

Sustitución/Reducción de aditivos sintéticos en productos alimentarios

Biopreservación de alimentos tradicionales por adicción de Bacterias Acido Lácticas e sus Bacteriocinas

Instituto Politécnico de Viana do Castelo - Portugal



Manuela Vaz Velho
Samuel Lima Jácome



ENCUADRAMIENTO

En los últimos años se ha dado mucha importancia al **uso de bacterias ácido lácticas (LAB)** en la preservación de alimentos debido a la capacidad de estos **controlaren microorganismos patógenos y alterantes.**

La aplicación de cepas biopreservantes en productos curados ahumados **permite reducir o hasta mismo eliminar la adicción de agentes conservantes como nitritos y nitratos** incrementando la calidad final del producto y asegurando su seguridad microbiológica.

Con la **globalización**, la **agregación de elementos identificativos y diferenciados** a los **productos tradicionales ha ganado especial relevo** por parte de los productores e consumidores, **permitiendo la vinculación** de los productos **al territorio** y a su **modo típico de fabrico.**

La gran variedad de productos cárneos ahumados y curados, sus procesos artesanales o industriales, representa un enorme impacto en la economía del sector agroalimentario del sur de Europa.

ENCUADRAMIENTO

Es de **extrema importancia valorizar los recursos nacionales**, pues se presentan como **factores de diferenciación** y, por consiguiente, **factores de competencia y de desarrollo**.

Dentro de cada país, los **recursos locales** representados por los productos tradicionales pueden también tener **un impacto económico interesante**, mediante la creación de esquemas de organización para **explotar la diversidad y la complementariedad** y, en consecuencia **permitir el logro de beneficios considerables**.

En **esta revisión se abarca aspectos básicos** de la **biopreservación** en alimentos, específicamente en **productos tradicionales cárnicos**, susceptibles de alteración y ataques de diversos microorganismos, **presentándola como una alternativa a la conservación por agentes químicos**.

CONTENIDO

1. Que és la Biopreservación?;
 2. El porqué de la Biopreservación?;
 3. Ecología de las Bacterias Acido Lácticas (LAB);
 4. Mecanismos de Supervivencia de las LAB;
 5. Metodologías más comunes de aplicación;
 6. Requisitos de aplicación;
 7. Aspectos mas relevantes de los metabolitos producidos por las LAB;
 8. Características fisicoquímicas de la “Alheira”;
 9. Seguridad microbiológica de productos curados ahumados;
 10. Seguridad química de productos curados ahumados;
 11. Actividad antimicrobiana de algunas LAB extraídas de productos cárneos;
 12. Ensayos de inactivación;
 13. Procesado de la “Alheira” con la adicción de las LAB
- Referencias Bibliográficas;

1. Biopreservación, que es?

Es un método de conservación que bajo ciertas condiciones permite extender la vida útil y incrementar la seguridad de los alimentos, por medio del uso de una microbiota natural o controlada y sus productos /metabolitos antimicrobianos ¹.

Muchos estudios han utilizado las Bacterias Acido Lácticas (LAB) aisladas de productos lácteos, cárnicos, pescados y vegetales, utilizando las propiedades antibacterianas, atribuidas a los productos finales de su metabolismo como ácido láctico, acético, peróxido de hidrógeno, diacetaldehido, reuterina y bacteriocinas ².

El uso de estos metabolitos como son las bacteriocinas puede ayudar a reducir la cantidad de preservantes químicos así como la intensidad del tratamiento térmico.

2. El porqué de la Biopreservación?

Formas limitadas de conservación de los alimentos.

Continua exigencia en disminuir y prohibir el uso de perservantes y aditivos químicos ^{3,4}.

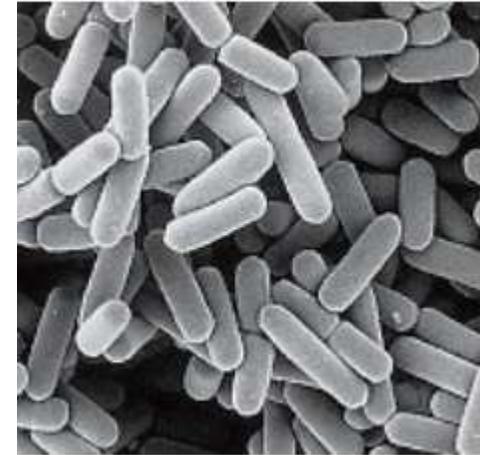
Obliga

Búsqueda de metodologías alternativas para conservar los alimentos.

El desarrollo de procedimientos complementarios de conservación, que junto con la refrigeración, consiguen incrementar la vida útil y garantizar la calidad sanitaria de la carne ⁵.

3. Ecología de las Bacterias Acido Lácticas

- Comprenden un número elevado de microorganismos Gram-positivos no esporolados anaerobios aerotolerantes e ácido tolerantes;
- Presentan morfología, metabolismo e fisiología semejante. Su fuente de energía se basa en la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de los carbohidratos;
- Incluyen cocos de géneros: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y bacilos de los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium*^{6,7};



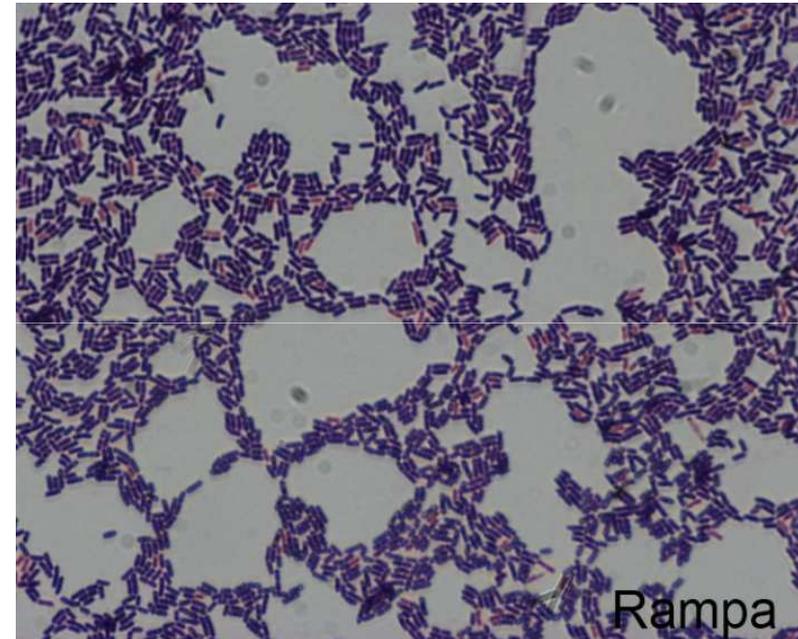
<http://www.dicat.csic.es/rdcsic/rdcsic>



Fotos: Proyecto *Biofumados: tradição vs Qualidade*

3. Ecología de las Bacterias Acido Lácticas

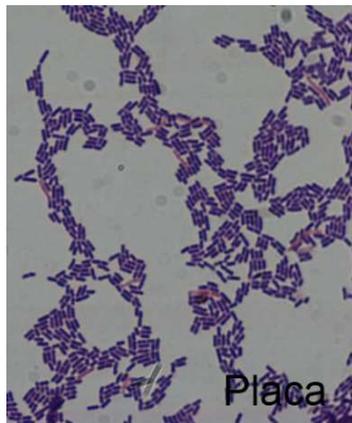
- Grupo de bacterias más abundante y difundido en la naturaleza, debido a la capacidad que poseen de crecer en una variedad de sustratos y en diversas condiciones biológicas;
- El grupo *Lactobacillus* es el más importante y heterogéneo;
- Las bacterias lácticas no necesitan oxígeno para crecer, son tolerantes a la presencia de CO₂, nitritos, humo y concentraciones de sal relativamente altas y toleran valores de pH bajos.



Fotos: Proyecto *Biofumados: tradição vs Qualidade*

4. Mecanismos de Supervivencia de las LAB

- Competición por oxígeno;
- Competición por sitios de ligación;
- Competición por producción de sustancias antagonistas como son:
 - ✓ Diacetilo (producto de fermentación),
 - ✓ peróxido de hidrógeno,
 - ✓ acetaldehído,
 - ✓ compuestos no proteicos de bajo peso molecular
 - ✓ bacteriocinas ^{8,11,5}.



Fotos: Proyecto *Biofumados: tradição vs Qualidade*



Fotos: Proyecto *Biofumados: tradição vs Qualidade*

5. Metodologías de Aplicación de las LAB

La biopreservación puede ser aplicada en alimentos y específicamente en cárnicos por 4 métodos básicos ^{2,10}:

1) Añadiendo un cultivo puro LAB viables productoras de bacteriocina.

Su éxito depende:

- habilidad del cultivo para crecer y producir bacteriocina bajo condiciones ambientales y tecnológicas (temperatura, pH, Aw, aditivos, entre otros);
- deben ser capaces de competir con la microflora natural;
- no debe tener impacto en las propiedades fisicoquímicas y organolépticas del alimento;
- no debe producir gas ni ex polisacáridos para evitar el inflamamiento por acumulación de gases y la formación de viscosidades;



Método in situ de Inoculación en Alimentos

5. Metodologías de Aplicación de las LAB

2) Añadiendo bacterias acidó lácticas mesófilas, como una protección contra el abuso de temperatura.

- la cepa bioprotectora se mantendrá previamente en una concentración inicial en condiciones de frío;
- Bajo condiciones de abuso de temperatura, la cepa crecerá por competición frente a la bacteria patógena;
- Incluso según la temperatura puede actuar como el deteriorante predominante asegurando que los patógenos no crecen y el producto no pueda ser consumido por su grado de deteioración



Método in situ de Inoculación en Alimentos

5. Metodologías de Aplicación de las LAB

3) Añadiendo preparaciones de bacteriocina cruda (extracto crudo), licor fermentado o concentrados obtenidos por el crecimiento de LAB productoras de bacteriocina en sustrato complejo.

- evita el uso de compuestos purificados que pueden tener regulación legal y ahorra costos en fase a necesidad de purificación de cada compuesto;



**Método Ex Situ de Inoculación en Alimentos
(producción en condiciones controladas fuera del alimento)**

5. Metodologías de Aplicación de las LAB

4) Adicionando sustancias antagónicas puras o semipuras como las bacteriocinas producidas por LAB.

- El método se premia por la precisión de la dosis y por ende más predecible;
- Se limita a la regulación de cada país en lo que concierne la adición de aditivos en alimentos;
- Se debe inicialmente estandarizarse la producción y precipitación de la bacteriocina, hasta garantizar su reproducibilidad y asegurar la cantidad adecuada con suficiente poder inhibitorio



**Método Ex Situ de Inoculación en Alimentos
(producción en condiciones controladas fuera del alimento)**

6. Requisitos de aplicación;

La aplicación de estas metodologías depende indudablemente de:

- **Controlar las variables tecnológicas** a las que sean sometidas los cultivos;

En el caso del método Ex situ:

- **Tener las cepas iniciadoras** (microorganismos completamente aislados);
- **Asegurar medios de cultivo y equipos** para el desarrollo de las cepas y para la producción de la bacteriocina;
- **Garantizar la actividad de cada extracto** o de la **bacteriocina**;
- **Determinar la concentración mínima inhibitoria** contra patógenos (**curvas de crecimiento e inactivación** del patógeno);
- **Estandarizar las técnicas** para lograr las cantidades y el efecto deseado;

7. Aspectos mas relevantes de los metabolitos producidos por las LAB

- La utilización de los carbohidratos disponibles en el alimento y la reducción del pH a causa de los ácidos orgánicos producidos, son el **principal mecanismo de antagonismo microbiano** de las bacterias lácticas.
- Los **ácidos orgánicos contribuyen al desarrollo de sabor, aroma y textura de los alimentos**, pero también a su estabilidad mediante la inhibición de microorganismos alterantes ¹¹.
- La **actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos y del pH es complementaria**, siendo la **fracción no dissociada de los ácidos orgánicos** la que posee una **mayor actividad inhibidora** debido a su **naturaleza lipofílica**.
- Las **bacterias lácticas pueden sobrevivir y desarrollarse** en presencia de **pH relativamente bajo** a diferencia de otros grupos microbianos pues poseen un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, originando energía ⁶.

7. Aspectos mas relevantes de los metabolitos producidos por las LAB

- Las bacteriocinas son un metabolito sobre el cual se han centrado la **mayor parte de estudios en los últimos años**; desarrollándose diversas investigaciones en torno a su **detección, producción, purificación, forma de acción, caracterización bioquímica, propiedades bactericidas, microorganismos inhibidos o sensibles y aplicación con éxito** en la **biopreservación de alimentos** ^{12,13,14, 15,16,17,18}.
- Las **bacteriocinas son proteínas o péptidos bactericidas** sintetizados en el ribosoma de las LAB, la célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina.
- Las bacteriocinas de bacterias lácticas **son generalmente estables a pH ácido o neutro**, indicando una adaptación al entorno natural de las bacterias que las producen. Además **algunos extractos de *lactobacillus plantarum* y *lactobacillus brevis*** presentan **estabilidad** al calentamiento a **50 y 80 °C**.

7. Aspectos mas relevantes de los metabolitos producidos por las LAB

Tabla 1. Algunas las LAB aisladas de embutidos curados, identificados por métodos tradicionales y moleculares

Country	Traditional product	Bacterial species	Reference
Argentina	Dry-cured sausages	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Fontana <i>et al.</i> , 2005a, b
France	Dry sausages	<i>Lb. sakei</i>	Anmmor <i>et al.</i> , 2005
Greece	Dry salami	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. coryniformis</i> , <i>Lb. casei</i> subsp. <i>pseudoplarum</i> , <i>W. viridescens</i> , <i>W. hellenica</i> , <i>W. paramesenteroides</i>	Samelis <i>et al.</i> , 1994
	Dry salami	<i>Lb. sakei</i>	Samelis <i>et al.</i> , 1998
	Dry smoked sausages	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>Lb. buchneri</i> , <i>W. viridescens</i> , <i>W. pseudomesenteroides</i>	Papamanoli <i>et al.</i> , 2003
	Dry smoked sausages	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. plantarum</i> / <i>pentosus</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Lact. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Drosinos <i>et al.</i> , 2005
	Dry sausages	<i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei/paracasei</i> , <i>Lb. paraplantarum</i>	Rantsiou <i>et al.</i> , 2005a
Hungary	Dry sausages	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>W. viridescens</i> , <i>W. paramesenteroides/ hellenica</i> , <i>Ln. mesenteroides</i>	Rantsiou <i>et al.</i> , 2005a
Italy	Dry sausages	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Torriani <i>et al.</i> , 1990
	“Soppressata molisana”	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. curvatus</i>	Coppola <i>et al.</i> , 1998
	“Soppressata” and “salsiccia”	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lact. carnosum</i> , <i>Lact. gelidum</i> , <i>W. paramesenteroides</i>	Parente <i>et al.</i> , 2001

7. Aspectos mas relevantes de los metabolitos producidos por las LAB

Tabla 1. Algunas las LAB aisladas de embutidos curados, identificados por métodos tradicionales y moleculares

	"Soppressata", "salame tradizionale"	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i>	Andrighetto <i>et al.</i> , 2001
	"Salame tipo Napoli"	<i>Lb. sakei</i>	Coppola <i>et al.</i> , 2000
	Dry sausages	<i>Lb. sakei</i>	Rebecchi <i>et al.</i> , 1998
	"Salame friulano"	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. alimentarius</i>	Cocolin <i>et al.</i> , 2000
	"Salame friulano"	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Cocolin <i>et al.</i> , 2001a; Rantsiou <i>et al.</i> , 2004
	Sardinian sausages, dry-fermented	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Greco <i>et al.</i> , 2005
	"Salame friulano"	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Rantsiou <i>et al.</i> , 2005a
	"Salame friulano"	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paraplantarum</i>	Cemi <i>et al.</i> , 2005
	"Salame friulano"	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. garvione</i>	Rantsiou <i>et al.</i> , 2005b
	Fermented sausages, Friuli-Venezia-Giulia region	<i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lact. garvione</i> , <i>Lact. lactis</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. paraplantarum</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>W. hellenica</i> and <i>W. paramesenteroides</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Urso <i>et al.</i> , 2006
	"Salami Ciauscolo", short-ripened	<i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Aquilanti <i>et al.</i> , 2007b
Spain	Dry sausages	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i>	Sanz <i>et al.</i> , 1988
	Dry sausages	<i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Hugas <i>et al.</i> , 1993
	"Salsichón"	<i>Lb. sakei</i>	Hugas <i>et al.</i> , 1993
	"Chorizo", dry sausage	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Pediococcus</i> spp.	Santos <i>et al.</i> , 1998
	"Chorizo", dry sausage	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. curvatus</i>	Aymorich <i>et al.</i> , 2003
	"Fuet"	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Aymorich <i>et al.</i> , 2003
	"Morcilla de Burgos", blood sausages	<i>W. viridescens</i> , <i>Leuconostoc</i> spp.	Santos <i>et al.</i> , 2005
	"Botillo", raw-cured pork sausage	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Foutou <i>et al.</i> 2007a
	"Androlin", raw- cured sausage	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. curvatus</i>	Foutou <i>et al.</i> 2007b

For each product, the species are ordered on the basis of their prevalence.

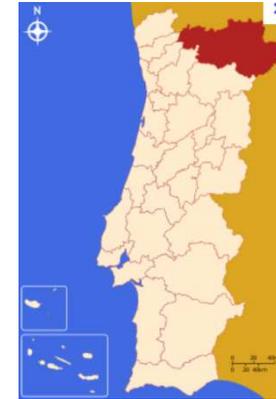
8. Características fisicoquímicas de la *Alheira*

Alheira – Es un **embutido cocido curado levemente ahumado tradicional portugués**, su origen remonta a finales del siglo XV y se asocia con la presencia de las comunidades judías de *Trás-os-Montes* en el Norte de Portugal ¹⁹.

El producto es constituido por una **mezcla de ternera, pollo , cerdo, pan y especias**.

Su **forma es cilíndrica** recordando una herradura con cerca de 20 cm a 25 cm de largo e de color castaño claro. La tripa se presenta sin roturas y bien junta a la pasta. Las extremidades se unen por un hilo de algodón ¹⁹.

La **regeneración se hace friendo o al horno**.



http://en.wikipedia.org/wiki/Alto_Tr%C3%A1s-os-Montes_Subregion



<http://www.cm-mirandela.pt/index.php?oid=3574&id=>

8. Características fisicoquímicas de la *Alheira*

El producto presenta una **vida útil de 60 días** almacenado a temperatura de **refrigeración y envasado en atmosfera modificada**.

Su peso oscila entre 150 y 200 gramos.

En lo que toca a las **características sensoriales** su sabor es agradable, levemente ahumado, donde se **destaca la condimentación del ajo y del aceite así como una ligera acidez**.

Tabla 2. Máximo, mínimo promedio e desviación estándar de algunos parámetros fisicoquímicos y nutricionales del producto ²⁰

	Min.	Max.	Mean	SD
pH	4.5	6.3	5.11	0.5
% NaCl	1.0	1.8	1.3	0.3
% Moisture	43.3	57.2	52.3	4.31
% Fat	10.9	29.6	18.4	4.7
% Total protein	6.9	15.5	11.4	2.8
% Carbohydrates	10.2	20.9	15.2	3.6
Energy (kcal/100 g)	220	369	274.4	39.7

9. Seguridad microbiológica de productos curados ahumados

- Genéricamente la microbiología de los embutidos fermentados es compleja y el **tipo de microflora** que se desarrolla a menudo está estrechamente relacionado con el **origen geográfico, la composición y la técnica de maduración utilizado**.
- Los **primeros estudios** sobre la **ecología de los embutidos fermentados** se remontan a **1970** ²¹. A partir de entonces, se estableció **dos grupos de microorganismos** como los **mas responsables** por las **transformaciones** que intervienen en la fermentación y maduración de los embutidos, **las LAB**, en particular, *Lactobacillus spp.* y **las Gram-positivas Coagulase-Negative Cocci (CNC)**, en concreto el *Staphylococcus* y el *Kocuria spp* ²².
- Cuanto a la **carga microbiana**, las **LAB** suelen **aumentar en los primeros días de fermentación** y se mantienen **constantes** durante la **maduración** en 7-9 log ufc/g ^{23, 24}.

9. Seguridad microbiológica de productos curados ahumados

Tabla 3. Caracterización microbiológica y química de diferentes embutidos²²

Product	Microbiological counts (log cfu/g)					Chemical properties				Reference
	Total aerobic mesophilic	Total LAB	Enterococci	CNC	Yeasts and moulds	pH	Moisture (%)	a _w	NaCl (%)	
Greek dry smoked sausages	ca. 7.0	ca. 8.0	4.0-5.0	2.0-4.0	ca. < 2.0	ca. 4.8	ca. 33.1	n.a.	ca. 3.9	Drosinos <i>et al.</i> 2005
Greek dry smoked sausages	ca. 8.0	ca. 8.0	ca. 3.0	ca. 1.0	n.a.	ca. 5.5	ca. 33.0	n.a.	ca. 11.0	Papamanoli <i>et al.</i> , 2003
Italian dry sausages North-East Italy (Friuli-Venezia Region)	ca. 6.0	ca. 8.0-9.0	ca. 2.0	ca. 4.0	n.a.	ca. 5.6	n.a.	n.a.	n.a.	Cocolin <i>et al.</i> , 2001a
Dry sausages (Friuli-Venezia Region)	ca. 7.0	ca. 7.0-8.0	ca. 6.0	ca. 5.0-6.0	ca. < 2.0 -3.0	ca. 5.7	n.a.	ca. 0.92	ca. 3.3	Comi <i>et al.</i> , 2005; Rantsiou <i>et al.</i> , 2005b
Italian "Salami Ciauscolo", short-ripened	n.a.	ca. 8.6	n.a.	ca. 6.5	ca. 5.0	ca. 5.0	n.a.	ca. 0.88	n.a.	Aquilanti <i>et al.</i> , 2007b
Italian fresh sausages (0 th day storage)	ca. 4.0	ca. 3.7	ca. 2.0	< 2.0	< 2.0	ca. 5.6	n.a.	ca. 0.97	n.a.	Cocolin <i>et al.</i> , 2004
Italian fresh sausages (10 th day storage)	ca. 7.0	ca. 7.5	ca. 5.5	ca. 5.1	< 2.0- 5.8	ca. 5.6	n.a.	ca. 0.97	n.a.	Cocolin <i>et al.</i> , 2004
"Botillo", spanish raw-cured pork sausage	ca. 8.7	ca. 8.9	n.a.	ca. 6.6	n.a.	ca. 5.0	ca. 50.6	ca. 0.96	ca. 2.6	Fontán <i>et al.</i> , 2007a
"Androlla", spanish raw-cured sausage	ca. 9.0	ca. 9.1	ca. 3.3	ca. 6.9	ca. 4.3	ca. 5.4	ca. 37.9	ca. 0.90	ca. 2.0	Fontán <i>et al.</i> , 2007b
Argentinean dry-cured sausages	ca. 7.0	ca. 7.0	ca. 5.0	ca. 5.0	detected	ca. 5.2	n.a.	n.a.	n.a.	Fontana <i>et al.</i> , 2005a
"Chouriça de Vinhais", dry smoked sausages North Portugal	n.a.	ca. 7.0-8.0	> 4.0	ca. 3.0-4.0	ca. 3.0-5.0	ca. 5.4	ca. 29.8	n.a.	ca. 2.3	Ferreira <i>et al.</i> , 2007b
"Salpicão de Vinhais", dry-smoked sausages North Portugal	n.a.	ca. 7.0-8.0	> 4.0	ca. 3.0-4.0	ca. 3.0-4.0	ca. 5.3	ca. 41.77	n.a.	ca. 2.4	Ferreira <i>et al.</i> , 2007b
"Alheira"	n.a.	ca. 7.5-9.0	> 6.5	ca. 5.9-7.2	< 1-6.4	ca. 5.0	ca. 52.3	n.a.	ca. 1.3	Ferreira <i>et al.</i> , 2006
"Alheira"	ca. 8.3	ca. 8.1	n.a.	n.a.	ca. 6.0	ca. 5.3	n.a.	ca. 0.96	n.a.	Esteves <i>et al.</i> , 2008

ca. circa; n.a. not available

9. Seguridad microbiológica de productos curados ahumados

- Los *Enterococcus* generalmente tienen un nivel inicial de entre 2 y 4 log ufc/g. **Suelen crecer durante la fermentación** y su nivel de proliferación se mantiene constante entre 4 a 6 log ufc/g ²⁴.
- Las CNC constituye la segunda fracción de segundo más grande de la microbiota, con una población de 4 a 6 log ufc/g. **Pueden crecer durante la fermentación o la maduración ²⁴ o durante todo el proceso ²⁵ .**
- Se ha **encontrado** en estos productos Bacterias degradantes como las **Pseudomonas y enterobacterias con diferentes niveles de desarrollo según el tipo de embutido ²⁶.**
- Se ha **encontrado bacterias patógenas**, como la *Salmonella spp., L. monocytogenes y St. aureus* en un nivel por encima del límite de 2,7 log ufc / g ^{26, 27,20}.

9. Seguridad microbiológica de productos curados ahumados

Tabla 4. Caracterización microbiológica, controles microbiológicos comúnmente elaborados²²

Product	Enterobacteria (log cfu/g)	<i>Pseudomonas</i> spp. (log cfu/g)	Pathogenic staphylococci (log cfu/g)	Sulphite reducing clostridia (presence/absence/g)	<i>Salmonella</i> spp. (presence/ absence/25g)	<i>L. monocytogenes</i> (log cfu/g)	Reference
Greek dry smoked sausages	< 1.0	< 2.0	< 2.0	(+)	(-)	n.d.	Drosinos <i>et al.</i> , 2005
Greek dry smoked sausages	ca. 1.0	n.a.	n.d.	n.a.	n.a.	ca. 3.0	Papamanoli <i>et al.</i> , 2003
Italian sausages	< 1.0		n.d.	n.a.	n.a.	n.a.	Cocolin <i>et al.</i> , 2001a
Italian "Salami Ciauscolo", short-ripened	< 1.0	< 1.0	< 2.0	n.a.	(-)	n.d.	Aquilanti <i>et al.</i> , 2007b
Dry sausages (Friuli-Venezia Region)	< 1.0	n.d.	n.d.	n.a.	(-)	n.d.	Comi <i>et al.</i> , 2005 Rantsiou <i>et al.</i> , 2005b
Italian fresh sausages (0 th day storage)	< 1.0	n.a.	ca. 2.3	n.a.	n.a.	n.a.	Cocolin <i>et al.</i> , 2004
Italian fresh sausages(10 th day storage)	ca. 5.0	n.a.	< 1.0	n.a.	n.a.	n.a.	Cocolin <i>et al.</i> , 2004
"Botillo spanish raw-cured pork sausage	ca. 3.0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Fontán <i>et al.</i> , 2007a
"Androlla", spanish raw-cured sausage	ca. 2.8	n.a.	ca. 4.0	n.a.	n.a.	n.a.	Fontán <i>et al.</i> , 2007b
Argentinean dry-cured sausages	n.a.	n.a.	n.d.	n.a.	n.a.	n.a.	Fontana <i>et al.</i> , 2005a
"Chouriça de Vinhais", dry smoked sausages, North Portugal	< 2.2-6.0	n.a.	n.a.	(-); (+)*	(-)	< 1.0-2.0	Ferreira <i>et al.</i> , 2007b
"Salpicão de Vinhais", dry-smoked sausages, North Portugal	< 2.2-6.6	n.a.	< 1.0-4.0	(-); (+)*	(-)	n.d.	Ferreira <i>et al.</i> , 2007b
"Alheira"	> 4.0	n.a.	< 1.0-4.0	(-)	(+)*	< 1.0-5.5	Ferreira <i>et al.</i> , 2006; Ferreira <i>et al.</i> , 2007a
"Alheira"	ca. 7.3	n.a.	ca. 4.5	(-); (+)*	(-); (+)*	n.d.; > 1.0	Esteves <i>et al.</i> , 2008

ca. circa; n.a. not available; n.d. not detected in any sample; (-) absence, (+) presence; *at least in one of the samples

10. Seguridad química de productos curados ahumados

- La prevención de la aparición de agentes cancerígenos en el ahumado de productos curados ha sido un problema desde hace varios años.
- Existen **2 grupos** de **sustancias químicas** potencialmente **carcinógenos** en el humo: Los **Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)** y las **N-nitrosaminas (ANE)** ²⁸.
- El **benzopireno** es el HAP más preocupante, pues es considerado como un **indicador de carcinogenicidad** ²⁸.
- El uso de **generador de humo por separado**, manteniendo las temperaturas de pirólisis entre **200 y 245 ° C**; **filtración electrostática del humo**; **humo generado por vapor sobrecalentado** o el uso de **humo líquido** son algunas de las formas de reducir los niveles de HAP en alimentos ahumados.

10. Seguridad química de productos curados ahumados

- Los **nitratos y nitritos** (sales de ácido potásico, nítrico y nitroso) son **utilizados como conservantes** en carnes ahumadas debido a su capacidad antimicrobiana, concretamente en el **control del crecimiento del *C. botulinum*** y por consiguiente en la formación de la toxina butolínica ²⁹.
- Permiten además proporcionar **características organolépticas apreciadas por el consumidor** como el color (Mioglobina+ NO₂) y sabor ²⁹.
- Sin embargo son un **factor de riesgo** ya que permiten la **formación de nitrosaminas** por la reacción de NO₂, en medio ácido (estomago), con las aminas secundarias y terciarias (productos de descomposición) presentes en la carne ²⁸.
- Aditivos tales como el **ácido ascórbico añadido junto con nitritos** **inhibe la formación de nitrosaminas.**

10. Seguridad química de productos curados ahumados

- Debido a los **dos riesgos de toxicidad** y según su peso (la ingestión de la **toxina butolínica** o la **toxicidad de los nitratos o nitritos**) sigue **legal** la **adición de estos compuestos en productos cárneos** en casi todas las reglamentaciones, aun que con **restricciones de empleo, dosis, y obligatoriedad de adición de agentes inhibidores** de formación de nitrosaminas ²⁹.
- En la **UE** la adición de **nitratos y nitritos** es legal pero esta **restringida a productos cárneos ahumados y son impuestos límites críticos en ml/l o mg/kg**. En la industria del pescado solo son permitidos en productos específicos como el escabeche de arenque o espadín (máx. 500mg/l) ³⁰.
- En **Portugal** es **prohibido la adición** de estos compuestos a **productos con Denominación de Origen Protegida** por lo que es fundamental el estudio de tecnologías alternativas (LAB y Bacteriocinas) que **incrementen la seguridad microbiológica** ya que la química ya se ve asegurada por la legislación²⁸.

11. Actividad antimicrobiana de algunas LAB extraídas de productos cárneos

BAL	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. faecalis</i>	Causa da inibição
3000A	-	x	-	-	-	-	-	Competição
3000B	-	x	-	-	-	-	-	Competição
3000C	-	x	-	-	-	-	-	Competição
3000D	-	x	-	-	-	-	-	Competição
3739A	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3739B	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3739C	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3739D	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3739E	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3739F	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3739G	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3739H	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3910A	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3910B	x	-	-	-	-	-	-	Efeito do Ácido
3910C	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3910D	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3910E	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3910G	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3910H	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3910I	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3910J	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3912A	x	x	-	-	-	-	-	Competição
3912B	x	x	-	-	-	-	-	Competição
3912C	x	x	-	-	-	-	-	Competição
3912E	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3912F	x	-	-	-	-	-	-	Competição
3912G	-	x	-	-	-	-	-	Competição
3912H	x	x	-	-	-	-	-	Competição
5308A	x	-	-	-	-	-	-	Competição
5308B	x	-	-	-	-	-	-	Competição
5308C	x	-	-	-	-	-	-	Competição
5308D	x	-	-	-	-	-	-	Competição
5308F	x	-	-	-	-	-	-	Competição
5308G	x	-	-	-	-	-	-	Competição
5308H	x	-	-	-	-	-	-	Competição
5308I	x	-	-	-	-	-	-	Competição
6867A	x	-	x	-	x	x	-	Efeito do Ácido
6867B	x	-	-	x	x	x	-	Competição
6867C	x	-	-	x	x	-	-	Competição
6868A	x	-	x	x	x	x	-	Competição
6868B	-	-	-	-	x	x	-	Competição
6868C	-	-	-	-	x	x	-	Competição
6869A	x	-	-	x	x	-	-	Competição
6869B	x	-	-	x	x	-	-	Competição
6869C	-	-	-	-	x	-	-	Competição
6869E	x	-	x	x	x	x	x	Competição
6870A	-	-	-	-	x	x	-	Competição
6870B	-	-	-	-	x	x	-	Competição
6870C	-	-	-	x	x	x	-	Competição
12743A	x	x	x	-	-	-	-	Competição
12743B	x	x	x	-	-	-	-	Competição
12743C	x	x	x	-	-	-	-	Competição
12743E	x	x	x	-	-	-	-	Competição
12743F	-	x	x	-	-	-	-	Competição
12743G	-	x	x	-	-	-	-	Competição
12744A	x	-	-	-	-	-	-	Competição
12744B	x	-	-	-	-	-	-	Competição

Tabla 4.
Memoria
Interna de
actividades
projecto
Biofumados:
tradição vs
Qualidade

12. Ensayos de inactivación

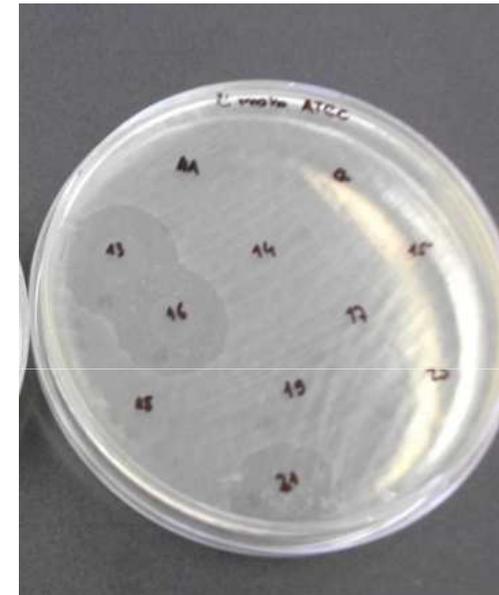
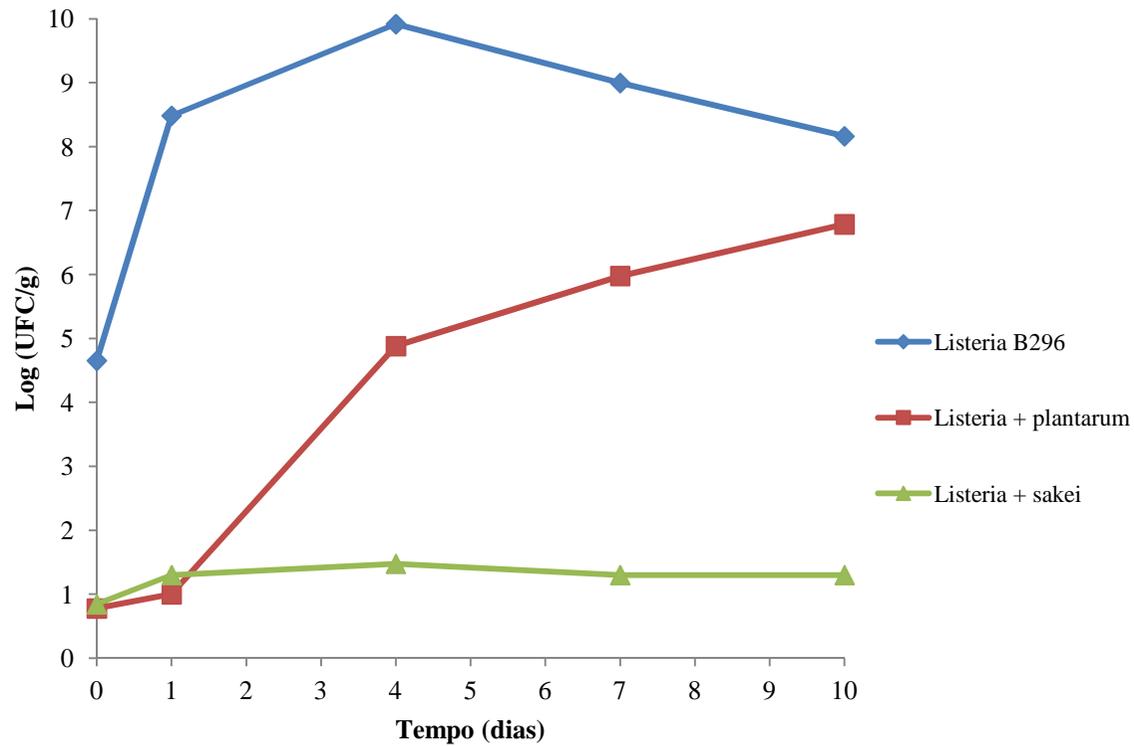
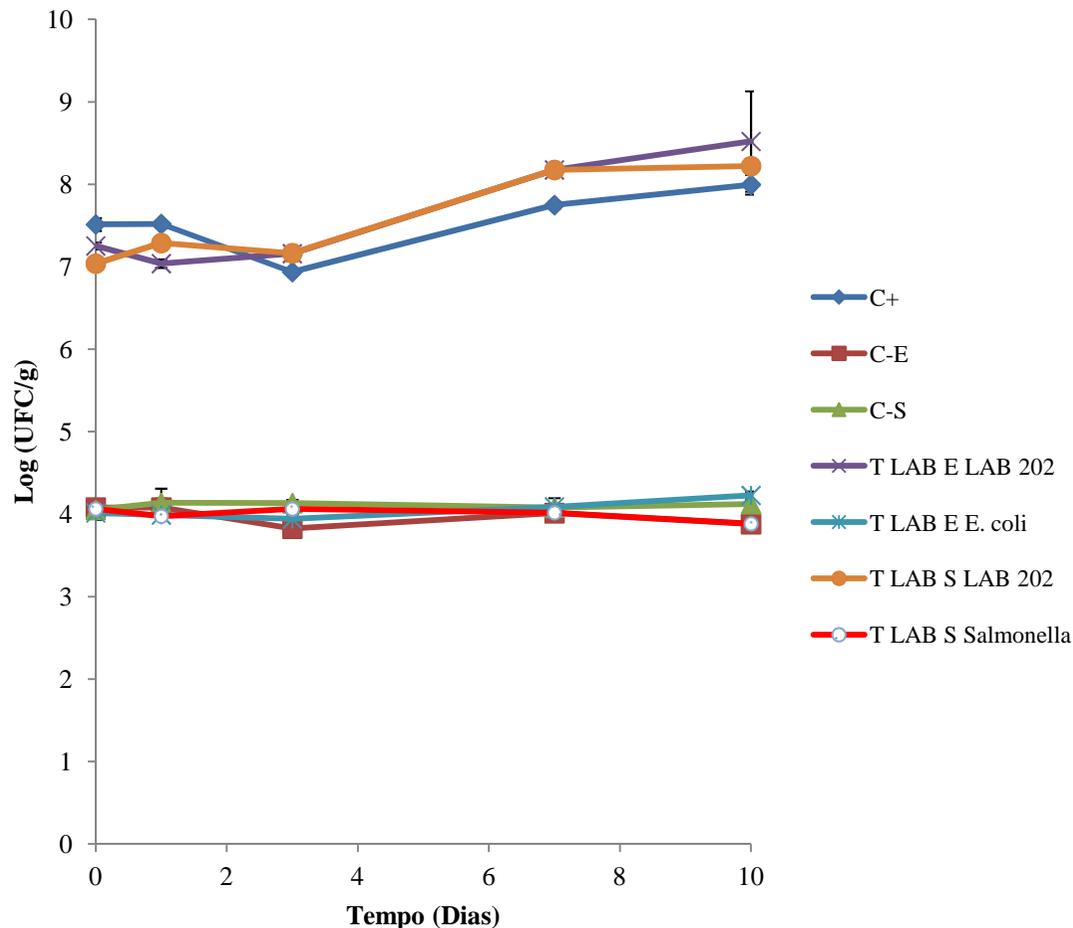


Foto: Projecto *Biofumados: tradição vs Qualidade*

Curvas de Crecimiento de *L. MONOCYTOGENES* B296 en carne, de la LAB ST202 (*L. PLANTARUM*) y de LAB ST153 (*L. SAKEI*)

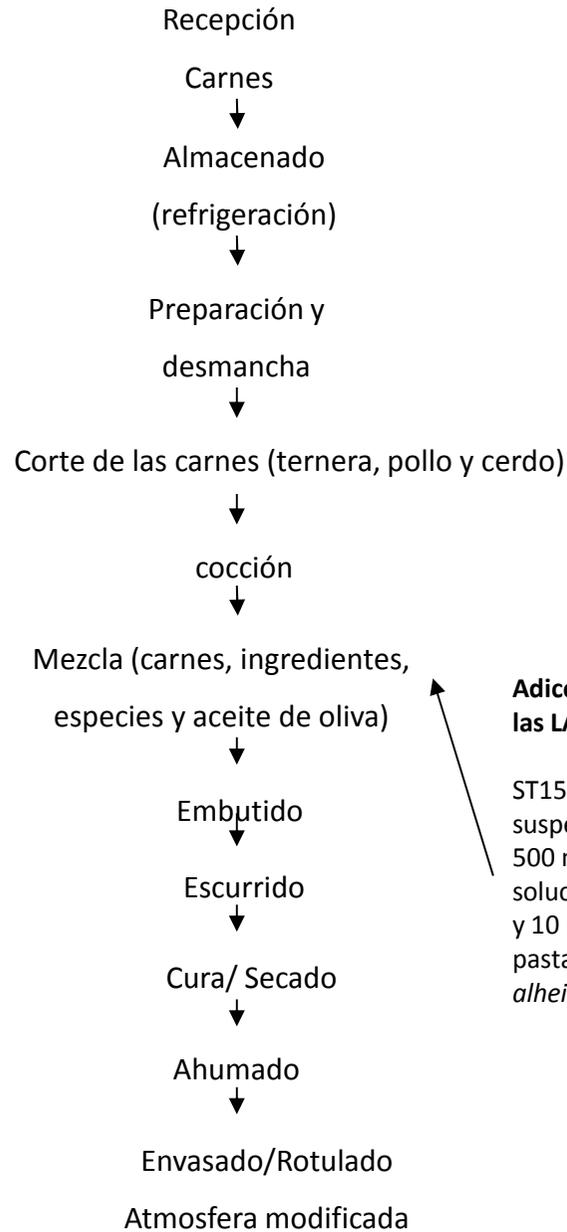
12. Ensayos de inactivación



C+ – mezcla carne solo con ST202;
C-E – mezcla carne solo con *E. coli*;
C-S – carne con *Salmonella spp.*;
T LAB E LAB 202 – crecimiento de ST202 en la mezcla
T LAB E *E. coli* – crecimiento de *E. coli* en la mezcla;
T LAB S LAB 202 – crecimiento de la ST202 en la mezcla
T LAB S *Salmonella* – crecimiento de *Salmonella spp.* en la mezcla

Crecimiento de *E. COLI* E *SALMONELLA SPP.* en la mezcla de carne de “ALHEIRA” junto con la LAB ST202 (*L. PLANTARUM*)

13. Procesado de la *Alheira* con la Adicción de las LAB



Adicción de las LAB

ST153 - 9log suspendida en 500 mL de solución salina y 10 Kg de pasta de *alheira*



Fotos: Proyecto *Biofumados: tradição vs Qualidade*

Referencias Bibliográficas

1. Chen H. & Hower DG. Bacteriocins and their Food Applications. *Food Sci Food Saf* 2003; 2: 82-100.
2. Fiorentini Angela M, Sant'Anna Ernani S, Porto Anna CS, Mazo Jaciara Z. Franco Bernadette DGM. Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* bn in the shelf-life of refrigerated bovine meat, *Brazilian J Microbiol* 2001; 32:42-46.
3. Urrego Velasquez, MC, Cadavid Rojas LA. Efecto sobre la calidad microbiológica, sensorial y Teológica, de la aplicación de tres diferentes niveles de ácido láctico en un corte de carne de res (Huevo de Solomo). Trabajo de grado Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia. Medellín - Colombia 2005.
4. Fadda S, Chambón C, Champomier-Verge" s MC, Talón R, Vignolo G. *Lactobacillus* role during conditioning of refrigerated and vacuum-packaged Argentinean meat, *Meat Sci* 2008; 79: 603-610.
5. Garcia T, Martin R, Sanz B, Hernández PE. Extension de la vida útil de la carne fresca. I envasado en atmósfera modificada y utilización de bacterias ácido lácticas y bacteriocinas, *Rev Española de Cieñe Tecnol Al* 1995; 35 (1): 1-18.
6. Santroch Vacca Diana. Evaluación de la calidad y composición química de la carne de res proveniente de animales de dos grupos de edad en Puerto Rico. Tesis Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Puerto Rico. Recinto universitario de Mayagüez - Puerto Rico. 2006.
7. Ruiz de Huidobro E Miguel, B. Blazquez, E. Onega. A comparison between two methods (Warner-Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. *Meat Sci* 2005; 69: 527-536.
8. ICMSF (Internacional Commmission of microbiological Specifications for Foods). *Ecol Microb Product Al* 1998;6:30-35.
9. Smulders FJM. Preservation by microbial decontamination, the surface treatment of meats by organic acids. En: GOULD, G.W. *New methods of food preservation*. Blackie academic & professional Inglaterra. 1995; pp 253-279.
10. Moreira Do Santos, Wagner Luiz. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producidas por *pediococcus* sp 347 de origen cárnico. Tesis Doctorado. Departamento de Nutrición y Bromatología III. Universidad complutense de Madrid. Facultad de veterinaria. Madrid -España. 1993.
11. Vignolo G, Fadda S, Kairuz MN, HolgadoAR, Oliver G. Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by lactocina 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL705, *Int J Food Microbiol* 1996; 29: 397-402.
12. Svetoslav Dimitrov Todorov, Peter Ho, Manuela Vaz-Velho. Optimisation of bacteriocin ST153Ch production by *Lactobacillus sakei* ST153Ch, strain isolated from salpicão, a traditional pork product from the north-west of Portugal, *Journal of Biotechnology* 2008; 136.
13. Svetoslav Dimitrov Todorov, Manuela Vaz-Velho. Isolation and characterization of plantaricin ST8SH a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH, strain isolated from Bulgarian salami. *Journal of Biotechnology Supplement* 1, 136: 735. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.07.1751
14. Todorov, S.D., Ho, P., Franco, B.D.G.M., Vaz-Velho, M. (2009). Effect of medium composition on the production of bacteriocin ST216Ch a strain of *Lactobacillus plantarum* isolated from Portuguese Chouriço. *Higiene Alimentar*, 23. (170-171). 352-353. (ISSN 0101-9171).
15. Gal vez A, Abriouel H, Lucas López R, Ben Omar N. Bacteriocin-based strategies for food biopreserva-tion, *Int J Food Microbiol* 2007; 120: 51-70.

Referencias Bibliográficas

16. Todorov SD, Dicks LMT. Lactobacillus plantarum isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram negative bacteria, *Enz Microbial Tech* 2005;36:318-326.
17. Gyo Shin H, Min Choi Y, Kyoung Kim H, Chul Ryu Y, Hoon Lee S, Chul Kim B. Tenderization and fragmentation of myofibrillar proteins in bovine longissimus dorsi muscle using proteolytic extract from *Sarcodon aspratus*. *LWT* 2008; 41: 1389-1395.
18. Oliete B, Moreno T, Carballo JA, Monserrat L, Sanchez L. Estudio de la calidad de la carne de ternera de raza Rubia Gallega a lo largo de la maduración al vacío. *Arch Zootecnia* 2006; 55 (209): 3-14.
19. www.cm-mirandela.pt Consultado en 22 de Junio de 2012;
20. Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Vendeiro, S., Mota, M., Silva, F., Monteiro, M.J., Hogg, T., Gibbs, P. and Teixeira P. 2007b. Chemical and microbiological characterisation of "Salpicão de Vinhais" and "Chouriça de Vinhais": Traditional dry sausages produced in the North of Portugal. *Food Microbiology* 24, 618-623.
21. Lücke, F.K. 1974. Fermented sausages. In: *Microbiology of fermented foods*, B.J.B., Wood (Eds.), pp. 41-49. Applied Science Publishers, London, England.
22. Rantsiou, K., Drosinos, E., Gialitaki, M., Urso R., Krommer, J., Gasparik-Reichardt, J., Toth, S., Metaxopoulos, I., Comi, G. and Cocolin, L. 2005a. Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from natural fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology* 22, 19-28.
23. Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. and Comi, G. 2001a. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 5113-5121.
24. Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P., Cantoni, C. and Cocolin, L. 2005. Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Science*, 69, 381-392.
25. Lebert, I., Leroy, S., Giammarinaro, P., Lebert, A., Chacornac, J. P., Bover-Cid, S., Vidal-Carou, M.C. and Talon, R. 2007a. Diversity of microorganisms in environments and dry fermented sausages of French traditional small units. *Meat Science* 76, 112-122.
26. Esteves, A., Aymerich, T., Garriga, M., Patarata, L., Fontes, M.C. and Martins, C. 2006. Tracing *Salmonella* in Alheira processing plants. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1-10.
27. Esteves, A., Patarata, L., Aymerich, T., Garriga, M. and Martins, C. 2007. Multiple correspondence analysis and random amplified polymorphic DNA molecular typing to assess the sources of *Staphylococcus aureus* contamination in Alheira production lines. *Journal of Food Protection*, 70, 685-691.
28. Vaz-Velho, M. (2003). Smoked foods production. In: *Encyclopaedia of Food Sciences and Nutrition*, Benjamin Caballero, Luiz Trugo and Paul M. Finglas editors, 2nd edition. 5302-5309. Elsevier-Academic Press. (ISBN: 978-0-12-227055-0)
29. Freitas, A.C., Figueiredo, Paulo. (2000) *Conservação de Alimentos*, Capítulo 4, Inibidores de Alterações químicas e Biológicas. pag. 50-52
30. Official Journal of the European Union - Amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives, No 1129/2011 de 11 de Novembro de 2011. Pág. 114/295



http://pt.wikipedia.org/wiki/Vila_Rica

Fuente: *Gabinete de Comunicação e Imagem - IPVC*

MUCHAS GRACIAS