 1999; Han, 2000). Las bacteriocinas se pueden incorporar al material de envasado destinado a entrar en contacto con el alimento, formando un envase antimicrobiano. Este sistema combina la función conservante de las bacteriocinas con los materiales convencionales de envasado, que protegen el alimento de los contaminantes externos (Deegan y col., 2006).

El principal objetivo del envasado antimicrobiano es la extensión de la vida útil del producto y la reducción del riesgo de microorganismos patógenos. El crecimiento de los microorganismos se ve limitado o inhibido gracias a la prolongación de la fase de latencia, a la reducción de la tasa de crecimiento y/o a la reducción de los recuentos microbiológicos. Las sustancias antimicrobianas añadidas al material de envasado migrarán al alimento de forma gradual durante el almacenamiento y la distribución del mismo. Esta tecnología de envasado resulta efectiva para evitar o minimizar la contaminación superficial de los alimentos, de aquí el interés de su aplicación en productos cárnicos listos para el consumo en los que, debido a la manipulación post-procesado, la contaminación ocurre principalmente en la superficie del producto (Han, 2005). El envasado antimicrobiano permite reducir la cantidad de agentes antimicrobianos que normalmente se añaden a los alimentos, ya sea superficialmente (spray o inmersión) o añadidos directamente a la masa cárnica. El envasado antimicrobiano permite una liberación controlada del agente antimicrobiano, evitando la rápida difusión del antimicrobiano de la superficie al interior de la masa cárnica. Algunos agentes antimicrobianos usados en el envasado de alimentos son ácidos orgánicos, sulfitos, nitratos, alcoholes y antimicrobianos naturales (Han, 2000). Las sustancias antimicrobianas utilizadas en el envasado de alimentos que pueden migrar hacia el alimento son considerados aditivos alimentarios, por lo que deben cumplir la legislación vigente (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2002).

Biopolímeros

Los problemas medioambientales derivados del elevado consumo de material plástico en el sector alimentario, y el hecho de que el petróleo sea una fuente de energía no renovable, cada vez más escasa, han conducido a una continua evolución del sector. El desarrollo de materiales de envasado a base de biopolímeros supone el uso de materiales biodegradables, y ha permitido dar salida a productos agrícolas y naturales infrutilizados. Los biopolímeros se pueden extraer directamente de fuentes naturales, es el caso del alginato y la zeína, o se pueden sintetizar, como el polivinil alcohol (PVA). Novamont (Italia), Fkur Kunststoffe GmbH (Alemania), EarthShell Corporation (EEUU), NODAX (EEUU), son ejemplos de compañías que comercializan materiales de envasado fabricados a base de biopolímeros a nivel mundial (Liu, 2006).

El principal interés del uso del alginato en alimentos se debe principalmente a sus propiedades espesante, estabilizante, capacidad de formación de geles, y estabilización de emulsiones. Se trata de un polisacárido hidrofílico extraído de diversas especies de alga marrón (*Phaeophyceae*). Los alginatos contienen grupos cargados negativamente que pueden interactuar con moléculas cargadas positivamente para formar redes tridimensionales. La

capacidad de formación de gel del alginato con CaCl_2 es una técnica ampliamente utilizada. En la fabricación de láminas de alginato, el CaCl_2 también se utiliza para insolubilizar las láminas obtenidas después de la evaporación de disolvente. La zeína es una proteína perteneciente al grupo de prolaminas encontradas en el endosperma del maíz. Es soluble en alcohol e insoluble en agua debido a su bajo contenido en aminoácidos polares (Buffo y Han, 2005). Las láminas obtenidas a partir de zeína son frágiles y necesitan un plastificante para flexibilizarlas. La zeína muestra un gran potencial para usos como coberturas comestibles o como material de envasado (Buffo y Han, 2005). El PVA es un polímero sintético y soluble en agua. Sus características físicas dependen del método de obtención por hidrólisis o hidrólisis parcial del polivinil acetato (DeMerlis y Schoneker, 2003). En EEUU está aceptado su uso en la industria cosmética, farmacéutica y como aditivo indirecto en alimentos. La FDA reconoció el PVA como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) para su uso en coberturas y suplementos dietéticos (FSIS/USDA, 2004). En Europa, un informe reciente de la EFSA relativo al uso del PVA como cobertura y suplemento alimentario en forma de tabletas y/o cápsulas concluye que no supone un riesgo para la seguridad (EFSA, 2005).

Existen dos categorías de fabricación de láminas de envasado: seco o húmedo (Guilbert y col., 1996). El proceso húmedo utiliza solventes para dispersar los polímeros, seguido de un secado para evaporar el solvente y formar una estructura laminar. Para usos alimentarios, los solventes más habituales son agua, etanol y sus mezclas. Todos los ingredientes utilizados para su fabricación deben mezclarse homogéneamente con el solvente. La solución obtenida se puede utilizar como cobertura, aplicada directamente sobre el alimento, o bien se puede extender sobre una superficie plana, obteniéndose una lámina después de la evaporación del solvente (Cooksey, 2001).

Envasado antimicrobiano biodegradable de productos cárnicos

En los últimos años ha aumentado el interés por la aplicación de coberturas comestibles y láminas preparadas con materiales biodegradables, para reducir la contaminación microbiana de los productos cárnicos. Siragusa y Dickson (1992) describieron el uso de coberturas comestibles en productos cárnicos. El recubrimiento de la carne cruda con una solución de alginato y ácidos orgánicos resultó efectivo para reducir los niveles de *L. monocytogenes*, *Salmonella* Thyphimurium y *E. coli* O157:H7 en 1,8, 2,11 y 0,7 logaritmos, respectivamente. Ouattara y col. (2000) prepararon láminas antimicrobianas con inclusión de ácido propiónico o acético en una matriz de quitosano, con o sin adición de ácido láurico o cinamaldehído, y los aplicaron a embutido tipo bologna, jamón cocido y pastrami. El envasado antimicrobiano provocó un considerable retraso del crecimiento de la población de *Enterobacteriaceae* (endógena) y *Serratia liquefaciens* (inoculada de forma controlada), sin afectar al crecimiento de las bacterias lácticas. Las láminas con cinamaldehído produjeron la mayor inhibición. El uso de bacteriocinas en el envasado antimicrobiano ha sido objeto de diversos estudios. Scannell y col. (2000) incorporaron nisina y lacticina 3147 a hojas de celulosa utilizadas para envasar jamón cocido en atmósfera modificada (40:60, nitrógeno: dióxido de carbono). Observaron una

reducción de la población de bacterias lácticas así como una reducción de 2 y 2,8 log ufc/g de *L. innocua* y *S. aureus*, respectivamente. Por otro lado, Lungu y Johnson (2005) estudiaron el efecto antilisteria en salchichas de pavo recubiertas con zeína (Z), con nisina (N), diacetato sódico (D) y/o lactato sódico (L). Después de 28 días de almacenaje no se detectó presencia de *L. monocytogenes* en las salchichas recubiertas con Z-N-D y Z-N-D-L. Finalmente, Natrajan y Sheldon (2000) obtuvieron una reducción de la población de *Salmonella* Thyphimurium en pollo envasado con láminas de alginato y agar con nisina incorporada como agente antimicrobiano.

1.3.3 COMBINACIÓN DE TECNOLOGÍAS DE CONSERVACIÓN

La contaminación final de un producto cárnico es la consecuencia del crecimiento de microorganismos alterantes y/o patógenos durante su vida útil. Estos microorganismos provienen de las materias primas contaminadas, y han sobrevivido al procesado, o son contaminantes introducidos durante el procesado. Las condiciones físico-químicas (temperatura, pH, nutrientes, a_w y composición de las atmósferas) aplicadas durante el proceso constituyen barreras que juegan un papel crucial en el crecimiento de los microorganismos contaminantes.

Los productos cárnicos listos para el consumo son productos que van a ser consumidos sin cocción adicional. Si a ello sumamos que las características de los productos fermentados de baja acidez y los productos cocidos loncheados suponen débiles barreras al crecimiento microbiano, surge la necesidad de aplicar tecnologías adecuadas que sirvan de obstáculos al crecimiento de microorganismos patógenos y deteriorantes.

El concepto de la combinación de obstáculos, tal y como se ha comentado anteriormente, es un concepto tradicionalmente utilizado para la obtención de productos cárnicos fermentados (Leistner y Gorris, 1995). Resulta especialmente interesante su aplicación en el caso de las tecnologías emergentes de conservación que buscan un procesado mínimo de los alimentos (Leistner, 2000). La combinación de tratamientos no térmicos con otras tecnologías de conservación puede: (1) producir un efecto aditivo o sinérgico de los tratamientos, (2) reducir la intensidad de los tratamientos individuales para conseguir la inactivación, y/o (3) prevenir la proliferación de supervivientes durante el almacenamiento del alimento (Raso y Barbosa-Canovas, 2003).

En este sentido, se ha demostrado una mayor sensibilidad a las bacteriocinas de las células dañadas subletalmente (Kalchayanand y col., 1992). La mayor efectividad del uso combinado de la APH y las bacteriocinas se ha demostrado *in vitro* (Kalchayanand y col., 1994) y en productos cárnicos (Garriga y col., 2002b; Aymerich y col., 2005).

1.4 BIBLIOGRAFÍA

- AENOR. 1997. Análisis sensorial. Vocabulario (ISO 5492:1992). En AENOR (Ed.), *Análisis sensorial. Tomo I-Alimentación*. Madrid: pp. 19-54.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F. y Ray, B. 2000. Interactions of high hydrostatic pressure, pressurization temperature and pH on death and injury of pressure-resistant and pressure-sensitive strains of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 33-42.
- Anónimo. 1996. In before purchasing. *Greek consumer union (E K POI ZO) Magazine* May-June, 28-33.
- Appendini, P. y Hotchkiss, J.H. 2002. Review of antimicrobial food packaging. *Inn. Food Sci. Emerg. Technol.* 3, 113-126.
- Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L.S., Hugas, M., Garriga, M. y Nes, I.F. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 1676-1682.
- Aymerich, M.T., Hugas, M. y Monfort, J.M. 1998. Review: Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. *Food Sci. Technol. Int.* 4, 141-158.
- Aymerich, M.T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J., Monfort, J.M. y Hugas, M. 2000. Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J. Food Prot.* 63, 721-726.
- Aymerich, M.T., Garriga, M., Costa, S., Monfort, J.M. y Hugas, M. 2002. Prevention of ropiness in cooked pork by bacteriocinogenic cultures. *Int. Dairy J.* 12, 239-246.
- Aymerich, M.T., Martín, B., Garriga, M. y Hugas, M. 2003. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4583-4594.
- Aymerich, M.T., Jofré, A., Garriga, M. y Hugas, M. 2005. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. *J. Food Prot.* 68, 173-177.
- Bacus, J. y Brown, W. 1982. The use of microbial cultures: meat products. *Food Technol.* 35, 74-83.
- Bard, J. y Townsend, W.E. 1976. Carnes curadas. En Price, J.F. y Schweigert, B.S. (Ed.), *Ciencia de la carne y los productos cárnicos*. Editorial Acribia, Zaragoza: pp. 463-521.
- Blom, H., Nerbrink, E., Dainty, R., Hagtvedt, T., Borch, E., Nissen, H. y Nesbakken, T. 1997. Addition of 2.5% lactate and 0.25% acetate controls growth of *Listeria monocytogenes* in

- vacuum-packed, sensory-acceptable serelat sausage and cooked ham stored at 4°C. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 71-76.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M.C. 2000. Reduction of biogenic amine formation using a negative amino acid-decarboxylase starter culture for fermentation of fuet sausages. *J. Food Prot.* 63, 237-243.
- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M.C. 2001. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 185-189.
- Bover-Cid, S., Latorre-Moratalla, M.L., Garriga, M. y Vidal-Carou, M.C. 2005. Aminas biógenas en productos cárnicos: un repaso a su origen, importancia y control. *Eurocarne* 141.
- Brunn, J.L. y Skibsted, L.H. 1996. High pressure effects on the oxidation of nitrosylmyoglobin. *Meat Sci.* 44, 145-149.
- Buffo, R.A. y Han, J.H. 2005. Edible films and coatings from plant origin proteins. En Han, J.H. (Ed.), *Innovations in food packaging*. Elsevier Academic Press, London: pp. 277-300.
- Butz, P. y Tauscher, B. 2002. Emerging technologies: chemical aspects. *Food Res. Int.* 35, 279-284.
- Campanini, M., Pedrazzoni, I., Barbuti, S. y Baldini, P. 1993. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic-acid bacteria starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 20, 169-175.
- Campbell-Platt, G. 1995. Fermented meats- A world perspective. En Campbell-Platt, G. y Cook, P.E. (Ed.), *Fermented meats*. Black academic & professional, London, UK: pp. 39-52.
- Caplice, E. y Fitzgerald, G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 131-149.
- Carlez, A., Rosec, J.P., Richard, N. y Cheftel, J.C. 1993. High pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 26, 357-363.
- Carlez, A., Rosec, J.P., Richard, N. y Cheftel, J.C. 1994. Bacterial growth during chilled storage of pressure-treated minced meat. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 27, 48-54.
- Carlez, A., Veciana-Nogués, M.T. y Cheftel, J.C. 1995. Changes in colour and myoglobin of minced meat due to high pressure processing. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 28, 528-538.
- Carrier, V., Augustin, J.C. y Rozier, J. 1996. Destruction of *Listeria monocytogenes* during a ham cooking process. *J. Food Prot.* 59, 592-595.
- Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L.M., Nes, I.F., Hernandez, P.E. y Holo, H. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* 143, 2287-2294.

- CE. 1995. European Directive 95/2/CE relative to food additives other than colors and sweeteners. *Official Journal* L61, 1-40.
- CE. 2003. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary measures relating to public health on *Salmonellae* in foodstuffs. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out66_en.pdf. Fecha acceso: 13-12-07.
- CE. 2005. Commission Regulation (CE) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L338, 1-26.
- CFIA. 1998. HACCP generic model: cooked sliced ham. Canadian Food Inspection Agency. Disponible en: <http://www.inspection.gc.ca/english/fssa/polstrat/haccp/hamjam/hamjam5e.shtml>. Fecha acceso: 1-02-07.
- Cheah, P.B. y Ledward, D.A. 1996. High pressure effects on lipid oxidation in minced pork. *Meat Sci.* 43, 123-134.
- Chen, H. y Hoover, D.G. 2003. Pressure inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* ATCC 35669. *Int. J. Food Microbiol.* 87, 161-171.
- Cleveland, J., Montville, T., Nes, I.F. y Chikindas, M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 1-20.
- CNE. 2005b. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 1993-2002 (excluye brotes hídricos). *Boletín Epidemiológico Semanal* 12: 289-296.
- CNE. 2005a. Resultados de la declaración al Sistema de Información Microbiológica. *Boletín Epidemiológico Semanal* 13, 265-276.
- Cooksey, K. 2001. Antimicrobial food packaging materials. *Additives for polymers* August, 6-10.
- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 564-582.
- Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. y Ross, P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16, 1058-1071.
- 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.
- DeMerlis, C.C. y Schoneker, D.R. 2003. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food Chem. Toxicol.* 41, 319-326.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Bernaert, H., Van Impe, J.F. y Debevere, J. 2000. Shelf life of modified atmosphere packed cooked meat products: addition of Na-lactate as fourth shelf life determinative factor in a model and product validation. *Int. J. Food Microbiol.* 58, 93-106.
- Drider, D., Fimland, G., Héchar, Y., McMullen, L.M. y Prévost, H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 564-582.

- Earnshaw, R.G., Appleyard, J. y Hurst, R.M. 1995. Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 197-219.
- Eckert, L.A., Maca, J.V., Miller, R.K. y Acuff, G.R. 1997. Sensory, microbial and chemical characteristics of fresh aerobically stored ground beef containing sodium lactate and sodium propionate. *J. Food Sci.* 62, 429-433.
- EFSA. 2005. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to the use of polyvinyl alcohol as a coating agent for food supplements. *The EFSA Journal* 294. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/afc/afc_opinions/1352.Par.0001.File.dat/afc_op_ej294_pva_op_en1.pdf. Fecha acceso: 10-12-06.
- EFSA. 2006b. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union in 2004. ISSN 1830-5458. European Food Safety Authority, Parma, Italy. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/monitoring_zoonoses/reports/1277.Par.0022.File.dat/zoonoses2004-levels1-2-part11.pdf. Fecha acceso: 10-12-06.
- EFSA. 2006a. 2005 Zoonoses in the European Union. ISBN 10-92-9199-044-2. European Food Safety Authority, Parma, Italy. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring_zoonoses/reports/zoonoses_report_2005.html. Fecha acceso: 10-12-06.
- Farber, J.M. y Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*: A Food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* 55, 476-486.
- Farber, J.M., Daley, E., Holley, R. y Osborne, W.R. 1993. Survival of *Listeria monocytogenes* during the production of uncooked German, American and Italian-style fermented sausages. *Food Microbiol.* 10, 123-132.
- Forsythe, S.J. 2000. Food poisoning microorganisms. En *The microbiology of safe food*. Blackwell Science, Ltd., Oxford: pp. 142-192.
- FSIS. 2002. FSIS Directive 10,240.3: Microbial sampling of ready-to-eat (RTE) products of the FSIS verification testing program. FSIS/USDA, Washington, D.C.
- FSIS/USDA. 2000. 9 CFR Part 424: Food additives for use in meat and poultry products: sodium diacetate, sodium acetate, sodium lactate and potassium lactate. *Federal Register* 65, 3121-3123.
- FSIS/USDA. 2004. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000141 [Polyvinyl Alcohol].
- Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M. y Hugas, M. 2002b. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiol.* 19, 509-518.

- Garriga, M., Aymerich, M.T. y Hugas, M. 2002a. Tecnologías emergentes en la conservación de productos cárnicos: altas presiones hidrostáticas en jamón cocido loncheado. *Eurocarne* 104: 77-84.
- Geisen, R., Lücke, F.K. y Kröckel, L. 1992. Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtschaft* 72, 894-898.
- Gennadios, A, Hanna, MA y Kurth, LB. 1997. Application of edible coatings on meats, poultry and seafoods: a review. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 30, 337-350.
- Glass, K.A., Loeffelholz, J.M., Ford, J.P. y Doyle, M.P. 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride in fermented, dry sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2513-2516.
- Guilbert, S., Cuq, B. y Gontard, N. 1996. Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. *Food Addit. Contam.* 14, 741-751.
- Hammes, W.P., Bantleon, A. y Min, S. 1990. Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* 87, 165-174.
- Han, J.H. 2000. Antimicrobial food packaging. *Food Technol.* 54, 56-65.
- Han, J.H. 2005. Antimicrobial packaging systems. En Han, J.H. (Ed.), *Innovations in food packaging*. Elsevier Academic Press, London: pp. 80-107
- Hernández-Jover, T., Izquierdo-Pulido, M., Veciana-Nogués, M.T. y Vidal-Carou, M.C. 1996. Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in meat and meat products. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2710-2715.
- Hoover, D.G., Metrick, C., Papineau, A.M., Farkas, D.F. y Knorr, D. 1989. Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technol.* 43, 99-107.
- Houtsma, P.C., de Wit, J.C. y Rombouts, F.M. 1993. Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms occurring in meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 20, 247-257.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. y Monfort, J.M. 1995. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 322-330.
- Hugas, M. y Monfort, J.M. 1997. Bacterial starter cultures of meat fermentation. *Food Chem.* 59, 547-554.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. y Monfort, J.M. 2002. Bacterial cultures and metabolites for the enhancement of safety and quality in meat products. En Toldrà, F. (Ed.), *Research Advances in the Quality of Meat Products*. Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India: pp. 225-247.

- ICMSF. 1996. Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. ICMSF (Ed.), Blackie Academic & Professional, Suffolk.
- Johnson, J.L., Doyle, M.P., Cassens, R.G. y Schoeni, J.L. 1988. Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 497-501.
- Junttila, J., Hirn, J., Hill, P. y Nurmi, E. 1989. Effect of different levels of nitrite and nitrate on the survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of fermented sausage. *J. Food Prot.* 52, 158-161.
- Kalchayanand, N., Hanlin, M. y Ray, B. 1992. Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.* 15, 239-243.
- Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C.P. y Ray, B. 1994. Hydrostatic pressure and electroporation have increased bactericidal efficiency in combination with bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4174-4177.
- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C.P. y Ray, B. 1998. Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. *Food Microbiol.* 15, 207-214.
- Leistner, L. 1995. Stable and safe fermented sausages world-wide. En Campbell-Platt, G. y Cook, P.E. (Ed.), *Fermented meats*. Black academic & professional, Glasgow: pp. 160-175
- Leistner, L. y Gorris, L.G.M. 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.* 6, 42-46.
- Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Int. J. Food Microbiol.* 55, 181-186.
- Levine, P., Rox, B., Green, S., Ransom, G. y Hill, W.E. 2001. Pathogen testing of ready-to-eat meat and poultry products collected at federally inspected establishments in the United States, 1990–1999. *J. Food Prot.* 64, 1188-93.
- Liu, L. 2006. Bioplastics in food packaging: Innovative technologies for biodegradable packaging. Disponible en: <http://www.iopp.org/files/SanJoseLiu.pdf?pageid=pageid>. Fecha acceso: 3-03-07.
- López, N., Martínez, M., Pascual, A., Gisber, M., Aparicio, J., Giner, N. y Monleón, C. 2001. Tecnología de fabricación del jamón cocido. En Bejarano, M. (Ed.), *Enciclopedia de la carne y los productos cárnicos*. Ediciones Martín & Macías, Plasencia: pp. 1351-1376.
- Lücke, F.K. y Hechelmann, H. 1987. Starter cultures for dry sausages and raw ham. *Fleischwirtschaft* 67, 307-314.
- Lücke, F.K. 1998. Fermented sausages. En Wood, B.J.B. (Ed.), *Microbiology of Fermented Foods*. Blackie Academic & Professional, London: pp. 441-483.

- Lueck, E. 1980. Antimicrobial food additives. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg N.Y., Germany.
- Lungu, B. y Johnson, M.G. 2005. Fate of *Listeria monocytogenes* inoculated onto the surface of model turkey frankfurter pieces treated with zein coatings containing nisin, sodium diacetate, and sodium lactate at 4°C. *J. Food Prot.* 68, 855-859.
- Maijala, R., Eerola, S., Lievonen, S., Hill, P. y Hirvi, T. 1995. Formation of biogenic amines during fermentation of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw materials. *J. Food Sci.* 60, 1187-1190.
- Mañas, P. y Mackey, B.M. 2004. Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential -and stationary-phase cells of *Escherichia coli*: relationship with Cell Death. *Appl. Environ. Microbiol.* 20, 1545–1554.
- Mataragas, M., Drosinos, E.H. y Metaxopoulos, J. 2003. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4+/-2°C. *Food Microbiol.* 20, 259-265.
- Mbandi, E. y Shelef, L.A. 2002. Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef bologna. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 191-198.
- Metaxopoulos, J., Genigeorgis, C., Fanelli, M.J., Franti, E. y Cosma, E. 1981a. Production of Italian dry salami. I. Initiation of staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. *J. Food Prot.* 44, 347-352.
- Metaxopoulos, J., Genigeorgis, C., Fanelli, M.J., Franti, C. y Cosma, E. 1981b. Production of Italian dry salami II: effect of starter culture and chemical acidulation on staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 863-871.
- Miller R.K. y Acuff G.R. 1994. Sodium lactate affects pathogens in cooked beef. *J. Food Sci.* 59, 15–19.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. 2002. Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. *B.O.E.* 44: 6756-6799.
- Montel, M., Mason, F. y Talon, R. 1999. Comparison of biogenic amine content in traditional and industrial French dry sausages. *Sci. Aliments* 19, 247-254.
- Moore, J.E. 2004. Gastrointestinal outbreaks associated with fermented meats. *Meat Sci.* 67, 565-568.
- Natrajan, N. y Sheldon, B.W. 2000. Inhibition of *Salmonella* on poultry skin using protein- and polysaccharide-based films containing a nisin formulation. *J. Food Prot.* 63, 1268-1272.

- Nielsen, J.W., Dickson, J.S. y Crouse, J.D. 1990. Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2142-2145.
- Nilsen, T., Nes, I.F. y Holo, H. 1998. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC492. *J. Bacteriol.* 180, 1848-1854.
- Nissen, H. y Holck, A. 1998. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella kentucky* in norwegian fermented, dry sausage. *Food Microbiol.* 15, 273-279.
- Nollas, J. 2002. Listeriosis, síntomas variables y mortalidad elevada Disponible en: <http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2002/01/23/646.php>. Fecha de acceso: 4-10-06.
- Nordal, J. y Gudding, R. 1975. The inhibition of *Clostridium botulinum* type B and E in salami sausage. *Acta Vet. Scand.* 16, 537-548.
- Nychas, G.J.E. y Arkoudelos, J.S. 1990. Staphylococci: their role in fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 167S-188S.
- Ordóñez, J., Hierro, A., Bruna, J. y Hoz, L. 1999. Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39, 329-367.
- Ordóñez, J., Zurera, G., Bosch, A., Otero, A. y Guamis, B. 2004. Opinión del Comité científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Dirección Ejecutiva, en relación con la aplicación de altas presiones en carne y productos cárnicos. *Agencia Española de Seguridad Alimentaria*.
- Ordóñez, J.A. y de la Hoz, L. 2001. Embutidos crudos curados. Tipos. Fenómenos madurativos. Alteraciones. En Bejarano, M. (Ed.), *Enciclopedia de la carne y los productos cárnicos*. Ediciones Martín & Macías, Plasencia: pp. 1063-1090.
- Ouattara, B., Simard, R.E., Piette, G., Bégin, A. y Holley, R.A. 2000. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 139-148.
- Parente, E., Martuscelli, M., Gardini, F., Griego, S., Crudele, M.A. y Suzzi, G. 2001. Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. *J. Appl. Microbiol.* 90, 882-891.
- Patterson, M.F., Quinn, M., Simpson, R. y Gilmour, A. 1995. Sensitivity of vegetative pathogens to high hydrostatic-pressure treatment in phosphate-buffered saline and foods. *J. Food Prot.* 58, 524-529.
- Patterson, M.F. 2005. Microbiology of pressure-treated foods. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1400-1409.
- Presidencia del Gobierno. 1980. Orden de 7 de febrero de 1980, por la que se aprueba la norma de calidad para los productos cárnicos embutidos crudo-curados en el mercado interior. *B.O.E.* 70, 6280-6284.

- Presidencia del Gobierno. 1983. Orden de 29 de junio de 1983, por la que se aprueban las normas de calidad para jamón cocido y fiambre de jamón, paleta cocida y fiambre de paleta y magro de cerdo cocido y fiambre de magro de cerdo. *B.O.E.* 85, 10007-1008.
- RASFF. 2006. The Rapid Alert System for Food and Feed Annual Report 2005. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2005_en.pdf. Fecha de acceso: 5-12-2006.
- Raso, J. y Barbosa-Canovas, G.V. 2003. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 265-285.
- Rodríguez Rebollo, M. 1998. Manual de industrias cárnicas. Publicaciones Técnicas Alimentarias, S.A., Madrid.
- Rodríguez, J.J. 2005. El uso de lactatos en el control de productos cárnicos. Disponible en: <http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigacion/2005/09/07/19918.php>. Fecha acceso: 11-10-06.
- Roig-Sagués, A.X., Hernández-Herrero, M., López-Sabater, E.I., Rodríguez-Jerez, J.J. y Mora-Ventura, M.T. 1996. Histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from raw and ripened salchichon, a Spanish cured sausage. *J. Food Prot.* 59, 516-520.
- Samelis, J., Kakouri, A., Georgiadou, K.G. y Metaxopoulos, J. 1998. Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. *J. Appl. Microbiol.* 84, 649-660.
- Samelis, J., Stroheeker, K., Sofos, J.N., Belk, K.E., Scanga, J.A. y Smith, C. 2000. Screening of antimicrobials against *Listeria monocytogenes* in pork bologna. Presentado en: *46 th ICoMST 2000*, Argentina.
- Sanz, Y., Vila, R., Toldrá, F. y Flores, J. 1998. Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of non-fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 42, 213-217.
- Scanlan, R. 1995. Volatile nitrosamines in foods-an update. En Charalambous, G. (Ed.), *Food flavors: generation, analysis and process influence*. Elsevier Science Ltd, New York: pp. 685-704.
- Scannell, A.G.M., Hill, C., Ross, R.P., Marx, S., Hartmeier, W. y Arendt, E.K. 2000. Development of bioactive food packaging materials using immobilized bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin. *Int. J. Food Microbiol.* 60, 241-249.
- Schlyter, J.H., Degnan, A.J., Loeffelholz, J.M., Glass, K.A. y Luchansky, J.B. 1993. Evaluation of sodium diacetate and ALTA 2341 on viability of *Listeria monocytogenes* in turkey slurries. *J. Food Prot.* 56, 808-810.
- Schwartz, B., Hexter, D., Broome, C.V., Hightower, A.W., Hirschhorn, R.B., Porter, J.D., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Lorber, B. y Faris, D.G. 1989. Investigation of an outbreak of listeriosis:

- new hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. *J. Infect. Dis.* 159, 680-685.
- Shelef, L.A. y Potluri, V. 1995. Behaviour of foodborne pathogens in cooked liver sausage containing lactates. *Food Microbiol.* 12, 221-227.
- Shigehisa, T., Ohmori, A., Saito, S., Taji, S. y Hayashi, R. 1991. Effects of high pressure on characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 12, 207-216.
- Siragusa, G. y Dickson, J.S. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on beef tissue by application of organic acids immobilized in a calcium alginate gel. *J. Food Sci.* 57, 293-296.
- Smelt, J.P.P.M. 1998. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends Food Sci. Technol.* 9, 152-158.
- Smith, J.L., Huhtanen, C.N., Kissinger, J.C. y Palumbo, S.A. 1975. Survival of salmonellae during pepperoni manufacture. *Appl. Microbiol.* 30, 759-763.
- Styles, M.F., Hoover, D.G. y Farkas, D.F. 1991. Response of *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* to High Hydrostatic Pressure. *J. Food Sci.* 56, 1404-1407.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K. y Bigger, S.W. 2003. Active packaging technologies with emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *J. Food Sci.* 68, 408-420.
- Talon, R., Leroy-Sétrin, S. y Fadda, S. 2002. Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. En Toldrá, F. (Ed.), *Research advances in the quality of meat and meat products*. Research Signpost, Burjassot, Spain: pp. 175-191.
- Téllez, S.J., Ramírez, J.A., Pérez, C., Vázquez, M. y Simal, J. 2001. Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 3, 66-80.
- Tewari, G., Jayas, D.S. y Holley, R.A. 1999. High pressure processing of foods: an overview. *Sci. Aliments* 19, 619-661.
- Van Netten, P., Valentijn, A., Mossel, D.D.A. y Huis in't Veld, J.H.J. 1997. Fate of low temperature and acid-adapted *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* that contaminate lactic acid decontaminated meat during chill storage. *J. Appl. Bacteriol.* 82, 769-779.
- Verluyten, J., Leroy, F. y De Vuyst, L. 2004. Effects of different spices used in production of fermented sausages on growth of and curvacin a production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4807-4813.
- Vermeiren, L, Devlieghere, F, Van Beest, M, de Kruijf, N y Debevere, J. 1999. Developments in the active packaging of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 77-86.

- Walker, S.J., Archer, P. y Banks, J.G. 1990. Growth of *L. monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 157-162.
- Weaver, R.A. y Shelef, L.A. 1993. Anti-listerial activity of sodium, potassium or calcium lactate in pork liver sausage. *J. Food Saf.* 13, 133-146.
- Wouters, P.C., Glaasker, E. y Smelt, J. 1998. Effects of high pressure on inactivation kinetics and events related to proton efflux in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 509-514.
- Yousef, A.E., Luchansky, J.B., Degnan, A.J. y P., D.M. 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes* in wiener exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or pediocin AcH during storage at 4 or 25°C. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1461-1467.

2 Objetivo del estudio

ÍNDICE

2.1	Justificación	43
2.2	Objetivos específicos	43
2.3	Diseño experimental	44
2.4	Bibliografía	45

2.1 JUSTIFICACIÓN

El presente estudio se integra en la línea de investigación de la unidad de microbiología alimentaria del IRTA. Durante la última década, el objetivo principal de este grupo investigador se ha centrado en el desarrollo de estrategias para mejorar la calidad higiénico-sanitaria de productos cárnicos fermentados, frescos y cocidos. El grupo ha trabajado en la bioconservación natural de productos fermentados mediante la adición de bacteriocinas o de cultivos iniciadores que las produzcan, tales como *L. sakei* CTC494 (productor de sakacina K) y *E. faecium* CTC492 (productor de enterocina A y B) (Hugas y col., 1995; Aymerich y col., 2000). Se ha estudiado la adición de bacteriocinas a productos cárnicos cocidos mediante su aplicación por pulverización sobre la superficie del producto loncheado (Hugas y col., 1998; Aymerich y col., 2000). En productos cocidos se ha constatado el efecto inhibitorio de la alta presión hidrostática (400 MPa, 10 min, 17°C) sobre patógenos y microorganismos alterantes, y se ha evaluado su aplicación combinada con antimicrobianos (Garriga y col., 2002; Aymerich y col., 2005).

En el presente trabajo, en base a los antecedentes descritos y siguiendo las líneas de investigación de la unidad, se plantearon diversas estrategias consistentes en la combinación de barreras al crecimiento microbiano con el objetivo de mejorar la seguridad de embutidos crudos-curados poco ácidos y jamón cocido loncheado, minimizando el impacto sobre la calidad global del producto final y el medio ambiente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluación del efecto del tratamiento por alta presión hidrostática (APH), aplicado antes del proceso de maduración de embutidos crudos-curados poco ácidos, en la supervivencia de patógenos alimentarios.
2. Estudio del efecto del tratamiento por APH, aplicado después del proceso de maduración de embutidos crudos-curados poco ácidos, y de la adición de cultivos iniciadores para inactivar patógenos alimentarios, microorganismos alterantes y evitar la acumulación de aminas biógenas.
3. Valoración del impacto de la APH, aplicada después de la maduración de embutidos crudos-curados poco ácidos, y de la adición de cultivos iniciadores seleccionados en las propiedades químicas, físicas y sensoriales del producto objetivo de estudio.
4. Evaluación del efecto de la APH, antimicrobianos naturales y temperatura de refrigeración sobre *Listeria monocytogenes* durante la conservación de jamón cocido loncheado. Valoración de la eficacia de los tratamientos frente a la rotura de la cadena de frío.

5. Estudio del efecto del envasado de jamón cocido loncheado en láminas biodegradables con inclusión de enterocinas, para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* durante la conservación del producto.
6. Evaluación del efecto de la APH, envasado antimicrobiano con enterocinas y temperatura de refrigeración sobre *L. monocytogenes*, durante la conservación de jamón cocido loncheado. Comprobación de la eficacia de los tratamientos frente a la rotura de la cadena de frío.

2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Según los objetivos descritos se realizaron los experimentos resumidos a continuación:

Producto	Apartado	Tecnologías aplicadas	Inoculación patógenos	Parámetros estudiados
Embutidos poco ácidos: fuet y chorizo	3.1.1	- APH (pre-maduración)	<i>Salmonella</i> spp. <i>L. monocytogenes</i>	- Microbiología (evolución patógenos, BAL) - Calidad: color
	3.1.2	- Cultivos iniciadores - APH (post-maduración)	<i>Salmonella</i> spp. <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i>	- Microbiología (evolución patógenos, BAL, <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterococcus</i>) - Implantación de cultivos - Aminoácidos biógenos
	3.1.3	- Cultivos iniciadores - APH (post-maduración)	No	- Microbiología (evolución <i>Enterobacteriaceae</i> , BAL, <i>Enterococcus</i>) - Calidad: color, textura, oxidación, análisis sensorial
Jamón cocido loncheado ¹	3.2.1	- Antimicrobianos naturales como aditivos (enterocinas y lactato-diacetato) - APH - Refrigeración (1°C, 6°C)	<i>L. monocytogenes</i>	- Microbiología (evolución <i>Enterobacteriaceae</i> , BAL, <i>Listeria</i>)
	3.2.2	- Envasado antimicrobiano (enterocinas) - Refrigeración (6°C)	<i>L. monocytogenes</i>	- Microbiología (evolución <i>Enterobacteriaceae</i> , BAL, <i>Listeria</i>)
	3.2.3	- Envasado antimicrobiano (enterocinas) - APH - Refrigeración (1°C y 6°C)	<i>L. monocytogenes</i>	- Microbiología (evolución <i>Enterobacteriaceae</i> , BAL, <i>Listeria</i>)

2.4 BIBLIOGRAFÍA

- Aymerich, M.T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J., Monfort, J.M. y Hugas, M. 2000. Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J. Food Prot.* 63, 721-726.
- Aymerich, M.T., Jofré, A., Garriga, M. y Hugas, M. 2005. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. *J. Food Prot.* 68, 173-177.
- Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M. y Hugas, M. 2002. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiol.* 19, 509-518.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. y Monfort, J.M. 1995. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 322-330.
- Hugas, M., Pagés, F., Garriga, M. y Monfort, J.M. 1998. Application of the bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* CTC494 to prevent growth of *Listeria* in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres. *Food Microbiol.* 15, 639-650.

3 Resultados

ÍNDICE

3.1	Embutidos crudos-curados poco ácidos	49
3.1.1	Evaluación de la alta presión hidrostática como barrera adicional para controlar <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enterica</i> en embutidos crudos-curados poco ácidos	49
3.1.2	Uso de cultivos iniciadores y alta presión hidrostática para mejorar la higiene y seguridad de los embutidos crudos-curados poco ácidos	57
3.1.3	Valoración del efecto de la alta presión hidrostática y los cultivos iniciadores en la calidad de los embutidos crudos-curados poco ácido	67
3.2	Jamón cocido loncheado	77
3.2.1	Efecto combinado de antimicrobianos naturales y alta presión hidrostática para prevenir el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> después de una rotura de la cadena de frío durante la conservación del jamón cocido	77
3.2.2	Envasado antimicrobiano biodegradable para controlar <i>Listeria monocytogenes</i> durante la conservación del jamón cocido	85
3.2.3	Alta presión hidrostática y envasado antimicrobiano biodegradable para controlar <i>Listeria monocytogenes</i> durante la conservación del jamón cocido	103

3.1 EMBUTIDOS CRUDOS-CURADOS POCO ÁCIDOS

3.1.1 EVALUACIÓN DE LA ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA COMO UNA BARRERA ADICIONAL PARA CONTROLAR *LISTERIA MONOCYTOGENES* Y *SALMONELLA ENTERICA* EN EMBUTIDOS CRUDOS-CURADOS POCO ÁCIDOS

Evaluation of high pressure processing as an additional hurdle to control *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in low acid fermented sausages.

Journal of Food Science 70(7): M339-M344. (2005).

Begonya Marcos, Teresa Aymerich, Margarita Garriga. "Evaluation of high pressure processing as an additional hurdle to control *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in low-acid fermented sausages". *Journal of food science*. Vol. 70, issue 7 (2005) : p. 339–344

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb11477.x>

Authors are with Inst. for Food Research and Technology (IRTA), Meat Technology Center, Granja Camps i Armet, 17121 Monells, Spain. Direct inquiries to author Garriga (E-mail: margarita.garriga@irta.es).

Abstract

Low-acid fermented sausages (fuet and chorizo) were manufactured to evaluate the combined effect of high pressure processing (HPP) and ripening on foodborne pathogens. Raw sausages inoculated with a three-strain cocktail of *Salmonella* ser. Derby, London, and Schwarzengrund, and a three-strain cocktail of *L. monocytogenes* ser. 1/2 c and 4b were pressurized at 300 MPa for 10 min at 17 °C. Afterwards, sausages were ripened at 12 °C and 80% RH for 27 d.

Salmonella counts decreased in all studied sausages during ripening. However, the application of HPP as an additional hurdle to the ripening process produced a greater decrease in the *Salmonella* population, showing lower counts (3 MPN/g) in ripened sausages. By contrast, lower values of *L. monocytogenes* counts were obtained in non-treated (NT) than in pressurized sausages due to the delay of pH drop caused by HPP inactivation of endogenous lactic acid bacteria. After pressurization of raw sausages at 300 MPa, a discoloration of sausages was observed, coinciding with an increase in L^* values.

3.1.2 USO DE CULTIVOS INICIADORES Y ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA PARA MEJORAR LA HIGIENE Y SEGURIDAD DE LOS EMBUTIDOS CRUDOS-CURADOS POCO ÁCIDOS

Starter cultures and high pressure processing to improve the hygiene and safety of slightly fermented sausages.

Journal of Food Protection 68 (11): 2341-2348. (2005).

Margarita Garriga¹, Begonya Marcos¹, Belén Martín¹, M. Teresa Veciana-Nogués², Sara Bover-Cid², Marta Hugas¹, Teresa Aymerich¹. “Starter cultures and high-pressure processing to improve the hygiene and safety of slightly fermented sausages”. *Journal of food science*. Vol. 68, Number 11 (November 2005) : p. 2341-2348

<http://www.ingentaconnect.com/content/iafp/jfp/2005/00000068/00000011/art00012>

1: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, Meat Technology Centre, Granja Camps i Armet, 17121 Monells, Spain 2: Departament de Nutrició i Bromatologia-Centre de Referència en Tecnologia d'Aliments, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avinguda Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

Abstract

The effectiveness of selected starter cultures and high hydrostatic pressure after ripening was evaluated to improve the safety and quality of slightly fermented sausages. Inhibition of common foodborne pathogens, spoilage bacteria, and biogenic amine content was studied. Random amplification of polymorphic DNA and plasmid profiles were used to monitor the competitiveness of the starter cultures during fermentation and ripening. *Lactobacillus sakei* CTC6626 and *Staphylococcus xylosum* CTC6013 dominated *L. sakei* CTC6469 and *S. xylosum* CTC6169 independently of the product assayed. Starter cultures were able to control the growth of *Listeria monocytogenes*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, and the biogenic amine content. A pH decrease below 5.3 at the seventh day of fermentation was crucial. *Salmonella* spp. counts decreased significantly during ripening independently of the use of starter culture and product. High hydrostatic pressure treatment was necessary to ensure absence of *Salmonella* spp. in final products.

3.1.3 VALORACIÓN DEL EFECTO DE LA ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA Y LOS CULTIVOS INICIADORES EN LA CALIDAD DE LOS EMBUTIDOS CRUDOS-CURADOS POCO ÁCIDOS

Assessment of high hydrostatic pressure and starter culture on the quality properties of low-acid fermented sausages.

Meat science 76 (1): 46-53. (2007).

Begonya Marcos¹, Teresa Aymerich¹, M. Dolors Guardia¹ and Margarita Garriga¹.

“Assessment of high hydrostatic pressure and starter culture on the quality properties of low-acid fermented sausages”. *Meat science*. Vol. 76, issue 1 (May 2007) : p. 46-53

<http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.09.020>

1: Institute for Food and Agricultural Research and Technology (IRTA), Meat Technology Centre, Granja Camps i Armet s/n, 17121 Monells, Spain

Received 5 July 2006; revised 19 September 2006; accepted 29 September 2006. Available online 5 December 2006.

Abstract

The addition of starter culture and high pressure processing after ripening improved the microbial quality of low-acid fermented sausages (fuet and chorizo). The use of *Lactobacillus sakei* CTC6626 and *Staphylococcus xylosus* CTC6013 as starter culture significantly reduced *Enterobacteriaceae* and *Enterococcus* levels in the finished sausages. Moreover, the addition of starter culture produced sausages of similar quality to traditional low-acid fermented sausages. Slightly lower pH values and higher cohesiveness were obtained for both fuet and chorizo with starter culture. Sensory analysis showed no differences between lots of chorizo whereas starter fuet was more acid and gummy. High pressure induced an additional reduction of *Enterobacteriaceae* in non-starter sausages. An increase of textural properties was observed after pressurization. No other differences were observed between non-treated and pressurized sausages.

Keywords: Low-acid fermented sausages; Traditional sausages; Starter culture; High pressure processing

3.2 JAMÓN COCIDO LONCHEADO

3.2.1 EFECTO COMBINADO DE ANTIMICROBIANOS NATURALES Y ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA PARA PREVENIR EL CRECIMIENTO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DESPUÉS DE UNA ROTURA DE LA CADENA DE FRÍO DURANTE LA CONSERVACIÓN DEL JAMÓN COCIDO

Combined effect of natural antimicrobials and high pressure processing to prevent *Listeria monocytogenes* growth after a cold chain break during storage of cooked ham.

Food Control. doi:10.1016/j.foodcont.2007.02.005. (2007).

Begonya Marcos¹, Anna Jofré¹, Teresa Aymerich¹, Josep M. Monfort¹ and Margarita Garriga¹. “Combined effect of natural antimicrobials and high pressure processing to prevent *Listeria monocytogenes* growth after a cold chain break during storage of cooked ham”. *Food control*. Vol. 19, issue 1 (January 2008) : p. 76-81

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.02.005>

1: IRTA, Finca Camps i Armet, E- 17121 Monells (Girona), Spain

Received 28 November 2006; revised 1 February 2007; accepted 13 February 2007.
Available online 23 February 2007.

Abstract

The effect of high pressure processing (400 MPa for 10 min) and natural antimicrobials (enterocins and lactate–diacetate) on the behaviour of *Listeria monocytogenes* in sliced cooked ham during refrigerated storage (1 °C and 6 °C) was assessed. The efficiency of the treatments after a cold chain break was evaluated. Lactate–diacetate exerted a bacteriostatic effect against *L. monocytogenes* during the whole storage period (three months) at 1 °C and 6 °C, even after temperature abuse. The combination of low storage temperature (1 °C), high pressure processing (HPP) and addition of lactate–diacetate reduced the levels of *L. monocytogenes* during storage by 2.7 log CFU/g. The most effective treatment was the combination of HPP, enterocins and refrigeration at 1 °C, which reduced the population of the pathogen to final counts of 4 MPN/g after three months of storage, even after the cold chain break.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; Enterocins; Lactate; Diacetate; High pressure processing; Temperature

3.2.2 ENVASADO ANTIMICROBIANO BIODEGRADABLE PARA CONTROLAR *LISTERIA MONOCYTOGENES* DURANTE LA CONSERVACIÓN DEL JAMÓN COCIDO

Use of antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham.

International Journal of Food Microbiology (en revisión*).

**Use of antimicrobial biodegradable packaging to control
Listeria monocytogenes during storage of cooked ham**

Begonya Marcos, Teresa Aymerich*, Josep M. Monfort, Margarita Garriga

IRTA- Food Technology

Finca Camps i Armet. E-17121 Monells. Spain

***Corresponding author present address:**

IRTA- Food Technology. Finca Camps i Armet. E-17121 Monells. Spain.

Tel.: +34 972 630 052. Fax: +34 972 630 373

E-mail address: teresa.aymerich@irta.es

Abstract

The antimicrobial effect against *L. monocytogenes* of biodegradable films (alginate, zein and polyvinyl alcohol) containing enterocins was investigated. Survival of the pathogen was studied by means of challenge tests performed at 6°C during 8 and 29 days, for air-packed and vacuum-packed sliced cooked ham, respectively. Air packaging was tested with two concentrations of enterocins (200 and 2000 AU/cm²). Control air-packed cooked ham showed an increase of *L. monocytogenes* from 10⁴ to 10⁷ CFU/g after 8 days. By contrast, packaging with antimicrobial films effectively slowed down the pathogen's growth, leading to final counts lower than in control lots. Air-packaging with alginate films containing 2000 AU/cm² of enterocins effectively controlled *L. monocytogenes* for 8 days. An increase of only 1 log unit was observed in zein and polyvinyl alcohol lots at the same enterocin concentration. Vacuum packaging with films containing enterocins (2000 AU/cm²) also delayed the growth of the pathogen. No increase from inoculated levels was observed during 15 days in antimicrobial alginate films. After 29 days of storage, the lowest counts were obtained in samples packed with zein and alginate films containing enterocins, as well as with zein control films. The most effective treatment for controlling *L. monocytogenes* during 6°C storage was vacuum-packaging of sliced cooked ham with alginate films containing 2000 AU/cm² of enterocins. From the results obtained it can be concluded that antimicrobial packaging can improve the safety of sliced cooked ham by delaying and reducing the growth of *L. monocytogenes*.

Keywords: biodegradable films, enterocins, air/ vacuum packaging, *L. monocytogenes*

3.2.3 ALTA PRESIÓN HIDROSTÁTICA Y ENVASADO ANTIMICROBIANO BIODEGRADABLE PARA CONTROLAR *LISTERIA MONOCYTOGENES* DURANTE LA CONSERVACIÓN DEL JAMÓN COCIDO

High pressure processing and antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham.

Food Microbiology (aceptado).

High pressure processing and antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham

Begonya Marcos, Teresa Aymerich*, Josep M. Monfort, Margarita Garriga

IRTA. Finca Camps i Armet. E- 17121 Monells (Girona). Spain.

***Corresponding author present address:**

IRTA. Finca Camps i Armet. 17121 Monells (Girona). Spain.

Tel.: +34 972 630 052. Fax: +34 972 630 373

E-mail adress: teresa.aymerich@irta.es

Abstract

The efficiency of combining high pressure processing (HPP) and active packaging technologies to control *L. monocytogenes* growth during the shelf life of artificially inoculated cooked ham was assessed. Three lots of cooked ham were prepared: control, packaging with alginate films, and packaging with antimicrobial alginate films containing enterocins. After packaging, half of the samples were pressurized. Sliced cooked ham stored at 6°C experienced a quick growth of *L. monocytogenes*. Both antimicrobial packaging and pressurization delayed the growth of the pathogen. However, at 6°C the combination of antimicrobial packaging and HPP was necessary to achieve a reduction of inoculated levels without recovery during 60 days of storage. Further storage at 6°C of pressurized antimicrobial packed cooked ham resulted in *L. monocytogenes* levels below the detection limit (day 90). On the other hand, storage at 1°C controlled the growth of the pathogen until day 39 in non-pressurized ham, while antimicrobial packaging and storage at 1°C exerted a bacteriostatic effect for 60 days. All HPP lots stored at 1°C led to counts <100 CFU/g at day 60. Similar results were observed when combining both technologies. After a cold chain break no growth of *L. monocytogenes* was observed in pressurized ham packed with antimicrobial films, showing the efficiency of combining both technologies.

Keywords: biodegradable films, enterocins, high pressure processing, *L. monocytogenes*

4 Discusión general

ÍNDICE

4.1	Embutidos crudos-curados poco ácidos	121
4.2	Jamón cocido loncheado	130
4.3	Bibliografía	136

El conocimiento de la capacidad de un proceso de fabricación para reducir los riesgos microbiológicos, resulta fundamental para producir alimentos de calidad higiénica garantizada y bajo riesgo de patógenos. Con este objetivo, para cada tipo de producto fabricado, se ha destinado la primera parte de la discusión a describir la evolución microbiana durante el proceso de fabricación o conservación, según el caso, del producto control. Posteriormente, se ha evaluado la incorporación de tecnologías complementarias al proceso de fabricación estándar para mejorar la calidad del producto acabado.

4.1 EMBUTIDOS CRUDOS-CURADOS POCO ÁCIDOS

Durante la maduración, los embutidos se vuelven alimentos más estables y seguros como consecuencia de la sucesión de barreras al crecimiento microbiano (Leistner, 1995). Tal y como se apuntaba en el apartado 1.2, los embutidos fermentados se consideran generalmente productos de bajo riesgo, a causa de la reducción de los valores de a_w y pH (4,8 a 5,0), capaz de inhibir los microorganismos patógenos a temperatura ambiente (Barbuti y Parolari, 2002). Sin embargo, en los embutidos madurados en frío, caracterizados por presentar valores finales de pH $\geq 5,3$ (Aymerich y col., 2003), se ha minimizado una de las barreras al crecimiento de microorganismos. Por consiguiente, será decisivo monitorizar el proceso de fabricación de este tipo de embutidos madurados en frío y la seguridad final resultante del mismo.

Como objeto de estudio (apdo. 3.1) se fabricaron dos clases de embutido de pequeño calibre, fuet y chorizo, representativos de este tipo de productos ligeramente fermentados. Los fuets y chorizos se fabricaron con una composición básica común, exceptuando las especias, diferentes según el tipo de producto (pimienta negra en fuet; ajo, pimentón dulce y pimentón picante en chorizo), y los nitratos y nitritos, añadidos únicamente a la formulación de los fuets. La maduración de los embutidos se realizó en condiciones típicas para obtener un producto poco ácido: 12°C y 80% de humedad relativa durante un periodo de 21 a 28 días.

Durante el proceso de maduración se monitorizó la evolución de los valores de pH y a_w por su influencia decisiva tanto en la composición microbiana como en la estabilidad de los embutidos (Lizaso y col., 1999). La **actividad de agua** de los embutidos se reduce durante el proceso de elaboración a causa de los solutos añadidos y, principalmente, de la deshidratación que se produce de forma paulatina (Ordóñez y de la Hoz, 2001). El proceso de maduración provocó, en todos los ensayos, un descenso gradual de la actividad de agua, desde valores de 0,98 en el producto fresco, hasta valores en un rango de 0,86-0,88 en el producto acabado (apdos. 3.1.1-3.1.3). De manera diferente, se observó una gran variabilidad en la evolución de los valores de **pH** obtenidos por fermentación espontánea, según el ensayo. Los valores mínimos de pH obtenidos a causa de la formación de ácido láctico por parte de las BAL endógenas se

situaron en un amplio rango, 5,3-5,8 en los fuets y 5,2-5,7 en los chorizos (apdo. 3.1.1 y lotes control apdos. 3.1.2 y 3.1.3).

Por otro lado, el control de los microorganismos que participan del proceso de fabricación de los embutidos (microbiota tecnológica, alterante y patógena) resulta fundamental para la obtención de productos que cumplan los criterios de calidad organoléptica, higiénica y de seguridad. Al tratarse de productos crudos, sin tratamiento térmico, en los embutidos se encuentra una gran variedad de **microbiota endógena**, proveniente de la carne y materias primas utilizadas (véase apdo. 1.2.1), cuya evolución puede afectar la seguridad e higiene de este tipo de productos. En los apdos. 3.1.1-3.1.3 se muestra la evolución de los microorganismos tecnológicos (LAB, CGC+) y alterantes (*Enterobacteriaceae* y *Enterococcus*) endógenos.

El crecimiento rápido de las **bacterias ácido lácticas** al inicio de la maduración es importante para provocar una rápida acidificación del embutido y asegurar su calidad higiénica (Nychas y Arkoudelos, 1990; Raccach, 1992; Lücke, 1998). La diferente evolución de los valores de pH según el ensayo, responde a diferencias en el crecimiento de las BAL endógenas. En los apdos. 3.1.1 y 3.1.2 se observó un rápido crecimiento de las BAL hasta la fase estacionaria que se tradujo en un descenso del pH del producto hasta valores de 5,2-5,5. Por el contrario, en el apdo. 3.1.3 las BAL, a pesar los elevados recuentos iniciales, experimentaron un crecimiento lento y se mostraron incapaces de reducir los valores de pH. Estos resultados evidencian la variabilidad derivada de la fermentación espontánea y, consecuentemente, la falta de control del proceso de fermentación en los embutidos tradicionales.

Los bajos recuentos de *Enterobacteriaceae* y *Enterococcus* (10^2 - 10^3) detectados en la mezcla cárnica inicial (apdos. 3.1.2 y 3.1.3), inferiores a los descritos por otros autores (Papa y col., 1990; Sanz y col., 1998; Castaño y col., 2002), sugieren una adecuada calidad higiénica de las materias primas utilizadas. Elevados recuentos de ***Enterobacteriaceae*** se han relacionado con la producción de aminas biógenas (Bover-Cid y col., 2001a) y olores sulfurosos que pueden reducir la aceptabilidad sensorial de los embutidos (Garriga y col., 1996). Por consiguiente, el control de la población de *Enterobacteriaceae* durante el proceso de maduración es importante desde el punto de vista sanitario y sensorial. Diversos autores han descrito una reducción y desaparición de *Enterobacteriaceae* a medida que evoluciona el proceso de maduración debido a las condiciones de salinidad, anaerobiosis y acidez que se desarrollan (Lücke, 1998; Lizaso y col., 1999). En el presente estudio se observó un crecimiento de *Enterobacteriaceae* durante los primeros días del proceso en los embutidos control, coincidiendo con valores de a_w elevados. Posteriormente, las condiciones desarrolladas durante la maduración, permitieron controlar o reducir los recuentos. Por otro lado, al final del proceso se observaron mayores recuentos de *Enterobacteriaceae* en los chorizos que en los fuets (apdos. 3.1.2. y 3.1.3). Las diferencias entre ambos productos podrían relacionarse con su diferente composición. La inclusión de nitratos y nitritos, efectivos inhibidores de *Enterobacteriaceae* (Castaño y col., 2002; González y Díez, 2002), a la formulación de los fuets podrían relacionarse con este efecto inhibitorio.

Por lo que respecta al género *Enterococcus*, no existe un claro consenso sobre la aceptación de su presencia en los alimentos. Por un lado, su presencia resulta interesante como cultivos iniciadores, por su potencial para mejorar la apariencia de los alimentos y por su capacidad para producir bacteriocinas (Trovatelli y Schiesser, 1987; Arihara y col., 1994; Coppola y col., 1998; Aymerich y col., 2000). Sin embargo, algunos autores los consideran microorganismos indeseables, indicadores de contaminación fecal, responsables del deterioro de productos cárnicos y de la producción de aminas biógenas (Roig-Sagués y col., 1997; Franz y col., 1999; Giraffa, 2002). Además, durante las últimas décadas, han tomado importancia como patógeno nosocomial, aunque no se han relacionado con infecciones de origen alimentario (Carton y col., 1993). En los embutidos control, las condiciones que se sucedieron durante la fermentación no evitaron el crecimiento de los enterococos que experimentaron, principalmente durante los primeros días de maduración, un importante crecimiento (apdos. 3.1.2. y 3.1.3). Los enterococos son microorganismos muy resistentes a condiciones adversas, hecho que permite su supervivencia y multiplicación durante la fermentación de los embutidos (Omar y col., 2004; Deleg y col., 2005). Su resistencia al cloruro sódico y a valores bajos de a_w explicarían por qué, a diferencia de las enterobacterias, no se observó reducción del número de enterococos en ningún embutido control al avanzar la maduración.

La acumulación de **aminas biógenas** en los embutidos supone un riesgo para el consumidor (véase apdo. 1.2.1.3), de aquí la importancia de controlar su producción durante la maduración. La presencia de AB en los embutidos se estudió en el apartado 3.1.2. En los chorizos control se observó acumulación de tiramina, putrescina y cadaverina durante el proceso, mientras que en los fuets control se detectó un bajo contenido de tiramina, y no se detectó putrescina ni cadaverina. La presencia de putrescina y cadaverina en productos fermentados se ha relacionado con elevados recuentos de *Enterobacteriaceae* (Bover-Cid y col., 2001b; Bover-Cid y col., 2003), mientras que las BAL constituyen el principal grupo microbiano productor de tiramina, siendo los enterococos particularmente activos (Bover-Cid y col., 2000). La acumulación de putrescina y cadaverina en los chorizos control coincidió con mayores recuentos de *Enterobacteriaceae* en este producto. Asimismo, cabe considerar diferencias en la composición de la población de enterobacterias entre productos. Los ingredientes utilizados para cada formulación aportarían especies y cepas distintas, probablemente con diferente capacidad aminoácido descarboxilasa a cada producto, y afectarían a su capacidad de crecimiento y supervivencia. Esta idea sería extrapolable a la acumulación diferencial de tiramina observada entre productos, que dependería de las BAL dominantes en cada uno.

Con el objetivo de estudiar la prevalencia de **patógenos** en los embutidos fermentados de baja acidez se inoculó artificialmente la masa cárnica con una mezcla de cepas de *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* y *S. aureus* de origen cárnico, y se determinó su capacidad para sobrevivir y/o crecer en fuet y chorizo (apdos. 3.1.1 y 3.1.2). El proceso de maduración resultó efectivo no sólo para prevenir el crecimiento sino también para reducir la población de *Salmonella* spp. en ambos productos. Otros autores han descrito la inhibición de *Salmonella* spp. en embutidos de mayor acidez, con valores finales de $pH \leq 5$ (Ihnot y col., 1998; Nightingale y col., 2006). Las

condiciones mínimas de crecimiento para *Salmonella* se sitúan alrededor de valores de pH 3,8 y a_w 0,94 (ICMSF, 1996). Los embutidos tradicionales no experimentaron, en ningún caso, un descenso de los valores de pH por debajo de 5. Este hecho junto con la sensibilidad de este patógeno a la desecación señalan a la reducción de valores de a_w como el principal factor limitante del crecimiento de *Salmonella* spp. en este tipo de embutidos poco ácidos. Después de la maduración los embutidos se almacenaron durante 28 días a temperatura ambiente (apdo. 3.1.2). Es importante destacar que este tipo de productos, por sus características finales, no permitieron el crecimiento del patógeno a temperatura ambiente.

El comportamiento de *L. monocytogenes* en los embutidos control presentó una mayor variabilidad según el ensayo, que podría relacionarse con la diferente acidificación de los embutidos durante los primeros días de la maduración (apdos. 3.1.1 y 3.1.2). Es importante destacar el efecto determinante del pH sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* cuando los valores de a_w son todavía altos. En el umbral de crecimiento de *L. monocytogenes*, diferencias de pH del orden de 0,1-0,2 (cercanas al límite de reproducibilidad de las medidas de pH) pueden marcar la diferencia entre crecimiento y no crecimiento (Tienungoon y col., 2000). El pH mínimo de crecimiento de *L. monocytogenes* se ha establecido en 4,5, sin embargo se ha descrito un aumento de este valor en presencia de otros factores limitantes del crecimiento (FSIS, 2002). En los embutidos tradicionales, factores tales como la presencia de la sal, nitratos y nitritos y especias añadidas, podrían influir de manera determinante en el valor de pH inhibitorio del crecimiento de *L. monocytogenes* durante la primera semana de maduración, cuando la a_w es de 0,96-0,98. A partir de los resultados obtenidos en los apartados 3.1.1 y 3.1.2, se puede establecer para los chorizos un pH 5,2 como valor limitante del crecimiento de *L. monocytogenes* en las condiciones estudiadas. En los fuets, con nitratos y nitritos añadidos, se observó inhibición del crecimiento a pH 5,3.

Más allá de la primera semana de maduración, no se observó crecimiento del patógeno en ningún caso, indicando que las condiciones alcanzadas resultaron suficientes para controlar su crecimiento. En este punto del proceso se registró un $\text{pH} < 5,5$ y $a_w < 0,95$; ambos valores combinados se consideran como límite de crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos (FSIS, 2002). En el apdo. 3.1.2 se observó, según el producto, un comportamiento diferente de *Listeria*. En el producto acabado, se observó un incremento de los recuentos del patógeno respecto al inóculo inicial en los chorizos, mientras que los fuets mostraron niveles finales iguales a los inoculados. Estos resultados sugieren, una vez más, la participación de los nitratos y nitritos que, en combinación con el descenso de pH, a_w y potencial redox, ejercen un efecto antimicrobiano (Lueck, 1980; Sanz y col., 1998). En el apdo 3.1.1 se observó un descenso importante de la población de *L. monocytogenes* al final del proceso de maduración. Nightingale y col. (2006) destacaron la importancia de la duración del proceso para controlar el crecimiento de *Listeria* durante la fabricación de salami. El mayor tiempo de maduración empleado en el apdo 3.1.1 (27 días) respecto al apdo. 3.1.2 (21 días), junto con los menores valores de pH registrados, se revelan como las causas más probables del descenso final de *L. monocytogenes* en el primer ensayo. Por otro lado, cabe destacar la capacidad de

L. monocytogenes para sobrevivir en condiciones adversas de acidificación y desecación. Por consiguiente, la ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g registrada en los chorizos del apdo. 3.1.1, hizo sospechar de la existencia de un factor antimicrobiano adicional, por ejemplo bacteriocinas. El estudio de la población de enterococos, potenciales productores de bacteriocinas, aislados de ambos embutidos, confirmó la presencia de cepas con actividad antagonista contra *L. monocytogenes* exclusivamente en los chorizos. Por último, no se observó crecimiento del patógeno durante la conservación del producto acabado a temperatura ambiente (apdo. 3.1.2). A pesar de que el proceso de maduración espontánea no permitió reducir los niveles de contaminación, se fabricó un alimento estable desde el punto de vista de *L. monocytogenes*, al no permitir su crecimiento durante la vida útil del producto. La a_w registrada en el producto acabado (0,86-0,88), inferior al valor mínimo de crecimiento de *Listeria*, es determinante para la seguridad de los embutidos fermentados de baja acidez.

En cuanto a *S. aureus*, las condiciones que se sucedieron durante el proceso evitaron su crecimiento incontrolado, experimentando cierta reducción en los fuet y un crecimiento moderado en los chorizos, en ambos casos, menores a 1 logaritmo (apdo. 3.1.2). Existen evidencias de que *S. aureus* puede controlarse efectivamente en ambientes con valores de $\text{pH} \leq 5,3$, por lo que resulta esencial el descenso de los valores de pH durante los primeros días del proceso (Bacus, 1984; Sameshima y col., 1998). A pesar de la acidificación observada en ambos productos, ésta fue limitada, lo que explicaría por qué *S. aureus* fue capaz de crecer en el chorizo, a diferencia del fuet, en que la presencia de nitratos y nitritos habría contribuido de forma eficaz a controlar el patógeno. La producción de enterotoxinas se relaciona con recuentos de *S. aureus* por encima de 10^5 ufc/g (ICMSF, 1996), niveles muy superiores a los observados a final de proceso de maduración (apdo. 3.1.2).

De los resultados expuestos, se extrae el potencial del proceso de maduración de los embutidos para ralentizar el desarrollo de la microbiota alterante y patógena, evitando su crecimiento hasta números elevados. Sin embargo, la variabilidad observada en los embutidos tradicionales, con fermentación espontánea por parte de las BAL endógenas, refleja los riesgos derivados de una fermentación inadecuada provocada por un crecimiento limitado de las BAL y acidificación insuficiente del producto. Este hecho sugiere la conveniencia de añadir **cultivos iniciadores** que permitan controlar el proceso y mejorar la homogeneidad del producto final (Baracco y col., 1982; Garriga y col., 1996).

El empleo de cultivos iniciadores mixtos debidamente seleccionados, compuestos por cocos Gram-positivos catalasa positivos (CGC+) y lactobacilos competitivos, ofrece las ventajas y propiedades de los dos grupos microbianos (Aymerich y col., 2004). Esta práctica permite beneficiarse de la contribución positiva de los estafilococos sobre las cualidades organolépticas del producto acabado, así como de la producción de ácido láctico por parte de las BAL (Hugas y Monfort, 1997). Es importante evaluar las propiedades tecnológicas de cultivos iniciadores, es decir su implantación, competitividad, capacidad acidificante y desarrollo de propiedades organolépticas durante el proceso de fabricación (Hugas, 1993; Garriga y col., 1996). En el presente estudio se seleccionaron, como cultivos iniciadores, cepas de *L. sakei* y *S. xylosus*

aisladas de producto cárnicos, sin actividad aminoácido-descarboxilasa *in vitro* y por lo tanto incapaces de producir aminas biógenas. La monitorización de las cepas inoculadas evidenció una mayor implantación de *L. sakei* CTC6626 y *S. xyloso* CTC6013, independientemente del producto analizado, y por lo tanto de los ingredientes utilizados para su fabricación (apdo. 3.1.2).

La inoculación con cultivos iniciadores evidenció recuentos de BAL superiores a los obtenidos en los embutidos control durante todo el proceso de elaboración (apdos. 3.1.2 y 3.1.3). En consecuencia, se produjo un descenso más rápido y pronunciado de los valores de pH, alcanzándose valores mínimos (5,1-5,4 en los fuets y 4,8-5,2 en los chorizos) a la semana de maduración.

Los cultivos iniciadores resultaron útiles para inhibir el crecimiento de *Enterobacteriaceae* (apdos. 3.1.2 y fuets del apdo. 3.1.3). Sin embargo, los chorizos con cultivo iniciador del apdo. 3.1.3, a pesar del descenso del pH durante los primeros días de maduración, permitieron igual crecimiento de enterobacterias a los embutidos control. La variabilidad de resultados se podría explicar por una diferente sensibilidad de las diversas especies y cepas de enterobacterias presentes según el ensayo. El comportamiento descrito sugiere que, un descenso rápido y pronunciado de los valores de pH, no aseguraría *per se* la inhibición del crecimiento de *Enterobacteriaceae*. De ello se deriva que crecimiento de *Enterobacteriaceae* puede ser un problema al inicio del proceso, cuando los valores de a_w son superiores a su límite de crecimiento $a_w < 0,93$ (ICMSF, 1980). Castaño y col. (2002) describieron elevados recuentos de *Enterobacteriaceae* (6 log cfu/g) en el segundo día del proceso de maduración de chorizos fabricados con similar formulación y con diferencias de pH considerables (5,9 vs 4,7). A medida que avanza el proceso de maduración se reducen los valores de *Enterobacteriaceae*, a causa principalmente del descenso de la a_w . En los fuets fabricados con cultivos iniciadores se inhibió el crecimiento de *Enterobacteriaceae* durante todo el proceso (apdos. 3.1.2 y 3.1.3). La inhibición observada en los fuets con cultivo iniciador contrasta con el crecimiento inicial descrito en los fuets control. Estos resultados sugieren que la cantidad de nitratos y nitritos añadida a los fuets no sería suficiente para inhibir el crecimiento de *Enterobacteriaceae* al inicio del proceso. Por el contrario, la estrategia de combinar nitratos y nitritos con cultivos iniciadores, y por tanto menores valores de pH, fue efectiva para controlar *Enterobacteriaceae*. La dificultad observada en controlar la población de *Enterobacteriaceae* pone de manifiesto la importancia de seleccionar materias primas de calidad higiénica adecuada, que aseguren la calidad del producto final.

La adición de cultivos iniciadores también permitió controlar el crecimiento de *Enterococcus*, dando lugar a recuentos inferiores a los observados en el lote control (apdos. 3.1.2 y 3.1.3). De acuerdo con estos resultados, Bover-Cid y col. (2001c) describieron menores recuentos de enterococos en fuets poco ácidos, inoculados con cultivos iniciadores mixtos, en comparación con los respectivos fuets de fermentación espontánea. Deleg y col. (2005) también observaron que la adición de cultivos iniciadores inhibió el crecimiento de *Enterococcus faecium*, mientras que otros parámetros de la maduración tales como el pH y el secado no influyeron sobre su

crecimiento. Dada la resistencia de *Enterococcus* a valores extremos de pH y salinidad (Giraffa, 2002), estos resultados sugieren que el control de la población en los embutidos con cultivos iniciadores no se debería tanto al descenso de los valores de pH observados, como al efecto de competencia.

La inoculación de cultivos iniciadores no productores de aminas biógenas *in vitro* dio lugar a una reducción importante de la producción de tiramina, putrescina y cadaverina durante la maduración, conduciendo a la acumulación de cantidades finales de AB muy bajas en ambos productos cárnicos. La rápida e intensa acidificación observada en los embutidos con cultivos iniciadores en comparación con los respectivos lotes control, favoreció la competitividad del cultivo inoculado en detrimento de la microbiota endógena potencialmente formadora de aminas biógenas (lactobacilos, enterococos y enterobacterias). Diversos autores han descrito una menor acumulación de aminas biógenas en embutidos inoculados con cultivos iniciadores (Maijala y col., 1995; Bover-Cid y col., 2001c).

La adición de cultivos iniciadores no provocó ninguna reducción adicional de la población de *Salmonella* spp. durante el proceso de fabricación. En cuanto a *L. monocytogenes*, su crecimiento fue inhibido durante la maduración de los embutidos inoculados con cultivos iniciadores (apdo. 3.1.2). El descenso rápido de los valores de pH durante los primeros días de maduración, cuando los valores de a_w todavía eran altos, resultaron decisivos para prevenir su crecimiento, tal y como han descrito otros autores (Rödel y col., 1993). En los embutidos poco ácidos, la baja temperatura de fermentación puede provocar un retraso en el descenso de pH. En estas condiciones, resulta efectivo añadir cultivos iniciadores que aseguren el descenso de pH y la competitividad frente al crecimiento de *L. monocytogenes* (Encinas y col., 1999). El efecto de los cultivos iniciadores también se detectó durante el almacenamiento de los embutidos a temperatura ambiente (apdo. 3.1.2), reduciéndose los recuentos hasta valores finales inferiores al límite de detección, 100 ufc/g (resultados no mostrados). Los cultivos iniciadores evitaron el crecimiento de *S. aureus* durante la maduración de los chorizos. Schillinger y Lücke (1989) describieron la importancia del rápido descenso de los valores de pH por debajo de 5,3 para inhibir el crecimiento de *S. aureus* en productos fermentados a temperaturas en torno a 18°C. En el presente estudio, esta reducción de pH durante la primera semana se aseguró, gracias a la inoculación de los cultivos iniciadores. Metaxopoulos y col. (1981a; 1981b) también observaron una reducción significativa del crecimiento de *S. aureus* durante la fabricación de salamis inoculados con cultivos iniciadores (*Lactobacillus* spp.).

Como resumen, se puede afirmar que los embutidos, fermentados por acción de los cultivos iniciadores, presentaron valores finales de pH típicos de los embutidos fermentados de baja acidez. El descenso de pH, aunque limitado para este tipo de productos de baja acidez, resultó fundamental para mejorar la seguridad e higiene de los embutidos.

Como se apuntaba en el apartado 1.3.1, el uso de la **alta presión hidrostática** como barrera adicional al crecimiento microbiano parece adecuado, al tratarse de una tecnología no térmica, para mejorar la seguridad de los embutidos crudos-curados. Con el objetivo de determinar la idoneidad de incorporar la presurización al proceso de fabricación de embutidos poco ácidos,

así como el diagrama de flujo óptimo del proceso modificado, se evaluaron los efectos de la APH aplicada a los embutidos crudos, previa maduración (apdo. 3.1.1) y a los embutidos curados, después de la maduración (apdo. 3.1.2).

El tratamiento de presión (300 MPa) de los embutidos crudos (apdo. 3.1.1) inhibió el crecimiento de las BAL, retrasando el descenso de los valores de pH de los embutidos. La presurización provocó una reducción inmediata de los niveles de *L. monocytogenes*. Sin embargo, se observó una rápida recuperación de la población durante los primeros días de la maduración, favorecida por el retraso en la acidificación de estos embutidos. La inactivación de las BAL endógenas se presenta como la causa más probable de los menores recuentos finales del patógeno observados en los embutidos no tratados (NT) respecto a los embutidos presurizados (APH). Por una parte, como se ha comentado, la APH inhibió las BAL y, consecuentemente, retrasó la acidificación. Por otra parte, la presión redujo la presencia de enterococos con actividad antagonista contra *Listeria*, que pasó del 95% del total de enterococos estudiados en los embutidos NT, al 27% en los embutidos APH.

Desde el punto de vista del control de *Salmonella* spp., la presurización resultó positiva, conduciendo a recuentos inferiores en los embutidos APH, en comparación con los NT durante todo el proceso. Anteriormente se apuntaba al descenso de los valores de a_w como causa principal de la reducción de *Salmonella* spp. durante la maduración. En los embutidos presurizados, la reducción de *Salmonella* spp. desde los primeros días de maduración indicaría que la presurización, si bien no provocó una reducción inmediata del patógeno, sí dañó las células de forma subletal, sensibilizándolas a valores de a_w limitante, pero que tal y como se ha visto previamente, resultaban insuficientes para inhibir las células sanas.

El tratamiento de presurización de los embutidos crudos a 300 MPa (10 min. a 17°C) constituyó, por tanto, una barrera adicional para controlar la población de *Salmonella*. Sin embargo, la presurización previa a la maduración de los embutidos crudos ejerció un efecto contraproducente en el control de *L. monocytogenes*. Este hecho, junto con la alteración del aspecto visual de los embutidos crudos (apdo. 3.1.1), hizo necesaria la optimización de la aplicación del tratamiento APH para aprovechar su potencial en el control de *Salmonella* spp. Con este objetivo se planteó otro ensayo con aplicación de la APH (400 MPa), después del proceso de maduración, en el producto acabado (apdos. 3.1.2 y 3.1.3).

El efecto del tratamiento APH aplicado después de la maduración, se estudió después de la presurización (apdos. 3.1.2 y 3.1.3) y durante la posterior conservación del producto a temperatura ambiente (apdo. 3.1.2). La presurización provocó una reducción inmediata de niveles de *Enterobacteriaceae* de los embutidos control (datos no mostrados, apdos. 3.1.2 y 3.1.3). El efecto de la presión sobre *Enterococcus* fue variable según el ensayo (apdos. 3.1.2 y 3.1.3). Se ha descrito la resistencia de los enterococos a la presión, aunque se ha observado diferente sensibilidad entre especies y cepas diversas (Winckel y col., 1997; Fonberg-Broczek y col., 2005). La heterogeneidad en la población de enterococos según el tipo de embutido, no sólo desde el punto de vista cuantitativo sino cualitativo (Martín y col., 2005), explicaría la diferente sensibilidad a la APH observada. En cuanto a *Salmonella* spp., se observó como la

presurización permitió obtener ausencia en 25 g, pasados los 28 días de almacenamiento a temperatura ambiente (apdo. 3.1.2). Al final del almacenamiento todos los embutidos, independientemente de la presurización, presentaron niveles de *Enterobacteriaceae* y *S. aureus* por debajo del límite de detección (apdo. 3.1.2). Estos resultados reflejan una mejora de la calidad microbiológica de los embutidos poco ácidos durante su conservación a temperatura ambiente, gracias a las condiciones limitantes alcanzadas en estos productos durante su maduración. La presurización combinada con estas condiciones limitantes del producto curado habría mejorado el control de *Salmonella*, *Enterobacteriaceae* y, por tanto, la disminución del contenido en AB.

Probada la eficacia de la utilización de cultivos iniciadores y del tratamiento de alta presión hidrostática para mejorar la calidad microbiológica de los embutidos poco ácidos se procedió a estudiar la incidencia de ambas tecnologías en la **calidad** final de los embutidos en relación con la calidad observada en los embutidos tradicionales obtenidos por fermentación espontánea (apdo. 3.1.3). En la fabricación de embutidos fermentados de baja acidez, la selección de cepas apropiadas para inocularlas como cultivos iniciadores es esencial para obtener productos con los atributos de calidad característicos de los embutidos tradicionales. Las cepas seleccionadas fueron *L. sakei* CTC6626 y *S. xylosus* CTC6013, por su predominio durante el proceso de maduración y mayor implantación en fuet y chorizo (apdo. 3.1.2). En el apartado 1.2.1 se ha aludido al papel que ejercen los cultivos iniciadores en las propiedades finales de los embutidos. Las BAL inoculadas aseguraron el descenso de los valores de pH, presentando el producto acabado valores de pH esperados para este tipo de embutidos de baja acidez (Sanz y col., 1998; Aymerich y col., 2003). Los CGC+ influyen a su vez en la formación del color y oxidación de los ácidos grasos libres.

La evaluación de las propiedades de oxidación, color, textura y sensorial de los embutidos (véase apdo. 3.1.3) no mostró alteraciones evidentes de la calidad global de los embutidos inoculados con cultivos indicadores, que presentaron características similares a los embutidos tradicionales. Igualmente, el tratamiento por alta presión hidrostática, aplicado después del proceso de maduración, no alteró las propiedades características del producto. La estabilización del producto, como consecuencia de los procesos madurativos, evitó alteraciones del producto a causa de la presurización, al contrario de lo sucedido al aplicar la APH al producto crudo (apdo. 3.1.1). Considerando estos resultados y la mejora de la seguridad observada al aplicar la APH (apdo. 3.1.2), el uso de la APH se podría recomendar como una etapa final en la fabricación de embutidos fermentados de baja acidez conjuntamente con la inoculación de cultivos iniciadores adecuados.

Los resultados expuestos muestran una mejora de la higiene y seguridad de los embutidos poco ácidos al aplicar cultivos iniciadores y APH post-maduración, como barreras adicionales a la fermentación. Ambas tecnologías, aplicadas de forma combinada, ejercieron un efecto complementario. Los cultivos iniciadores permitieron mejorar la higiene (*Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, AB) y seguridad (*L. monocytogenes*, *S. aureus*) de los embutidos, y el tratamiento APH aseguró la ausencia de *Salmonella* spp. en el producto acabado. Sin

embargo, es importante destacar que dada la complejidad de los procesos madurativos, fuertemente influenciados por factores tales como las condiciones de ensayo, las materias primas utilizadas, los cultivos iniciadores seleccionados, o la planta de fabricación, es conveniente validar cada proceso productivo previo a la comercialización del producto. Los procesos de fabricación deben de ser validados en condiciones reales de fabricación para garantizar la eliminación de cualquier peligro biológico presente en el producto (Barbuti y Parolari, 2002).

4.2 JAMÓN COCIDO LONCHEADO

En un mercado con una creciente demanda de productos listos para el consumo, se ha producido una diversificación en la producción de jamón cocido, surgiendo presentaciones del producto destinadas a facilitar su venta y consumo. El jamón cocido es un alimento sometido a un tratamiento de calor suficiente para garantizar su seguridad. Sin embargo, cualquier operación posterior de pelado, loncheado, y reenvasado a la que se someta el producto, incrementa los riesgos de contaminación. Durante estas operaciones, los diversos microorganismos patógenos procedentes del entorno, los manipuladores, el equipo de fabricación y los ingredientes crudos pueden provocar una contaminación cruzada del producto. Cabe destacar la prevalencia de patógenos como *L. monocytogenes* en las superficies de los equipos de fabricación en la industria cárnica (Elischerova y col., 1977; Chasseignaux y col., 2001; Garriga y col., 2004). Si a ello sumamos la capacidad de *L. monocytogenes* para crecer a temperaturas de refrigeración en productos como el jamón cocido, que proporciona unas condiciones adecuadas para su crecimiento (Blom y col., 1997; Geornaras y col., 2005), podemos considerar este patógeno como un riesgo para la seguridad de este tipo de productos. En alimentos listos para el consumo tales como el jamón cocido, que pueden favorecer el crecimiento del patógeno, se establece un límite de 100 ufc/g para *L. monocytogenes* al final de la vida útil del alimento (CE, 2005).

En los apartados 3.2.1 a 3.2.3 se evaluó la seguridad del jamón cocido loncheado inoculado artificialmente con *L. monocytogenes*. Con este fin se fabricó jamón cocido picado con una formulación extra y se sometió a las citadas operaciones de post-procesado. La evolución del patógeno se monitorizó a lo largo de la vida útil del producto refrigerado.

En el jamón acabado de envasar y a lo largo de toda su conservación se observaron recuentos de BAL y *Enterobacteriaceae*, indicadores de la calidad higiénica del producto, por debajo del límite de detección (resultados no mostrados). Estos resultados sugieren la aplicación de un tratamiento térmico adecuado y unas buenas prácticas de fabricación (BPF) durante las operaciones de post-procesado. Es importante minimizar la presencia de las BAL en el producto acabado al ser consideradas, por sus características psicotróficas y capacidad para crecer en ambientes libres de oxígeno, las principales responsables del deterioro de los productos cárnicos cocidos envasados al vacío (Debevere, 1989; Borch y col., 1996).

En cuanto a *L. monocytogenes*, la **refrigeración** del jamón cocido control a **6°C** favoreció su crecimiento exponencial, alcanzando la fase estacionaria de crecimiento a las 3 semanas de conservación (apartados 3.2.1-3.2.3). Con estos datos se demuestra que el jamón cocido, por sus características de falta de microbiota competitiva, bajo contenido de sal (2% aprox.) y valores de pH y a_w en torno a 6,0 y 0,97, respectivamente, constituye un medio idóneo para el crecimiento de *L. monocytogenes* a temperaturas de refrigeración.

Existen evidencias de que el límite de crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos estériles con pH neutro se encuentra alrededor de los 0°C (ICMSF, 1996). Por ello, con el fin de inhibir el crecimiento del patógeno, se aplicó una temperatura de refrigeración menor durante la conservación. En este sentido, la refrigeración a **1°C** ejerció un importante efecto bacteriostático contra *L. monocytogenes*, controlando su crecimiento durante 40 días (apdos. 3.2.1 y 3.2.3). Es importante destacar la efectividad de refrigerar el producto a una temperatura suficientemente baja para prolongar de manera significativa la fase de latencia de *L. monocytogenes*. Sin embargo, este tratamiento fue insuficiente para evitar el crecimiento del patógeno en un producto con una vida útil tan larga como la del jamón cocido envasado al vacío (estimada en 2 meses).

Por otro lado, hay que tener en cuenta que los alimentos almacenados en frigoríficos comerciales y domésticos frecuentemente son expuestos a temperaturas abusivas (Sergelidis y col., 1997; Bakalis y col., 2003). Resulta poco realista pensar que se puedan mantener temperaturas de refrigeración tan bajas durante toda la cadena de distribución del alimento. Con el fin de evaluar con más detalle la incidencia de la temperatura en la evolución de *L. monocytogenes* se realizaron pruebas de **abuso de temperatura**, simulando la rotura de la cadena de frío durante la vida útil del jamón (apdos. 3.2.1 y 3.2.3). En ambos ensayos, en el producto refrigerado a 6°C, el patógeno ya se encontraba en la fase estacionaria de crecimiento en el momento del abuso de temperatura, por lo que sus consecuencias se observaron únicamente a 1°C. Las consecuencias negativas del abuso de temperatura se hicieron evidentes de manera inmediata, favoreciendo el crecimiento exponencial del patógeno, imposible de detener a pesar de volver a refrigerar el producto a 1°C. Estos resultados reiteran una vez más la importancia del control de temperatura durante el almacenamiento para reducir el riesgo derivado de *L. monocytogenes*.

La evidencia del crecimiento de *L. monocytogenes* durante la vida útil del jamón cocido refrigerado sugiere la necesidad de aplicar barreras adicionales a las bajas temperaturas para prevenir su crecimiento. En el contexto de la demanda creciente de alimentos sin conservantes sintéticos, una opción cada vez más aceptada por los consumidores es la adición de **antimicrobianos naturales**. La adición de **lactato potásico** (1,4%) y **diacetato sódico** (0,1%) a la formulación del jamón ejerció un efecto bacteriostático contra *L. monocytogenes* durante su refrigeración a 1°C y 6°C (apdo. 3.2.1). Estos aditivos, disponibles comercialmente, son aditivos utilizados en la fabricación de productos cárnicos por su demostrado efecto bacteriostático (Blom et al., 1997; Mbandi & Shelef, 2002). Los resultados del apdo. 3.2.1 mostraron la potencia bacteriostática del lactato-diacetato, capaz de inhibir el crecimiento de

L. monocytogenes, independientemente de la temperatura de refrigeración, e incluso capaz de contrarrestar los efectos de la rotura de la cadena de frío. Por consiguiente el uso del lactato-diacetato se podría proponer como estrategia para reducir el riesgo de contaminación por *L. monocytogenes* durante la distribución del producto, cuando las condiciones de refrigeración escapan al control del fabricante. Y más teniendo en cuenta que la normativa vigente dispone que, el fabricante del alimento es el responsable del cumplimiento de los criterios microbiológicos hasta el final de la vida útil del alimento comercializado (CE, 2005).

Las **enterocinas** producidas por *E. faecium* CTC492 (véase Introducción General) fueron asimismo evaluadas como agentes antimicrobianos. Las enterocinas, añadidas como ingrediente de fabricación (2.400 UA/g), no provocaron efecto alguno sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* durante la conservación del jamón cocido (apdo 3.2.1). Diversos autores han señalado una posible alteración de la actividad de las bacteriocinas añadidas a formulaciones cárnicas por factores tales como la adsorción por parte de las proteínas e interacciones con la grasa (Hugas y col., 2002; Drider y col., 2006). Una alternativa efectiva para evitar las interacciones de las bacteriocinas con los componentes de la masa cárnica sería la pulverización de las lonchas de jamón con una solución de bacteriocinas (Aymerich y col., 2000). Con todo, esta alternativa supone una operación post-procesado extra, con los riesgos de recontaminación derivados si no se consideran las condiciones higiénicas adecuadas. Por ello, y con el objetivo de minimizar al máximo la manipulación del producto, se optó por incluir las enterocinas en el material de envasado.

El **envasado antimicrobiano** constituye una forma de envasado en alza que permitiría aplicar las bacteriocinas, evitando las posibles interacciones con la mezcla cárnica. Como materiales de soporte se eligieron el **alginato**, la **zeína** y el **polivinil alcohol** por su capacidad para formar láminas y por su biodegradabilidad (véase Introducción General). Un primer ensayo *in vitro* (apdo. 3.2.2) permitió comprobar la actividad antagonista contra *L. monocytogenes* de las enterocinas incluidas en las láminas biodegradables y su estabilidad a las dos concentraciones estudiadas (200 y 2.000 UA/cm²). Así, la inclusión de enterocinas a los biopolímeros permitió ampliar las propiedades funcionales de las láminas utilizadas para el envasado, confiriéndoles un carácter antimicrobiano. Posteriormente se realizó un ensayo *in vivo* en jamón cocido refrigerado a 6°C, para comprobar la efectividad del tratamiento contra *L. monocytogenes* (apdo. 3.2.2).

En primer lugar, se evaluaron los efectos del envasado antimicrobiano durante la refrigeración a 6°C del jamón loncheado envasado en aire (vida útil máxima estimada de una semana). El envasado antimicrobiano con baja concentración de enterocinas (200 UA/cm²), si bien retrasó el crecimiento de *L. monocytogenes*, resultó insuficiente para prevenir su crecimiento. La concentración de 2.000 UA/cm², cantidad máxima de enterocinas que se pudo incluir en las láminas sin modificar su funcionalidad, provocó una mayor inhibición del patógeno. El envasado en láminas de alginato fue el único tratamiento capaz de controlar los niveles de *L. monocytogenes* durante la vida útil del jamón envasado en presencia de aire. Desestimada la menor concentración de enterocinas, se realizó un estudio comparativo del efecto ejercido

por las enterocinas según el polímero utilizado, durante la refrigeración a 6°C del jamón envasado al vacío en presencia de las láminas activas (2.000 UA/cm²). El envasado antimicrobiano, para todos los biopolímeros ensayados, derivó en una extensión de la fase de latencia de *L. monocytogenes*. El efecto inhibitorio de las enterocinas incluidas en las láminas de polivinil alcohol desapareció a lo largo de la conservación, permitiendo un crecimiento final del patógeno similar al observado en el lote control. En el envasado antimicrobiano es importante ajustar la tasa de liberación del antimicrobiano con la tasa de crecimiento del microorganismo diana, para evitar una liberación demasiado rápida y la desaparición del antimicrobiano o, por el contrario, para evitar una liberación demasiado lenta que permita el crecimiento microbiano. Desde un punto de vista práctico, se decidió seleccionar el alginato como material de envasado para ensayos posteriores por haber mostrado mayor poder inhibitorio (apdo. 3.2.2). El uso de la zeína como polímero de soporte se desestimó, a pesar de haber mostrado un efecto antilisteria comparable al observado en las láminas de alginato. Por un lado, por considerarse su actividad inhibitoria debida principalmente a los disolventes utilizados en la preparación de las láminas y no a la inclusión de enterocinas en dicho material. Asimismo, se estimó que su aspecto (color amarillo intenso) e intenso olor, resultaban poco apropiados para su aplicación en productos cárnicos.

Un ensayo posterior confirmó la efectividad del envasado antimicrobiano con láminas de alginato (2.000 UA/cm²) para retrasar el crecimiento de *L. monocytogenes* en el producto refrigerado a 6°C (apdo. 3.2.3). Sin embargo, el envasado antimicrobiano, en las condiciones estudiadas, no resultó suficiente *per se* para inhibir el crecimiento del patógeno. Por ello, en base al efecto bacteriostático observado previamente, se planteó refrigerar el producto a 1°C como barrera adicional al envasado antimicrobiano. La combinación del envasado antimicrobiano y la baja temperatura de refrigeración (1°C) permitió controlar efectivamente los niveles de *L. monocytogenes* durante la vida útil del jamón cocido. Por consiguiente, la suma de los dos factores de estrés, insuficientes por sí mismos para inhibir el patógeno durante 60 días, mejoró la seguridad del jamón cocido a lo largo de su vida útil. Dicha combinación de tecnologías resultó a su vez efectiva para frenar el crecimiento de *L. monocytogenes* frente a un abuso de temperatura (apdo. 3.2.3).

Nuevamente, se ha hecho evidente la importancia de controlar la temperatura de refrigeración como factor clave para garantizar la seguridad de este tipo de producto. No obstante, como ya se había indicado previamente, no resulta fácil mantener bajas temperaturas a lo largo de la vida útil del alimento, de modo que convendría valorar estrategias alternativas a esta propuesta. Otra barrera al crecimiento de patógenos, aplicada con anterioridad a los embutidos crudos-curados, es la aplicación de **alta presión hidrostática**. La presurización (400 MPa, 10 min. a 17°C) del jamón cocido loncheado provocó una reducción inmediata de la población de *L. monocytogenes* en todos los lotes ensayados (apdos. 3.2.1 y 3.2.3). Sin embargo, las células supervivientes crecieron en mayor o menor medida, en función de las condiciones de conservación. A 6°C, *L. monocytogenes* alcanzó recuentos finales en el jamón presurizado similares a los observados en el producto no tratado. La APH no fue capaz, por sí misma, de

inhibir el posterior crecimiento del patógeno, sin embargo, retrasó considerablemente su crecimiento, proporcionando una mayor protección contra *L. monocytogenes* a lo largo de la vida útil del producto. Cabe destacar la importancia de conservar el producto a 1°C después de la presurización para inhibir o minimizar el crecimiento del patógeno (apdos. 3.2.3 y 3.2.1, respectivamente). Por otro lado, entre las muestras presurizadas se detectaron recuentos por debajo del límite de detección que, después de un enriquecimiento, mostraron presencia de *L. monocytogenes*. Estos datos demuestran la presencia de células dañadas, pero viables, entre las muestras presurizadas. El daño subletal es un importante aspecto a considerar para cualquier método de conservación, puesto que las células dañadas, en condiciones favorables tales como una conservación prolongada en un sustrato adecuado, pueden tener capacidad para recuperarse (McClements y col., 2001). Esta potencial recuperación resulta especialmente problemática en el caso de microorganismos psicotrópicos, tales como *Listeria*, que pueden crecer a temperatura de refrigeración. En este sentido, en las muestras APH conservadas a 1°C, con recuentos al final de la vida útil inferiores al límite de detección, el abuso de temperatura favoreció la recuperación de las células dañadas y su posterior crecimiento exponencial (apdo. 3.2.3).

En los ensayos realizados se observó la capacidad bactericida de la APH y las enterocinas. La APH provocó reducciones inmediatas de 3-4 log ufc/g de la población de *L. monocytogenes* (apdos. 3.2.1 y 3.2.3). Las enterocinas, aunque menores, también mostraron reducciones de 1-2 log cfu/g (apdos. 3.2.2 y 3.2.3). Sin embargo, ninguna de las dos tecnologías pudo mantener *per se* los niveles reducidos de contaminación durante la vida útil del producto. De ello se deriva la necesidad de combinar ambas tecnologías para descontaminar un producto con riesgo de elevados niveles de contaminación y mantenerlo seguro a lo largo de su vida útil.

Los resultados obtenidos cuando se aplicaron los antimicrobianos como aditivos de fabricación (apdo. 3.2.1) muestran óptimos resultados en la combinación triple de APH, antimicrobianos y refrigeración a 1°C, consiguiendo una reducción de la contaminación inicial mantenida durante toda la vida útil del jamón, a pesar de la rotura de la cadena de frío. Entre los antimicrobianos estudiados, la enterocina mostró mayor efectividad en las condiciones descritas, atribuible a su potencial actividad bactericida frente a la actividad bacteriostática del lactato-diacetato. Otro factor a considerar es la menor efectividad de la presión observada en presencia del lactato (Aymerich y col., 2005; apdo. 3.2.1). La presencia de L-D en el jamón habría provocado un efecto de protección cruzada, entendiendo como tal la habilidad mostrada por un factor de estrés, en este caso el lactato, para proporcionar protección contra otro factor de estrés, la presión (Bearson y col., 1997). Por otro lado, la combinación de APH y antimicrobianos a mayor temperatura de refrigeración (6°C), también redujo los niveles de *L. monocytogenes* durante 42 días. Aunque después del abuso de temperatura las enterocinas añadidas como aditivo, resultaron inefectivas para evitar el crecimiento exponencial del patógeno en el producto a 6°C. El lactato-diacetato, en cambio, evitó el incremento del patógeno respecto a los niveles inoculados, mostrando de nuevo su potente efecto bacteriostático. De los resultados expuestos, se podría recomendar el uso del L-D como aditivo para mejorar la seguridad del

jamón cocido presurizado. Sin embargo, teniendo en cuenta el efecto protector contra la presión ejercido por el lactato, será necesario para cada producto y proceso de fabricación valorar la conveniencia de incluir el lactato en la formulación de productos cárnicos que se sometan a un tratamiento de alta presión hidrostática.

La combinación de la APH y el envasado antimicrobiano, con inclusión de enterocinas en las láminas, derivó en bajos niveles del patógeno (≤ 100 ufc/g) durante tres meses de conservación del jamón a 6°C (apdo. 3.2.3). A 1°C, el envasado antimicrobiano no aportó protección adicional a la ejercida por la presión durante la vida útil del jamón presurizado (3.2.3). Pero hay que destacar la contribución del envasado antimicrobiano para evitar la recuperación de las células dañadas después del abuso de temperatura a que se sometieron las muestras a los 60 días de conservación. Así la combinación de APH, envase antimicrobiano y 1°C resultó efectiva no sólo para controlar y reducir los recuentos, sino para superar la rotura de la cadena de frío.

Los resultados expuestos evidencian la dificultad de controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en el jamón cocido loncheado en condiciones de refrigeración y la necesidad de plantear estrategias que proporcionen obstáculos efectivos al crecimiento del patógeno, para garantizar la seguridad del producto en caso de contaminación. La combinación de barreras aplicadas (APH, antimicrobianos naturales y/o refrigeración a 1°C) minimizó el riesgo, reduciendo la contaminación y limitando el crecimiento de *L. monocytogenes*, aunque no consiguió ausencia del patógeno. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, el uso de inóculos elevados (10^3 - 10^5 ufc/g), en comparación con los recuentos de *L. monocytogenes* esperados para productos cárnicos cocidos LPC (1-10 ufc/g), podría conllevar una sobreestimación el riesgo (Uyttendaele y col., 2004). Además se ha descrito menor probabilidad de crecimiento y fases de latencia más extensas para inóculos inferiores a 10^3 ufc/g (Gay y col., 1996; Robinson y col., 2001; Pascual y col., 2001). Con todo, la combinación de APH y 1°C permitió reducir la contaminación por debajo de las 100 ufc/g, niveles establecidos por el Reglamento (CE) 2073/2005 como límite de *L. monocytogenes* al final de la vida útil del alimento (CE, 2005).

Finalmente, es importante destacar que las estrategias para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* deben ir acompañadas de una prevención adecuada, el uso de materias primas de calidad y aplicación de BPF y APPCC durante la fabricación y distribución del alimento.

4.3 BIBLIOGRAFÍA

- Arihara, K., Cassens, R.G. y Luchansky, J.B. 1994. Metmyoglobin reduction activity of enterococci. *Fleischwirtschaft* 74, 1203-1204.
- Aymerich, M.T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J., Monfort, J.M. y Hugas, M. 2000. Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J. Food Prot.* 63, 721-726.
- Aymerich, M.T., Martín, B., Garriga, M. y Hugas, M. 2003. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4583-4594.
- Aymerich, T., Martín, B., Rovira, J. y Garriga, M. 2004. Caracterización de bacterias de interés tecnológico en productos fermentados mediante técnicas moleculares. *Eurocarne* 131.
- Aymerich, M.T., Jofré, A., Garriga, M. y Hugas, M. 2005. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. *J. Food Prot.* 68, 173-177.
- Bacus, J. 1984. Update: meat fermentation. *Food Technol.* 38, 59-63.
- Bakalis, S., Giannakourou, M.C. y Taoukis, P. 2003. Effect of domestic storage and cooking conditions on the risk distribution in ready to cook meat products. Presentado en: *International Congress on Engineering and Food, ICEF-9, Montpellier.*
- Baracco, P., Berguer, Y., Durand, P., Frenzt, J.C., Giron, J., Guerin, J., Jacquet, B., Juillard, A., Pinel, M., Poterre, P. y Sirami, J. 1982. L'encyclopédie de la charcuterie. Ed. Soussana, Vesou, France.
- Barbuti, S. y Parolari, G. 2002. Validation of manufacturing process to control pathogenic bacteria in typical dry fermented products. *Meat Sci.* 62, 323-329.
- Bearson, S., Bearson, B. y Foster, J.W. 1997. Acid stress responses in Enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 147, 173-180.
- Blom, H., Nerbrink, E., Dainty, R., Hagtvedt, T., Borch, E., Nissen, H. y Nesbakken, T. 1997. Addition of 2.5% lactate and 0.25% acetate controls growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, sensory-acceptable serelat sausage and cooked ham stored at 4°C. *Int. J. Food Microbiol.* 38, 71-76.
- Borch, E., Kant-Muermans, M.L., Blixt, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 103-120.

- Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M.C. 2000. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 66, 185-189.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal Carou, M.C. 2001a. Changes in biogenic amine and polyamine content in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. *Meat Sci.* 57, 215-221.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M.C. 2001b. Effectiveness of a *Lactobacillus sakei* starter culture in the reduction of biogenic amine accumulation as a function of the raw material quality. *J. Food Prot.* 64, 367-373.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M.C. 2001c. Effect of the interaction between a low tyramine-producing *Lactobacillus* and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 65, 113-123.
- Bover-Cid, S., Hernández-Jover, T., Miguélez-Arrizado, M.J y Vidal-Carou, M.C. 2003. Contribution of contaminant enterobacteria and lactic acid bacteria to biogenic amine accumulation in spontaneous fermentation of pork sausages. *Eur. Food Res. Technol.* 216, 477-485.
- Carton, J.A., Maradona, J.A., Asensi, V., Pérez González, F., López Ponga, B., de la Iglesia, P. y Pérez del Molino, B. 1993. Infección hospitalaria por enterococos. El uso previo de antibióticos como factor de riesgo a través de un estudio de casos y controles. *Med. Clin.* 101, 769-773.
- Castaño, A., García Fontán, M.C., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E. y Carballo, J. 2002. Survival of *Enterobacteriaceae* during processing of *Chorizo de cebolla*, a Spanish fermented sausage. *Food Control* 13, 107-115.
- CE. 2005. Commission Regulation (CE) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L338, 1-26.
- Coppola, R., Giagnacovo, B., Iorizzo, M. y Grazia, L. 1998. Characterization of lactobacilli involved in the ripening of sopressata molisana, a typical southern Italy fermented sausage. *Food Microbiol.* 15, 347-353.
- Chasseignaux, E., Toquin, M.T., Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P. y Ermel, G. 2001. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants. *J. Appl. Microbiol.* 91, 888-899.
- Debevere, J.M. 1989. The effect of sodium lactate on the shelf of vacuum-packed coarse liver pâté. *Fleischwirtschaft* 69, 223-224.

- 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.
- Deleg, E., Peters, J., Höpke, U. y Ellerbroek, L. 2005. Behavior of a vancomycin resistant *E. faecium* strain in salami type sausage. *Fleischwirtschaft* 85, 118-119.
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L.M. y Prévost, H. 2006. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 564-582.
- Elischerova, K., Havlikova, G., Stupalova, S. y Glasnak, I. 1977. *Listeria monocytogenes* isolation at work places in the meat industry *Cesk. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 25, 326-332.
- Encinas, J.P., Sanz, J.J., García-López, M.L. y Otero, A. 1999. Behaviour of *Listeria* spp. in naturally contaminated chorizo (Spanish fermented sausage). *Int. J. Food Microbiol.* 46, 167-171.
- Fonberg-Broczek, M., Windyga, B., Szczawinski, J., Szczawinska, M., Pietrzak, D. y Prestamo, G. 2005. High pressure processing for food safety. *Acta Biochim. Pol.* 52, 721-724.
- Franz, C.M., Holzapfel, W. y Stiles, M.E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety?. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 1-24.
- FSIS. 2002. FSIS Directive 10,240.3: Microbial sampling of ready-to-eat (RTE) products of the FSIS verification testing program. FSIS/USDA, Washington, D.C.
- Garriga, M., Hugas, M., Gou, P., Aymerich, M.T, Arnau, J. y Monfort, J.M. 1996. Technological and sensorial evaluation of *Lactobacillus* strains as starter cultures in fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 32, 173-183.
- Garriga, M., Fadda, S., Aymerich, M.T. y Hugas, M. 2004. Evaluation of the hygienic status of traditional dry sausage workshops in Catalonia. Presentado en: 2nd Conference on food factory of the future. Laval, France.
- Gay, M., Cerf, O., Davey, K.R., 1996. Significance of pre-incubation temperature and inoculum concentration on subsequent growth of *Listeria monocytogenes* at 14 °C. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 433-438.
- Geornaras, I., Belk, K.E., Scanga, J.A., Kendall, P.A., Smith, G.C. y Sofos, J.N. 2005. Postprocessing antimicrobial treatments to control *Listeria monocytogenes* in commercial vacuum-packaged Bologna and ham stored at 10°C. *Food Microbiol.* 68, 991-998.
- Giraffa, G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 163-171.
- González, B. y Díez, V. 2002. The effect of nitrite and starter culture on microbiological quality of "chorizo" - a Spanish dry cured sausage. *Meat Sci.* 60, 295-298.

- Hugas, M. 1993. Acción antimicrobiana de las bacterias lácticas: sistemas naturales de conservación de los alimentos. *Eurocarne* 15, 47-52.
- Hugas, M. y Monfort, J.M. 1997. Bacterial starter cultures of meat fermentation. *Food Chem.* 59, 547-554.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. y Monfort, J.M. 2002. Bacterial cultures and metabolites for the enhancement of safety and quality in meat products. En Toldrà, F. (Ed.), *Research Advances in the Quality of Meat Products*. Research Signpost, Trivandrum, Kerala, India: pp. 225-247.
- ICMSF. 1980. Microbial ecology of foods. Factors affecting life and death of microorganisms. Silliker, J.H. (Ed.), Academic Press, New York. pp. 258.
- ICMSF. 1996. Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. ICMSF (Ed.), Blackie Academic & Professional, Suffolk.
- Ihnnot, A.M., Roering, A.M., Wierzba, R.K., Faith, N.G. y Luchansky, J.B. 1998. Behavior of *Salmonella typhimurium* DT104 during the manufacture and storage of pepperoni. *Int. J. Food Microbiol.* 40, 117-121.
- Katla, T., Møretrø, T., Sveen, I., Aasen, I.M., Axelsson, L., Rorvik, L.M. y Naterstad, K. 2002. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacin P and sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*. *J. Appl. Microbiol.* 93, 191-196.
- Leistner, L. 1995. Stable and safe fermented sausages world-wide. En Campbell-Platt, G. y Cook, P.E. (Ed.), *Fermented meats*. Black academic & professional, Glasgow: pp. 160-175.
- Lizaso, G., Chasco, J. y Beriain, M.J. 1999. Microbial and biochemical changes during ripening of salsichón, a Spanish dry cured sausage. *Food Microbiol.* 16, 219-228.
- Lücke, F.K. 1998. Fermented sausages. En Wood, B.J.B. (Ed.), *Microbiology of Fermented Foods*. Blackie Academic & Professional, London: pp. 441-483.
- Lueck, E. 1980. Antimicrobial food additives. Springer, Heidelberg, Germany.
- Maijala, R., Eerola, S., Lievonen, S., Hill, P. y Hirvi, T. 1995. Formation of biogenic amines during fermentation of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw materials. *J. Food Sci.* 60, 1187-1190.
- Martín, B., Garriga, M., Hugas, M. y Aymerich, T. 2005. Genetic diversity and safety aspects of *Enterococci* from slightly fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* 98, 1177-1190.
- Mbandi, E. y Shelef, L.A. 2002. Enhanced antimicrobial effects of combination of lactate and diacetate on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef bologna. *Int. J. Food Microbiol.* 76, 191-198.

- McClements, J.M.J., Patterson, M.F. y Linton, M. 2001. The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychotrophic bacteria in milk. *J. Food Prot.* 64, 514-522.
- Metaxopoulos, J., Genigeorgis, C., Fanelli, M.J., Franti, E. y Cosma, E. 1981a. Production of Italian dry salami. I. Initiation of staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. *J. Food Prot.* 44, 347-352.
- Metaxopoulos, J., Genigeorgis, C., Fanelli, M.J., Franti, C. y Cosma, E. 1981b. Production of Italian dry salami II: effect of starter culture and chemical acidulation on staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 863-871.
- Nightingale, K.K., Thippareddi, H., Phebus, R.K., Marsden, J.L. y Nutsch, A.L. 2006. Validation of a traditional Italian-style salami manufacturing process for control of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 69, 794-800.
- Nychas, G.J.E. y Arkoudelos, J.S. 1990. Staphylococci: their role in fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 167S-188S.
- Omar, N.B., Castro, A., Lucas, R., Abriouel, H., Yousif, N.M.K., Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., Pérez-Pulido, R., Martínez-Canamero, M. y Gálvez, A. 2004. Functional and safety aspects of enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 118-130.
- Ordóñez, J.A. y de la Hoz, L. 2001. Embutidos crudos curados. Tipos. Fenómenos madurativos. Alteraciones. En Bejarano, M. (Ed.), *Enciclopedia de la carne y los productos cárnicos*. Ediciones Martín & Macías, Plasencia: pp. 1063-1090.
- Papa, F., Grazia, L. y Romano, P. 1990. Alterazioni in salami tipo Felino provocate da enterococchi. *Industria Alimentari* 676-679.
- Pascual, C., Robinson, T.P., Ocia, M.J., Aboaba, O.O., Mackey, B.M. 2001. The effect of the inoculum size and sublethal injury on the ability of *Listeria monocytogenes* to initiate growth under suboptimal conditions. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 357-361.
- Raccach, M. 1992. Some aspects of meat fermentation. *Food Microbiol.* 9, 55-65.
- Robinson, T.P., Aboaba, O.O., Kaloti, A., Ocio, M.J., Baranyi, J., Mackey, B.M. 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 163-173.
- Rödel, W., Stiebing, A. y Kröckel, L. 1993. Ripening parameters for traditional dry sausages with a mould covering. *Fleischwirtschaft* 73, 848-853.
- Roig-Sagués, A., Hernández-Herrero, M., Rodríguez-Jerez, J., López-Sabater, E. y Mora-Ventura, M. 1997. Occurrence of tyramine producing microorganisms in "salsichón" and

- tyramine production in sausages inoculated with tyramine producing strain of *Lactobacillus brevis*. *J. Food Saf.* 17, 32-22.
- Sameshima, T., Magome, C., Takeshita, K., Arihara, K., Itoh, M. y Kondo, Y. 1998. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 1-7.
- Sanz, Y., Vila, R., Toldrá, F. y Flores, J. 1998. Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of non-fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 42, 213-217.
- Schillinger, U. y Lücke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1901-1906.
- Sergelidis, D., Abraham, A., Sarimvei, A., Panoulis, C., Karaioannoglou, P. y Genigeorgis, C. 1997. Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp. in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. *Int. J. Food Microbiol.* 34, 171-177.
- Tienungoon, S., Ratkowsky, D.A., McMeekin, T.A. y Ross, T. 2000. Growth limits of *Listeria monocytogenes* as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4979-4987.
- Trovatelli, L.D. y Schiesser, A. 1987. Identification and significance of enterococci in hard cheese made from raw cow and sheep milk. *Milchwissenschaft* 42, 717-719.
- Uyttendaele, M., Rajkovic, A., Benos, G., François, K., Devlieghere, F.A. y Debevere, J. 2004. Evaluation of a challenge testing protocol to assess the stability of ready-to-eat cooked meat products against growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 219-236.
- Winckel, E., Ritz, M., Pilet, M.F., Mescle, J.F. y Federighi, M. 1997. Effects de traitements hautes pressions sur *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* et *Enterococcus faecalis*. *Microbiol. Alim. Nutr.* 15, 197-204.

5 Conclusiones

1. En los embutidos tradicionales poco ácidos con fermentación espontánea, la falta de control de la fermentación se mostró como el factor crítico para asegurar la calidad microbiológica de los embutidos. Los fuets, con nitratos y nitritos añadidos a la formulación, fueron más seguros que los chorizos.
2. La inoculación de cultivos iniciadores (*L. sakei* y *S. xylosus*) seleccionados aseguró el descenso del pH de los embutidos y mejoró su seguridad y calidad higiénica, previniendo el crecimiento de microorganismos alterantes, patógenos y la acumulación de aminas biógenas. Los embutidos resultantes presentaron una calidad comparable a la de los embutidos tradicionales.
3. El tratamiento de alta presión hidrostática (300 MPa), previo al proceso de maduración, potenció la reducción de la población de *Salmonella* durante la maduración de los embutidos poco ácidos, minimizando el riesgo del mencionado patógeno. Sin embargo, la presurización resultó contraproducente para la seguridad global de los embutidos al dañar la microbiota endógena, comprometiendo el descenso de pH y su actividad antimicrobiana, obstáculos al crecimiento de *L. monocytogenes*.
4. El tratamiento de alta presión hidrostática (400 MPa), posterior al proceso de maduración, permitió obtener embutidos con ausencia de *Salmonella* spp., sin comprometer la calidad global (color, textura y sensorial) de los embutidos poco ácidos.
5. La combinación de cultivos iniciadores y la alta presión hidrostática, después de la maduración, fue necesaria para mejorar la higiene y seguridad durante el proceso de fermentación de los embutidos poco ácidos y conseguir ausencia de *Salmonella* spp. en el producto final.
6. El control de la temperatura resultó clave para mejorar la seguridad del jamón cocido loncheado. La refrigeración a 6°C permitió el crecimiento exponencial de *L. monocytogenes*, mientras que la conservación a 1°C desempeñó un importante efecto bacteriostático, retrasando 40 días el crecimiento del patógeno.

7. Las enterocinas incluidas en láminas biodegradables contribuyeron a prolongar la fase de latencia de *L. monocytogenes*. El envasado antimicrobiano (2.000 UA/cm²) combinado con la refrigeración a 1°C aseguraron el control de los niveles de contaminación durante los 60 días de vida útil del jamón cocido loncheado.
8. El lactato potásico y el diacetato sódico, añadidos a la formulación del jamón, ejercieron un efecto bacteriostático sobre *L. monocytogenes* durante la vida útil del jamón cocido loncheado, independientemente de la temperatura de refrigeración (1 y 6°C). El efecto del lactato-diacetato se mantuvo incluso después de la rotura de la cadena de frío.
9. La alta presión hidrostática (400 MPa) fue efectiva para reducir la contaminación inicial de *L. monocytogenes* en el jamón cocido loncheado, aunque fue necesario refrigerar el producto a 1°C para mantener el patógeno en los niveles conseguidos tras la presurización.
10. La combinación de alta presión hidrostática (APH) y lactato-diacetato redujo la contaminación inicial de *L. monocytogenes* del jamón cocido loncheado y mantuvo estos niveles durante su vida útil, independientemente de la temperatura de refrigeración. Esta estrategia permitió contrarrestar los efectos negativos del abuso de temperatura.
11. La alta presión hidrostática combinada con las enterocinas incluidas en el material de envasado fue el tratamiento más efectivo, a 1 y 6°C, para reducir la contaminación y mantener los niveles de *L. monocytogenes*, incluso después del abuso de temperatura. En el caso de añadir enterocinas a la formulación del jamón fue necesaria la refrigeración a 1°C posterior a la presurización para obtener un efecto comparable.

ABREVIATURAS

AB	Aminas biógenas	g	Gramo
ADN	Ácido desoxirribonucleico	GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
AENOR	Asociación Española de Normalización y Certificación	h	Hora
apdo.	Apartado	kDa	Kilodalton
APH	Alta presión hidrostática	kg	Kilogramo
APPCC	Análisis de peligros y puntos de control crítico	LPC	Listo para el consumo
aprox.	Aproximadamente	Mb	Mioglobina
aw	Actividad de agua	MetMb	Metamioglobina
BAL	Bacterias ácido lácticas	mg	Miligramo
BOE	Boletín Oficial del Estado	MPa	Megapascal
BPF	Buenas prácticas de fabricación	min	Minuto
CAC	<i>Codex Alimentarius Commission</i>	NT	No tratado
CE	Comisión Europea	NO	Óxido nítrico
CFIA	<i>Canadian Food Safety and Inspection Agency</i>	NOMb	Nitrosomioglobina
CGC+	Cocos Gram-positivos catalasa-positivos	p.e.	Por ejemplo
cm²	Centímetro cuadrado	pl	Punto isoeléctrico
CNE	Centro Nacional de Epidemiología	ppm	Partes por millón
col.	Colaboradores	PVA	Polivinil alcohol
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>	RASFF	<i>Rapid alert system for food and feed</i>
Eh	Potencial redox	UA	Unidades arbitrarias
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	ufc	Unidades formadoras de colonias
FSIS	<i>Food Safety and Inspection Service</i>	USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
ICMSF	<i>International Commission on Microbial Specifications for Foods</i>	µg	Microgramo

