

LES ALTES PRESSIONS I LA BIOCONSERVACIÓ COM
A ESTRATÈGIES DE CONTROL DE LISTERIA
MONOCYTOGENES EN PRODUCTES CARNIS
LLESTOS PER AL CONSUM. ASSAJOS D'INOCULACIÓ
I MODELITZACIÓ MATEMÀTICA

Anna Hereu Soms

Dipòsit legal: Gi. 1857-2014
<http://hdl.handle.net/10803/283935>



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.ca>

Aquesta obra està subjecta a una llicència Creative Commons Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives licence

TESI DOCTORAL

**Les altes pressions i la bioconservació
com a estratègies de control de
Listeria monocytogenes en productes
carnis llestos per al consum**

Assajos d'inoculació i modelització matemàtica



ANNA HEREU SOMS
2014



TESI DOCTORAL

**Les altes pressions i la bioconservació com a estratègies de control de
Listeria monocytogenes en productes carnis llestos per al consum**

Assajos d'inoculació i modelització matemàtica

Anna Hereu Soms

2014

PROGRAMA DE DOCTORAT EN TECNOLOGIA

Dirigida per:

Dra. Teresa Aymerich Calvet i Dra. Sara Bover Cid

Tutora:

Dra. Dolors Parés Oliva

Memòria presentada per optar al títol de doctora per la Universitat de Girona

La Dra. Teresa Aymerich Calvet, directora del Subprograma de Seguretat Biòtica del centre IRTA de Monells i la Dra. Sara Bover Cid, investigadora del Programa de Seguretat Alimentària del centre IRTA de Monells,

CERTIFIQUEN:

Que aquest treball presentat per Anna Hereu Soms, per a l'obtenció del títol de doctora per la Universitat de Girona i que porta per títol "Les altes pressions i la bioconservació com a estratègies de control de *Listeria monocytogenes* en productes carnis llestos per al consum. Assajos d'inoculació i modelització matemàtica", ha estat realitzat sota la nostra direcció.

Dra. Teresa Aymerich Calvet

Dra. Sara Bover Cid

El treball que es presenta en aquesta memòria s'ha realitzat gràcies a la concessió d'una beca pre-doctoral del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) i s'integra en el marc dels projectes de recerca INIA RTA2007-00032 i MEC Consolider CDS2007-00016.

AGRAÏMENTS

Aviat farà 6 anys que vaig iniciar una nova etapa en la meua vida professional. Molts anys ja fa d'aquell primer dia a l'IRTA, espantada per no saber ben bé on em posava i per si estaria a l'alçada de les expectatives però, vés per on, si estic escrivint aquestes línies deu ser perquè al final me'n dec haver sortit prou bé!

Durant tot aquest temps he crescut moltíssim a nivell professional i encara més a nivell personal. He fet coses, amb més o menys èxit, que no hagués dit mai que faria, com viure durant 3 mesos a Copenhaguen o posar-me a parlar en anglès davant de més de 200 persones en un congrés a Istanbul. Però tot això no hagués estat possible sense l'ajuda de tota la gent que m'ha acompanyat en aquesta etapa: una "micro" família que m'ha fet sentir com a casa, uns companys (un més que els altres) amb els que he compartit hores i hores, i una família que ha estat al meu costat en tot moment. A tots vosaltres el meu més sincer agraïment.

A tu Sara, gràcies per tot!! Gràcies per la teua professionalitat, per la teua entrega i dedicació, per totes les hores que has estat amb mi, aprenent coses noves, ensenyant-me, ajudant-me, consolant-me, aguantant els meus mals de panxa, per la teua amistat, per tots els farts de riure... per tot, moltes gràcies!

A tu Teresa, moltes gràcies per la teua confiança, pel teu suport i pels teus valuosos comentaris.

A tu Margarita, moltes gràcies per deixar-me formar part d'aquest centre, d'aquest "micro" grup, gràcies per les converses que hem tingut i pels consells que m'has donat. Moltes gràcies per tot.

A en Paw Dalgaard pel seu temps, per deixar-me formar part del seu equip a la DTU durant uns mesos, per iniciar-me en la modelització matemàtica i per fer-me entrar al cap equacions impossibles.

A tu Dolors, moltes gràcies per tots aquests anys. Vas ser la primera que em vas parlar de les altes pressions i mira on estic! Gràcies per tot el suport acadèmic.

A tot els que com jo, formen o han format part de la Unitat de Microbiologia de l'IRTA de Monells: la Sandra, la Kathi, l'Anna, la Raquel, en Sergi, la Montse, la Carmen, la Yolanda, la Belén, i tot aquells i aquelles que han estat fent pràctiques amb nosaltres, a tots vosaltres moltes gràcies per ajudar-me amb els *shakings*, els mostrejos, les plaques... sé que després d'un bon croissant de xocolata tots treballeu amb ganes!

A tu Nico per ser una bona amiga, per estar sempre disposada a ajudar-me, per acompanyar-me en els meus primers passos en el món de la microbiologia. Grazie mille!

A la Marta, l'Eva, l'Albert i en Tiago per passar tantes hores amb mi a la polivalent.

A tots els treballadors de l'IRTA de Monells que de ben segur que m'han ajudat en algun moment.

A tota la gent que m'envolta, pel seu suport constant.

Al meus pares, sense l'ajuda dels quals segur que no hauria arribat fins aquí. A en Miquel i la Carme pel seu suport incondicional.

I a tu Joan, gràcies per tot! Pel teu suport en els bons i en els mals moments, per la teva comprensió, per ensenyar-me a veure i a beure les coses d'una altra manera, per descobrir-me un món nou, per permetre'm viure una experiència nòrdica... Gràcies!

A tots aquells que porteu temps preguntant-me quan acabaré la tesi... ara ja us puc respondre:

Molt aviat!

LLISTA D'ABREVIATURES¹

ACSA	Agència Catalana de Seguretat Alimentària	HHS	<i>Health and Human Services</i>
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición	HP	<i>High Pressure</i> (alta pressió)
Af	<i>Accuracy factor</i> (factor d'exactitud)	HPA	<i>Health Protection Agency</i>
AFSSA	<i>Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments</i>	ICEX	España Exportación e Inversores
ALOP	<i>Appropriate Level Of Protection</i> (nivell adequat de protecció)	ICMSF	<i>International Commission on Microbiological Specifications of Foods</i>
APPC	Anàlisi de Perills i Punts de Control Crítics	ILSI	<i>International Life Sciences Institute</i>
AU	<i>Arbitrary Units</i> (unitats arbitràries)	ISID	<i>International Society for Infectious Diseases</i>
a_w	Activitat d'aigua	IU	<i>International Units</i> (unitats internacionals)
Bf	<i>Bias factor</i> (factor de biaix)	LAB	<i>Lactic Acid Bacteria</i> (bacteris de l'àcid làctic)
BRC	<i>British Retail Consortium</i>	MAP	<i>Modified Atmosphere Packaging</i> (envasat en atmosfera modificada)
CAC	<i>Codex Alimentarius Commission</i>	MARM	Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>	MSC	Ministerio de Sanidad y Consumo
CFA	<i>Chilled Food Association</i>	MSPS	Ministerio de Sanidad y Política Social
CFU	<i>Colony Forming Units</i> (unitats formadores de colònies)	NZFSA	<i>New Zealand Food Safety Authority</i>
CPM	<i>Cardinal Parameter Model</i> (model de paràmetres cardinals)	PC	<i>Performance Criteria</i> (criteris de funcionament)
CRL	<i>Community Reference Laboratory for Listeria monocytogenes</i>	PO	<i>Performance Objective</i> (objectius de funcionament)
DFG	<i>Deutsche Forschungsgemeinschaft</i> (Fundació alemanya per a la recerca)	RASFF	<i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>	RD	Reial Decret
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	RTE	<i>Ready To Eat</i> (llest per al consum)
FSA	<i>Food Standards Agency</i>	SKLM	<i>Senatkommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln</i> (Comissió del Senat per a l'avaluació de la seguretat dels aliments)
FSAI	<i>Food Safety Authority of Ireland</i>	SSOP	<i>Sanitation Standard Operating Procedures</i> (procediments estàndard d'higienització)
FSANZ	<i>Food Standards Australia New Zealand</i>	USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
FSIS	<i>Food Safety and Inspection Service</i>	TIC	Tecnologies de la Informació i de la Comunicació
FSO	<i>Food Safety Objective</i> (objectiu de seguretat alimentària)	WTO	<i>World Trade Organization</i> (Organització Mundial del Comerç)
GRAS	<i>Generally Recognized As a Safe</i> (generalment reconegut com a segur)	µm	micròmetre
HHP	<i>High Hydrostatic Pressure</i> (alta pressió hidrostàtica)		

¹ Les abreviatures de paraules en anglès utilitzades en les publicacions que s'inclouen, es mantenen en aquest idioma al llarg del text per tal de no confondre termes i evitar usar-ne dues per a un mateix concepte. Tanmateix, en aquest llistat el seu significat es troba traduït entre parèntesi.

ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Esquema del procés d'elaboració del pernil curat. Adaptat i modificat de: Arnau (1993); Hernández i Huerta (1993); Arnau i Monfort (1998); Toldrà (2004, 2007); Bello Gutiérrez (2008) i Sánchez-Molinero i Arnau (2008).

Figura 2. Distribució dels valors d' a_w de mostres comercials (n=62) de pernil curat tallat a llenques i envasat al buit (Hereu, 2009).

Figura 3. Esquema del procés d'elaboració del pernil cuit. Adaptat i modificat de: López *et al.* (2001); Toldrà (2007) i Toldrà *et al.* (2010).

Figura 4. Procés d'elaboració de la mortadella. Adaptat i modificat de: Benito i Córdoba (2001) i Luzón i Martín Bejarano (2001).

Figura 5. Cèl·lules de *L. monocytogenes* CTC1010, CTC1011 i CTC1034 inoculades en pernil cuit. La mostra es va fixar amb glutaraldehid (2,5%) i solució tampó de cacodilat 0,1 M (pH 7,4) i es va deshidratar amb etanol. Microfotografia realitzada amb microscopi electrònic de rastreig (© Programa de Seguretat Alimentària, IRTA).

Figura 6. Fulletons informatius en relació a *L. monocytogenes* i el consum d'aliments en grups de risc publicats recentment per diferents autoritats competents en la matèria (ACSA, 2011; FSANZ, 2013).

Figura 7. Increment mundial en nombre d'equips de tractament per HP durant els últims anys i estimació de l'ús de la tecnologia en els diferents sectors de la indústria alimentària durant l'any 2012. Adaptat de Tonello (2012).

Figura 8. Representació esquemàtica del mode d'acció de la nisina sobre la paret cel·lular. Imatge reproduïda amb permís de l'autor (Wiedemann *et al.*, 2001).

Figura 9. Comportament de *L. monocytogenes* inoculada en pernil cuit formulat amb (■, □) o sense (●, ○) nisina (800 AU/g), emmagatzemat durant 90 dies a 1 °C (símbols buits) i 6 °C (símbols plens). Adaptat de Jofré *et al.* (2008).

Figura 10. Combinació d'obstacles en el procés de producció del pernil cuit. Adaptat de FSAI (2005).

Figura 11. Arbre de decisió d'aplicació dels criteris microbiològics i per a la determinació de la vida útil segura d'un aliment RTE. Adaptat de: CFA / BRC (2006) i FSAI (2011).

Figura 12. Models genèrics d'inactivació microbiana i la seva fórmula matemàtica: a) lineal/log-lineal, b) Weibull còncav amb *tail*, c) Weibull convex amb *shoulder* i d) models log-lineal amb *shoulder* i *tail* (Geeraerd *et al.*, 2005).

Figura 13. Corba típica de creixement de les poblacions microbianes en cultius tancats.

Figura 14. Representació gràfica i fórmula matemàtica d'alguns models primaris que permeten descriure el creixement de microorganismes (Dalgaard *et al.* 1994; McKellar i Lu, 2004).

Figura 15. Comportament de *L. monocytogenes* inoculada en diferents productes carnis RTE que no han rebut l'aplicació de les tecnologies de conservació estudiades en aquesta tesi. Les dades corresponen als resultats dels lots control dels assajos publicats a l'Article 1 (productes curats) i a l'Article 3 (productes cuits).

Figura 16. Reduccions logarítmiques, $\text{Log}(N/N_0)$, observades en els recomptes de *L. monocytogenes* (inoculada en diferents productes carnis RTE, segons el seu estat fisiològic i el nivell d'inòcul utilitzat) després de l'aplicació del tractament per HP.

Figura 17. Representació gràfica de les reduccions logarítmiques, $\text{Log}(N/N_0)$, observades per *L. monocytogenes* inoculada en productes carnis RTE tractats per HP (600 MPa durant 5 min) en funció de la seva activitat d'aigua (a_w). Resultats dels Articles 1 i 2.

Figura 18. Representació gràfica de les reduccions logarítmiques observades en productes carnis RTE tractats per HP (600 MPa durant 5 min) en funció del seu contingut en greix (%). Resultats dels Articles 1 i 2.

Figura 19. Representació gràfica tipus diagrama de caixes* (box plot) de les reduccions logarítmiques de *L. monocytogenes* aconseguïdes en dos tipus diferents de pernil curat, tractats per HP (600 MPa, 5 min, 15 °C) (caixes blanques) o sense tractar (caixes grises), en combinació o no amb nisina (200 AU/cm²) aplicada directament sobre la superfície de la llenca o mitjançant films de PVOH.*Les barres d'error indiquen els valors mínims i màxims (n=5, per mostres pressuritzades i n=4 per mostres no pressuritzades), les línies horitzontals els valors de les medianes i les caixes els valors entre el primer i el tercer quartil. Els asteriscs indiquen els valors atípics.

Figura 20. Grau d'inactivació de *L. monocytogenes* en pernil curat tractat per HP a 600 MPa durant 5 min (Article 1) en relació al criteri de funcionament (PC = -2,39D) compatible amb la tolerància zero (FSO = -1,39 log CFU/g) aplicable als productes carnis curats RTE (Hoz *et al.*, 2008). N-: sense nisina; ND: amb presència de nisina aplicada directament (200 AU/cm²); NF: amb presència de nisina aplicada mitjançant envasat actiu (films de PVOH amb 200 AU/cm²).

Figura 21. Grau d'inactivació absolut en les mostres de pernil cuit i mortadel·la tractades per HP a 400 MPa durant 5 min (Article 3), en relació al criteri de funcionament (PC = -4D) aplicable als productes carnis cuïts RTE, recomanat per la AESAN per complir amb l'FSO de 100 cèl·lules/g (Ordóñez Pereda *et al.*, 2004).

Figura 22. Diagrama d'isoreducció (per assolir PC= -4D i -5D) resultant dels models predictius desenvolupats a l'Article 2 sobre la inactivació per HP de *L. monocytogenes* en pernil cuit i mortadel·la.

Figura 23. Comportament de *L. monocytogenes* inoculada en productes carnis RTE tractats per HP durant l'emmagatzematge en refrigeració (8 °C). Les mostres dels pernills curats es van inocular amb *L. monocytogenes* crescuda en condicions òptimes (37 °C) i es van pressuritzar a 600 MPa durant 5 min (Article 1). Les mostres de pernil cuit i mortadel·la es van inocular amb *L. monocytogenes* prèviament congelada (-80 °C), i es van tractar a 400 MPa durant 5 min (Article 3). Els punts indiquen la mitjana dels valors observats i les barres d'error la desviació estàndard. Les línies corresponen a un ajust lineal pels productes curats i a un ajust al model logístic de creixement pels productes cuïts.

Figura 24. Efecte del tractament per HP (600 MPa durant 5 min) en el recompte de *L. monocytogenes* durant l'emmagatzematge en refrigeració a 8 °C del pernil curat de porc blanc (taronja) i en pernil curat de porc ibèric (vermell). Els ajustos lineals es mostren com les línies contínues pels lots pressuritzats i les discontinües pels lots sense pressuritzar. Els punts indiquen la mitjana dels valors observats i les barres d'error la desviació estàndard. Resultats de l'Article 1.

Figura 25. Efecte del tractament per HP (600 MPa, 5 min) i nisina, aplicada a raó de 200 AU/cm² directament sobre la superfície de les llenques (A) o mitjançant envasat actiu de films de PVOH (B), en els recomptes de *L. monocytogenes* durant l'emmagatzematge a 8 °C del pernil curat de porc blanc (taronja) i en pernil curat ibèric (vermell). Les línies contínues corresponen als lots control sense pressuritzar i les discontinúes als lots pressuritzats. Resultats de l'Article 1.

Figura 26. Simulació del creixement de *L. monocytogenes* durant l'emmagatzematge en refrigeració del pernil cuit (lila) i en mortadella (verd) segons el model matemàtic desenvolupat a l'Article 3. La línia contínua correspon al creixement del patogen prèviament congelat a -80 °C i la discontinú a l'adaptat a 8 °C abans del tractament d'HP. N_c correspon al nivell de contaminació del patogen ($\sim 10^4$ CFU/g) abans del tractament d'HP (400 MPa durant 5 min), i el nivell inicial de patogen (*i.e.* N_0) de la corba de creixement correspon al nivell observat a cadascun dels assajos realitzats després del tractament per HP.

ÍNDEX DE TAULES

Taula 1. Alguns dels microorganismes associats al pernil curat.

Taula 2. Exemples de formulacions de salmorra injectada al 20% en pernills cuits sense fosfats (A) i amb fosfats (B). Adaptat de Luzón i Martín Bejarano (2001).

Taula 3. Alguns dels microorganismes associats als productes carnis cuits.

Taula 4. Brots de listeriosi associats a la ingesta de productes carnis entre els anys 2000 i 2013 recollits a la literatura. Garrido *et al.* (2010), ISID (2013), Fairfax New Zealand Limited (2012) i Ministry for Primary Industries of New Zealand (2012a).

Taula 5. Prevalença de *L. monocytogenes* en productes carnis RTE del circuit comercial.

Taula 6. Descripció dels conceptes que conformen el sistema de mesura de la seguretat microbiològica dels aliments basat en l'anàlisi de riscos (WTO, 1995; ICMSF, 2002; CAC, 2010).

Taula 7. Criteris microbiològics proposats per la Comissió del Codex Alimentarius en relació a *L. monocytogenes* en productes RTE (CAC, 2009).

Taula 8. Criteris microbiològics de seguretat aplicables a la Unió Europea en relació a *L. monocytogenes* en productes RTE segons el Reglament Europeu 2073/2005 (European Commission, 2005).

Taula 9. Criteris microbiològics en relació a *L. monocytogenes* en productes RTE al Canadà (Health Canada, 2011).

Taula 10. Criteris microbiològics aplicables als productes RTE en relació a *L. monocytogenes* a Austràlia i a Nova Zelanda (FSANZ, 2000).

Taula 11. Criteris microbiològics aplicables als aliments RTE en relació a *L. monocytogenes* a Hong Kong (Centre for Food Safety-Hong Kong, 2007).

Taula 12. Recull d'informació bibliogràfica sobre l'efecte de les altes pressions en *L. monocytogenes* en productes carnis RTE, en termes de reducció immediata i comportament durant el posterior emmagatzematge en refrigeració mitjançant assajos d'inoculació (*challenge tests*).

Taula 13. Empreses del sector carni a nivell mundial que utilitzen les altes pressions. Adaptat de Jung *et al.* (2011).

Taula 14. Percentatge de presència/absència de *L. monocytogenes* en mostres de salsitxes cuites tractades per HP (600 MPa a 28 °C durant 5 min) i/o en combinació amb nisina (100 IU/g) (Chung *et al.*, 2005).

Taula 15. Sistemes predictius de creixement, supervivència i inactivació de *L. monocytogenes* disponibles i de lliure accés.

Taula 16. Factors i valors o interval de valors utilitzats per realitzar els assajos continguts en cadascun dels articles que es presenten en aquesta tesi.

Taula 17. Anàlisis fisicoquímics i microbiològics i estadístics aplicats a cadascun dels articles que es presenten en aquesta tesi.

Taula 18. Estimació del temps necessari per assolir 100 CFU/g de *L. monocytogenes*, en funció de la temperatura de refrigeració i la concentració inicial del patogen, segons els resultats obtinguts sobre el creixement del patogen en productes carnis cuits RTE envasats al buit (Article 3).

Taula 19. Predicció de la velocitat de creixement de *L. monocytogenes* mitjançant diverses eines i models predictius de creixement del patogen, i càlcul del temps necessari per assolir 100 CFU/g en funció de la temperatura de conservació.

Taula 20. Promig de les reduccions logarítmiques de *L. monocytogenes* observades segons el tractament aplicat en els diferents tipus de pernil curat RTE.

Taula 21. Estimació del temps necessari per incrementar 100 vegades els nivells de *L. monocytogenes* en pernil cuit i mortadella tractats per HP (400 MPa durant 5 min) en funció de la temperatura de refrigeració i de l'estat fisiològic del patogen (congelat a -80°C o adaptat al fred, 8°C), segons les prediccions dels models matemàtics obtinguts a l'Article 3.

ÍNDIX

RESUM	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
LLISTA DE PUBLICACIONS	7
JUSTIFICACIÓ	9
1 INTRODUCCIÓ: REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA	11
1.1 Productes carnis llestos per al consum	13
1.1.1 Productes carnis RTE crus – curats	13
1.1.2 Productes carnis RTE cuits	17
1.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	21
1.2.1 Característiques i ecologia	22
1.2.2 Listeriosi	22
1.2.3 <i>L. monocytogenes</i> en productes carnis	24
1.3 Gestió del risc de <i>L. monocytogenes</i> en productes RTE	25
1.3.1 Marc actual de l'avaluació i gestió de la seguretat microbiològica dels aliments	26
1.3.2 Mesures de gestió del risc associat a <i>L. monocytogenes</i>	27
1.4 Tecnologies de conservació emergents	34
1.4.1 Altes pressions	34
1.4.2 Bioconservació	41
1.4.3 Envasat actiu	43
1.4.4 Tecnologia de barreres	44
1.5 Eines per avaluar la seguretat microbiològica durant la vida útil dels aliments RTE	46
1.5.1 Caracterització del producte, revisió bibliogràfica i històric de dades	47
1.5.2 Microbiologia predictiva	48
1.5.3 Assajos de laboratori	55
1.6 Bibliografia	58
2 OBJECTIUS	71
3 METODOLOGIA	75
3.1 Disseny experimental i factors d'estudi	77
3.2 Determinacions analítiques i tractament de dades	78

4	RESULTATS: PUBLICACIONS	79
4.1	Article 1: High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for <i>Listeria monocytogenes</i>	81
4.2	Article 2: Modeling the high pressure inactivation kinetics of <i>Listeria monocytogenes</i> on RTE cooked meat products	89
4.3	Article 3: Analysing and modelling the growth behaviour of <i>Listeria monocytogenes</i> on RTE cooked meat products after a high pressure treatment at 400 MPa	103
5	DISCUSSIÓ DE RESULTATS	141
5.1	Comportament de <i>L. monocytogenes</i> en productes carnis RTE	143
5.2	Efecte listericida immediat dels tractaments per altes pressions aplicats a productes carnis RTE	146
5.2.1	Influència de l'estat fisiològic de <i>L. monocytogenes</i>	146
5.2.2	Influència de les característiques del producte	148
5.2.3	Aplicació dels resultats en la gestió del risc de <i>L. monocytogenes</i> en productes carnis RTE	153
5.3	Comportament de <i>L. monocytogenes</i> en productes carnis RTE sotmesos a tractaments per altes pressions i/o amb aplicació de nisina, durant l'emmagatzematge en refrigeració	157
5.3.1	Comportament de <i>L. monocytogenes</i> en productes carnis curats RTE tractats per HP	158
5.3.2	Comportament de <i>L. monocytogenes</i> en productes cuits RTE tractats per HP	161
5.4	Bibliografia	167
6	CONCLUSIONS I PERSPECTIVES DE FUTUR.....	171

RESUM

El treball de tesi doctoral que es presenta tracta l'estudi i l'avaluació de l'efecte de tecnologies emergents de conservació, com els tractaments per altes pressions (*high pressure*, HP) i la bioconservació amb nisina, en el comportament de *Listeria monocytogenes* en productes carnis curats i cuits llestos per al consum (*ready-to-eat*, RTE).

Per a tal fi es van dissenyar i realitzar diversos assajos d'inoculació (*challenge test*) de *L. monocytogenes* en productes carnis RTE (tallats a llenques i envasats al buit) amb diferents característiques: productes curats (pernil curat amb diferent a_w) i cuits (amb diferent contingut en greix). Es van aplicar tractaments d'HP d'intensitat i durada determinada segons l'assaig. En el cas de productes curats, les HP es van combinar amb l'aplicació de nisina, directament sobre la superfície de les llenques o formant part de films separadors de llenques (envasat actiu). En el cas dels productes cuits, a més del factor producte, es va estudiar la influència del nivell d'inòcul i de l'estat fisiològic de *L. monocytogenes*. Es va quantificar l'efecte immediat de les HP en els nivells de *L. monocytogenes* i es va fer el seguiment del comportament del patogen al llarg de l'emmagatzematge en refrigeració, entre 4 i 12 °C segons l'assaig.

En les diferents tipologies de productes estudiats, l'aplicació de tractaments d'HP va mostrar un efecte listericida, la magnitud del qual va dependre no només dels paràmetres propis del tractament (pressió i temps), sinó també de factors com les característiques dels productes i de l'estat fisiològic de *L. monocytogenes* previ al tractament. Aquests factors van condicionar també el comportament del patogen durant l'emmagatzematge en refrigeració dels productes carnis RTE estudiats, fent palesa la necessitat d'estudiar i validar aquestes tecnologies mitjançant procediments orientats a producte.

L' a_w del producte va ser un factor determinant del grau d'inactivació de *L. monocytogenes*, observant un efecte piezoprotector. En condicions d' a_w bacteriostàtiques, pròpies dels productes carnis curats, la supervivència de *L. monocytogenes* va ser superior a valors d' a_w menors. En productes carnis curats RTE amb una a_w més alta, el tractament de 600 MPa/5min va aconseguir nivells de reducció compatibles amb l'Objectiu de Seguretat Alimentària (FSO) associat a les polítiques de "tolerància zero" en relació a *L. monocytogenes*. En canvi, en productes amb baixa o molt baixa a_w va ser necessària la combinació d'HP amb altres tecnologies com la bioconservació (e.g. aplicació de nisina) per assolir els estàndards de seguretat alimentària equivalents. L'aplicació combinada d'aquests tractaments amplia el marge de seguretat en la minimització i el control de *L. monocytogenes* durant l'emmagatzematge dels productes carnis curats RTE.

En productes carnis cuits RTE, el comportament de *L. monocytogenes* front als tractaments d'HP, en termes de cinètica d'inactivació i creixement posterior, es va veure influenciat pel contingut en greix del producte. La velocitat d'inactivació va ser menor i el temps de latència lleugerament més llarg en mortadella (producte greixós) que en pernil cuit (producte magre). L'estat fisiològic del patogen previ al tractament d'HP va tenir un fort impacte en l'efectivitat del tractament a 400 MPa/5 min, ja que el grau d'inactivació de les cèl·lules prèviament adaptades al fred (crescudes a 8 °C) va ser considerablement major que el de les cèl·lules prèviament sotmeses a un estrès per congelació (-80 °C). Per altra banda, després del tractament, les cèl·lules prèviament adaptades al fred van créixer sense o amb una latència més curta que les cèl·lules prèviament congelades.

Mitjançant els procediments de modelització aplicats, es van obtenir i validar models matemàtics d'inactivació per HP de *L. monocytogenes* en productes carnis cuits RTE que permeten estimar acuradament les condicions de pressió i temps de tractament necessàries per assolir un determinat criteri de funcionament (e.g. 4 o 5 logs de reducció). Els models matemàtics de creixement del patogen desenvolupats permeten quantificar l'impacte de l'aplicació d'un tractament d'HP en la vida útil segura en refrigeració dels productes carnis cuits RTE. Les simulacions realitzades amb els models constaten els beneficis de l'aplicació de les HP en productes carnis cuits, ja que en comparació amb els productes sense pressuritzar, el tractament de 400 MPa/5 min aconsegueix allargar de l'ordre de 10 vegades el temps necessari per incrementar 2 logs (*time to 2 log increase*) els nivells de contaminació de *L. monocytogenes*.

El treball de tesi doctoral aporta nous coneixements que, en últim terme, contribuiran a minimitzar el risc associat a la presència i creixement de *L. monocytogenes* i, per tant, a millorar la seguretat alimentària dels productes carnis RTE.

RESUMEN

El presente trabajo de tesis doctoral trata el estudio y la evaluación de los efectos de tecnologías emergentes de conservación, tales como los tratamientos por altas presiones (*high pressure*, HP) y la bioconservación con nisina, en el comportamiento de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos curados y cocidos listos para el consumo (*ready-to-eat*, RTE).

Para tal fin se diseñaron y realizaron diferentes ensayos de inoculación (*challenge test*) de *L. monocytogenes* en productos cárnicos RTE (loncheados y envasados al vacío) con diferentes características: productos curados (jamón curado con diferente a_w) y cocidos (con diferente contenido en grasa). Se aplicaron tratamientos de intensidad y tiempo determinados según cada ensayo. En productos curados, las HP se combinaron con la aplicación de nisina, directamente sobre la superficie de la loncha o mediante films separadores de lonchas (envasado activo). En productos cocidos, además del factor producto, se estudió la influencia del nivel de inóculo y del estado fisiológico de *L. monocytogenes*. Se cuantificó el efecto inmediato de las HP en los niveles de *L. monocytogenes* y se realizó el seguimiento del comportamiento del patógeno durante el almacenamiento en refrigeración, entre 4 y 12 °C según el ensayo.

En las diferentes tipologías de productos estudiados, la aplicación de tratamientos HP mostró un efecto listericida, la magnitud del cual dependió no sólo de los parámetros propios del tratamiento (presión y tiempo), sino también de otros factores como las características del producto y el estado fisiológico de *L. monocytogenes* previo al tratamiento. Estos factores también condicionaron el comportamiento del patógeno durante el almacenamiento en refrigeración de los productos cárnicos RTE estudiados, evidenciando la necesidad de estudiar y validar estas tecnologías mediante procedimientos orientados a producto.

La a_w del producto resultó ser un factor determinante en el grado de inactivación de *L. monocytogenes*, observándose un efecto piezoprotector. En condiciones de a_w bacteriostáticas, propias de los productos cárnicos curados, la supervivencia de *L. monocytogenes* fue superior a valores de a_w menores. En productos cárnicos curados RTE con una a_w más alta, el tratamiento de 600 MPa/5 min alcanzó niveles de reducción compatibles con los Objetivos de Seguridad Alimentaria (FSO) asociados a las políticas de "tolerancia cero" en relación a *L. monocytogenes*. Contrariamente, en productos con una baja o muy baja a_w fue necesaria la combinación de las HP con otras tecnologías como la bioconservación (*e.g.* aplicación de nisina) para alcanzar los estándares de seguridad alimentaria equivalentes. La aplicación combinada de estos tratamientos amplía el margen de seguridad en la minimización y el control de *L. monocytogenes* durante el almacenamiento de los productos cárnicos curados RTE.

En productos cárnicos cocidos RTE, el comportamiento de *L. monocytogenes* frente a tratamientos por HP, en términos de cinética de inactivación y posterior crecimiento, estuvo influenciado por el contenido en grasa del producto. La velocidad de inactivación fue menor y la fase de latencia ligeramente más larga en mortadela (producto grasoso) que en jamón cocido (producto magro). El estado fisiológico previo al tratamiento por HP tuvo un gran impacto en la efectividad del tratamiento a 400 MPa/5 min, ya que el grado de inactivación de las células adaptadas previamente al frío (crecimiento a 8 °C) fue considerablemente mayor que el de las células sometidas previamente

a un estrés por congelación (-80 °C). Por otro lado, después del tratamiento, las células previamente adaptadas al frío crecieron sin o con una latencia más corta que las células previamente congeladas.

Mediante los procedimientos de modelización aplicados, se obtuvieron y validaron modelos matemáticos de inactivación por HP de *L. monocytogenes* en productos cárnicos cocidos RTE que permiten estimar adecuadamente las condiciones de presión y tiempo de tratamiento necesarias para alcanzar un criterio de funcionamiento determinado (e.g. 4 o 5 logs de reducción). Los modelos matemáticos de crecimiento del patógeno desarrollados permiten cuantificar el impacto de la aplicación de un tratamiento de HP en la vida útil segura en refrigeración de los productos cárnicos cocidos RTE. Las simulaciones realizadas con los modelos demuestran los beneficios de la aplicación de las HP en productos cárnicos cocidos, ya que en comparación con los productos sin presurizar, el tratamiento a 400 MPa/5 min consigue extender del orden de 10 veces el tiempo necesario para incrementar 2 logs (*time to 2 log increase*) los niveles de contaminación de *L. monocytogenes*.

El trabajo de tesis doctoral aporta nuevos conocimientos, que en definitiva contribuirán a minimizar el riesgo asociado a la presencia y el crecimiento de *L. monocytogenes* y, en consecuencia, a mejorar la seguridad alimentaria de los productos cárnicos RTE.

ABSTRACT

The present doctoral dissertation deals with the study and evaluation of the effect of preservation technologies, such as high pressure (HP) treatments and biopreservation with nisin, on the behavior of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) cured and cooked meat products.

Several challenge test were designed and performed inoculating *L. monocytogenes* onto RTE sliced and vacuum-packaged meat products with different characteristics: cured meat products (cured ham with different a_w values) and cooked meat products (with different fat content). HP treatments of different intensity and length were applied depending on the experiment. For cured meat products, an HP treatment was combined with nisin applied directly on the product surface or through interleavers (*i.e.* active packaging). The effectiveness of HP treatments was assessed in cooked meat products, depending on the product influence and also on the inoculum level and the physiological state of *L. monocytogenes*. Besides quantifying the immediate HP-inactivation of *L. monocytogenes*, the pathogen behavior after HP and during the refrigerated storage (between 4 and 12 °C) was also characterised.

HP treatments had a listericidal effect in both types of products, the magnitude of which was dependent on the treatment parameters (pressure and time) but also on other factors such as, the product characteristics and the physiological state of *L. monocytogenes* previous HP treatment. These factors influenced also the behavior of the pathogen during the refrigerated storage of RTE meat products studied, reinforcing the need to study and validate this technology through a product-oriented approach.

The a_w value was decisive on the *L. monocytogenes* HP-inactivation extent and a piezoprotection effect was observed. At the a_w bacteriostatic conditions typical from cured meat products, the pathogen survival was higher at lower a_w . In RTE cured meat products with a higher a_w , the 600 MPa/5min treatment achieved inactivation values to meet the Food Safety Objective associated with the “zero tolerance” policy. In contrast, in low a_w products the combination of HP treatment with nisin was necessary to achieve similar safety standards. Application of these combined hurdles provide a wider margin of safety in controlling *L. monocytogenes* during the refrigerated storage of RTE cured meat products.

The behavior of *L. monocytogenes* on pressurized RTE cooked meat products, in terms of inactivation kinetics and further growth, was highly influenced by the fat content of the product. The inactivation rate was lower and lag time slightly longer for mortadella (fatty product) than for cooked ham (lean product). The physiological state of the pathogen prior to the pressurization had an strong effect on the HP effectiveness: compared with cold-adapted cells (growth at 8 °C) the freeze-stressed cells (stored at -80 °C) were more pressure-resistant and showed a longer lag phase during the storage after HP treatment.

With the applied modeling procedures validated HP-inactivation models for *L. monocytogenes* in RTE cooked meat products were obtained, which allow an appropriate estimation of the HP conditions to meet a given performance criterion (*e.g.* 4 or 5 log reductions). The obtained growth models for *L. monocytogenes* allow to quantitatively characterize the effect of an HP treatment on the refrigerated safe shelf-life of RTE cooked meat products. Simulations made with the developed models demonstrate the benefit of HP application in RTE cooked meat products. In comparison with

non-pressurised products, a treatment of 400 MPa/5 min enables to extend by *ca.* 10-fold the time to 2 log increase the contamination level of *L. monocytogenes*.

The doctoral dissertation provides new insights that will ultimately support to minimize the risk associated with the occurrence and growth of *L. monocytogenes* and, therefore, to improve the food safety of RTE meat products.

LLISTA DE PUBLICACIONS

Aquesta tesi doctoral es presenta com a compendi de les publicacions següents:

Article 1

Hereu, A., Bover-Cid, S., Garriga, M. i Aymerich, T. (2012) High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 154(3), 107-112.

Índex de qualitat de la revista d'acord amb JCR 2012:

Índex d'impacte: 3,425

8/124 (1er quartil) a la categoria de Food Science & Technology.

Article 2

Hereu, A., Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, T. i Bover-Cid, S. (2012) Modeling the high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products. Innovative Food Science and Emerging Technologies 16, 305-315.

Índex de qualitat de la revista d'acord amb JCR 2012:

Índex d'impacte: 2,528

23/124 (1er quartil) a la categoria de Food Science & Technology.

Article 3

Hereu, A., Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, T. i Bover-Cid, S. (2014) Analysing and modelling the growth behavior of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products after a high pressure treatment at 400 MPa. International Journal of Food Microbiology (revisió enviada el 9 d'abril de 2014).

Índex de qualitat de la revista d'acord amb JCR 2012:

Índex d'impacte: 3,425

8/124 (1er quartil) a la categoria de Food Science & Technology.

JUSTIFICACIÓ

La facilitat d'ús i la conveniència dels **aliments llestos per al consum** (RTE) ha fet augmentar molt la seva demanda en els últims anys. Actualment, l'oferta de mercat d'aquest tipus de productes és molt àmplia, des de les amanides i vegetals nets i tallats, fins a salses envasades com l'*hummus*, passant per una gran varietat de **productes carnis**, de la pesca i làctics. En conseqüència, gran part de les indústries del sector alimentari han d'adequar els seus processos de producció, entre altres raons, per tal de minimitzar el **risc microbiològic** associat a l'elaboració d'aquest tipus de productes, ja que aquests es consumeixen directament sense necessitat d'aplicar cocció, ni qualsevol altre tipus de transformació efectiva per tal d'eliminar o reduir els microorganismes perillosos a un nivell acceptable.

D'entre els possibles microorganismes contaminants, *Listeria monocytogenes* és un dels patògens més rellevants dels productes RTE, i sobretot en aquells que requereixen ser conservats en refrigeració i tenen una vida útil prolongada. En el cas concret dels productes carnis RTE, la contaminació per aquest patògen sol donar-se durant el procés de tallat i envasat. Les característiques fisicoquímiques de molts d'aquests productes i el caràcter psicotolerant de *L. monocytogenes* constitueixen factors que afavoreixen la proliferació del patògen que, en el cas d'assolir nivells no acceptables, suposen un risc per a la salut del consumidor. El consum d'aliments contaminats amb *L. monocytogenes* pot causar listeriosi, un trastorn relativament poc freqüent però amb conseqüències molt greus (e.g. taxa de mortalitat de l'ordre del 10 al 30%), especialment en grups de risc com gent gran, nens, dones embarassades i individus immunodeprimits.

Aquestes dades han fet reaccionar governs i indústries, els quals des de fa anys centren esforços en minimitzar sinó eliminar el risc d'aquest patògen en aquest tipus de productes. D'una banda, els governs estableixen plans i mesures de gestió del risc, incloent l'establiment de criteris microbiològics, pel que fa a la presència de *L. monocytogenes* en els productes RTE. El nivell de tolerància sobre la presència d'aquest patògen en productes RTE varia en funció del territori, existint posicions restrictives (tolerància zero) en llocs com els Estats Units i Japó, o més permissives fixant nivells de tolerància basats en el risc segons el segment de la població a qui van dirigits i en funció del tipus de producte (e.g. permet o no permet el creixement de *L. monocytogenes*).

D'altra banda, la indústria i els establiments elaboradors han d'aplicar **mesures preventives** per controlar el risc associat a *L. monocytogenes* en els productes RTE que comercialitzen. Les mesures de control, a més de minimitzar les fonts de contaminació, també s'orienten a reduir els nivells del patògen i/o limitar-ne el creixement durant la vida útil dels productes RTE. Entre les mesures de control s'inclou la implementació de **tecnologies de conservació emergents**. Algunes de les tecnologies més prometedores en productes RTE d'origen carni són els tractaments per **altes pressions** (HP) i l'ús de substàncies antimicrobianes, com les **bacteriocines**. Aquestes tecnologies en combinació amb altres paràmetres del producte, com la composició o l'envasat, actuen d'obstacles pel desenvolupament i supervivència del patògen. Tanmateix, la implementació comercial d'aquestes tecnologies requereix no només d'un coneixement ampli dels efectes que provoquen en els microorganismes, sinó també de l'estudi de l'efecte que tenen en els productes concrets.

És precisament en aquest àmbit on s'emmarca el treball de recerca de la tesi doctoral que es presenta. Concretament, es pretén ampliar el coneixement de l'efecte de tecnologies com les HP i la bioconservació vers el comportament de *L. monocytogenes* en productes carnis RTE. En definitiva,

amb els resultats obtinguts es pretén proporcionar informació científica i eines que, en últim terme, permetin millorar la gestió del risc en aquest tipus de productes.

Des de la perspectiva metodològica, l'estudi i la determinació quantitativa de l'efecte de les tecnologies de conservació, com són els tractaments per HP i/o en combinació amb l'aplicació de bacteriocines en el comportament de *L. monocytogenes* durant la vida útil dels aliments, es poden realitzar mitjançant diferents procediments. Mitjançant els **assajos d'inoculació o challenge tests**, el producte concret es contamina deliberadament amb el microorganisme d'interès i es monitoritzen els seus nivells durant la vida útil prevista sota unes condicions determinades (e.g. de temps i temperatura). Aquest tipus d'assaigs són els que tradicionalment s'han utilitzat a la majoria dels estudis disponibles a la literatura científica, en productes amb característiques, condicions de processat i emmagatzematge molt concretes. Els resultats obtinguts però, tot i mostrar l'efectivitat de les tecnologies aplicades, són poc versàtils en el sentit que són difícilment extrapolables a altres productes, tractaments i/o condicions de conservació. Amb l'objectiu de vèncer aquesta limitació i ampliar l'aplicabilitat dels resultats dels estudis, cada vegada és més freqüent el desenvolupament i ús d'eines de **microbiologia predictiva**, ja sigui mitjançant la validació i aplicació de models pre-existents o la modelització matemàtica de resultats experimentals obtinguts per a un interval i combinació de condicions relativament ampli, representatiu de les condicions raonablement previsible de producte, processat i conservació.

En els treballs que es recullen a la present tesi doctoral s'ha utilitzat la combinació dels dos procediments citats, fonamentalment mitjançant un enfocament orientat a producte. En el cas particular de la modelització matemàtica de resultats obtinguts en producte, a diferència dels generats en medis de laboratori, aquest és un camp relativament poc explotat en relació a les tecnologies de conservació emergents, probablement degut a la necessitat d'instal·lacions apropiades, gran volum d'assajos, temps i coneixements en modelització matemàtica.

Els estudis inclosos en aquesta tesi formen part de projectes de recerca desenvolupats pel **Programa de Seguretat Alimentària** de l'IRTA de Monells (INIA RTA2007-00032 i MEC Consolider CDS2007-00016) i s'emmarquen en la línia d'investigació emergent sobre microbiologia predictiva i avaluació de riscos microbiològics del grup de recerca on s'ha integrat la tesi doctoral. El treball present, a més a més, s'ha pogut realitzar gràcies a la **beca predoctoral** del Subprograma de Formació de Personal Investigador en Formació (FPI-INIA), en el marc del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica 2008-2011. En el marc de la citada beca es va realitzar una **estada predoctoral** a la Danmarks Tekniske Universitet (DTU, Dinamarca), que va permetre iniciar la col·laboració amb el grup de recerca *Prædiktiv Mikrobiologi* principalment entorn a la modelització de les dades obtingudes.

Per a la presentació d'aquest treball de Tesi Doctoral, s'ha elaborat la present **memòria** estructurada en 6 seccions. La **introducció** inclou una revisió bibliogràfica sobre la temàtica i, que complementa la present justificació sobre l'interès de la recerca portada a terme. Segueix amb una descripció dels **objectius** del treball. A la secció de **metodologia**, s'inclou un esquema-resum que aporta una visió global dels procediments aplicats, ja que l'explicació detallada es troba en cadascun dels articles publicats i recollits a la secció de **resultats**. Finalment, la memòria es complementa amb una **discussió general** dels resultats obtinguts i es presenten les principals **conclusions**.

1 INTRODUCCIÓ: REVISIÓ BIBLIOGRÀFICA

1.1 Productes carnis llestos per al consum

El canvi d'hàbits de consum de la població, que s'ha produït en els últims anys, s'ha traduït amb una demanda creixent d'aliments de "conveniència", és a dir, productes que requereixen de poca o cap preparació abans de poder ser consumits (*e.g.* llestos per al consum; RTE, de l'anglès *ready to eat*), de vida útil prolongada i mínimament processats (*e.g.* frescos, sense additius, etc.). En resposta a aquesta demanda, avui dia, aquest tipus de productes ja són una línia de producció consolidada a les principals indústries càrnies. Els productes carnis RTE es presenten normalment preparats en llenques i envasats individualment o en poca quantitat i s'exposen als lineals refrigerats dels establiments comercials. En l'àmbit espanyol, algunes d'aquestes indústries hi dediquen més d'un 12% de la seva quota de fabricació, i més del 33% del mercat d'elaborats carnis espanyol correspon a productes RTE (Verde, 2012).

L'elaboració d'aquest tipus de productes suposa un repte per a la seva seguretat microbiològica, ja que requereix de l'aplicació d'operacions post-processat com el trossejat, la dosificació i l'envasat, entre altres, que suposen un risc real de contaminació creuada per microorganismes alterants i patògens, procedents de l'entorn, les eines i els manipuladors (Patterson *et al.*, 2010).

La majoria d'aquests productes s'envasen al buit o en atmosfera modificada (MAP, de l'anglès *modified atmosphere packaging*) per tal d'allargar-ne la vida útil i s'han de conservar en refrigeració fins al moment del seu consum. Però tot i que l'envasat al buit i en MAP restringeixen la capacitat de creixement de certs microorganismes alterants, aquestes condicions en alguns productes, permeten el creixement d'altres microorganismes, inclosos alguns patògens com per exemple *L. monocytogenes* (vegeu apartat 1.2).

Des d'un punt de vista legal, un **producte llest per al consum** es defineix segons el Reglament Europeu 2073/2005 (European Commission, 2005), com l'aliment destinat al consum humà directe, sense necessitat d'aplicar-li cocció ni qualsevol altre tipus de transformació efectiva per tal d'eliminar o reduir els microorganismes perillosos a un nivell acceptable.

En el marc de la tesi doctoral que es presenta, s'han estudiat dos tipologies de productes carnis que habitualment es presenten al circuit comercial com a RTE (a llenques i envasats al buit o en MAP):

- a) els crus-curats, com el pernil curat
- b) els cuits, com el pernil cuit i la mortadella

1.1.1 Productes carnis RTE crus – curats

Els productes carnis crus-curats són aquells en què s'utilitza la sal o la sal curant (barreja de sal amb additius com nitrats i/o nitrats i en alguns casos sucres) en contacte amb la superfície d'una peça sencera de carn (*e.g.* pernil o espatlla) o barrejada amb carn i/o greix trossejats o picats i embotits (*e.g.* xoriço, llonganissa). Així, la sal penetra i es distribueix per difusió a l'interior de la carn. Posteriorment els productes s'assequen i maduren (Toldrà, 2004).

Segons la legislació actual, al Reial Decret 1079/2008 el pernil curat es defineix com “un producte carni elaborat amb l'extremitat posterior del porc que s'ha sotmès, generalment, a un procés de salat acompanyat eventualment de l'addició d'espècies, condiments i additius, rentat, repòs o post-salat i assecat, curat i maduració durant el temps suficient per atorgar-li les característiques organolèptiques pròpies” (MARM, 2008).

Existeixen molts tipus de pernil curat, sobretot en països de la conca mediterrània, tanmateix també són presents a altres territoris com Bèlgica, Alemanya, Noruega, Estats Units i la Xina. Espanya, però, és el país del pernil curat per excel·lència ja que en presenta més de 10 varietats diferents (Hernández i Huerta, 1993; Bello Gutiérrez, 2008).

Pel que fa a la seva producció, tot i que s'ha industrialitzat en els últims anys, l'elaboració es continua basant en els processos tradicionals (Bello Gutiérrez, 2008) segons s'esquematzita a la **Figura 1**.

Cadascuna de les etapes influeix, en major o menor mesura, en les característiques fisicoquímiques i de qualitat que presentarà el producte final, que dependran entre altres, de la merma (pèrdua d'aigua de la peça al llarg del procés) i del temps de curació, paràmetres molt variables segons el producte.

Els paràmetres fisicoquímics evolucionen durant el procés d'elaboració del pernil curat. El valor de pH de la peça de carn quan s'inicia el procés d'elaboració generalment oscil·la entre 5,6 i 5,8, augmentant lleugerament durant les etapes de post-salat i a l'inici de la curació fins a valors de *ca.* 6,1 que es mantenen fins al final del procés (Toldrà, 2004). El contingut d'aigua disminueix durant el salat degut a l'efecte osmòtic produït per la sal que cobreix el pernil i que es difon al seu interior, i durant el procés de repòs i assecat per deshidratació. Aquesta disminució en el contingut d'aigua es tradueix bàsicament en una pèrdua de pes del pernil (merma), durant tot el procés d'elaboració, d'entre un 30 i un 40% respecte el pes inicial del pernil en cru (Toldrà, 2004). Pel que fa a l'activitat d'aigua (a_w), aquesta disminueix en major o menor mesura, en funció del procés d'elaboració i del tipus de producte, primer durant el salat per l'absorció de sal i després durant l'assecat per pèrdua d'aigua, passant de valors de més de 0,98 de la carn fresca a valors generalment per sota de 0,90 al producte final (Bello Gutiérrez, 2008), podent arribar a valors encara més baixos (*e.g.* 0,84) en pernills ibèrics amb un període de maduració de més de 19 mesos (Ventanas *et al.*, 2001). Cal tenir en compte que el valor d' a_w d'un pernil degut a la tecnologia del procés i a la seva pròpia estructura no és uniforme a tota la peça, essent sempre superior a la part més interna.

En general, els valors d' a_w dels pernills curats solen ser valors que en principi garanteixen la seguretat microbiològica, impeding el creixement de la gran majoria de microorganismes. Tot i així, per a les preparacions RTE, sovint s'utilitzen pernills de curta curació, i com a conseqüència amb valors d' a_w relativament alts. En aquest sentit, segons resultats propis (Hereu, 2009) presentats a la **Figura 2**, fins a un 50% dels pernills curats RTE comercialitzats tallats a llenques i envasats al buit, presentaven valors d' a_w iguals o superiors a 0,92, valor considerat com el límit de creixement de *L. monocytogenes* (vegeu apartat 1.2.1).

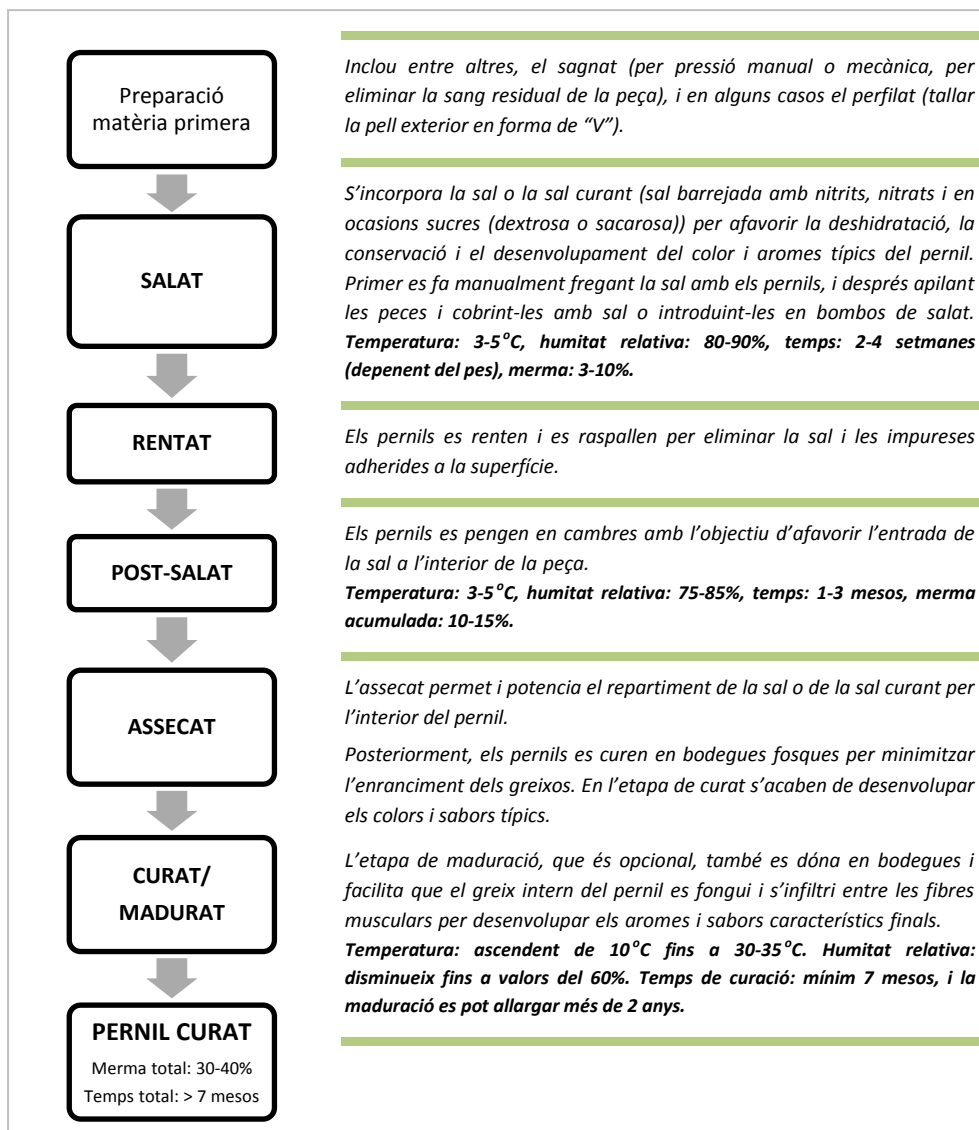


Figura 1. Esquema del procés d'elaboració del pernil curat. Adaptat i modificat de: Arnau (1993); Hernández i Huerta (1993); Arnau i Monfort (1998); Toldrà (2004, 2007); Bello Gutiérrez (2008) i Sánchez-Molinero i Arnau (2008).

Aquests valors més elevats d' a_w sumat al fet que es tracta d'un producte curat, però cru, que no ha estat sotmès a cap tractament tèrmic d'higienització, podria permetre la proliferació de certs microorganismes. Per la qual cosa, davant d'una hipotètica contaminació del producte en combinació amb unes condicions de conservació incorrectes, la seguretat del producte podria veure's compromesa.

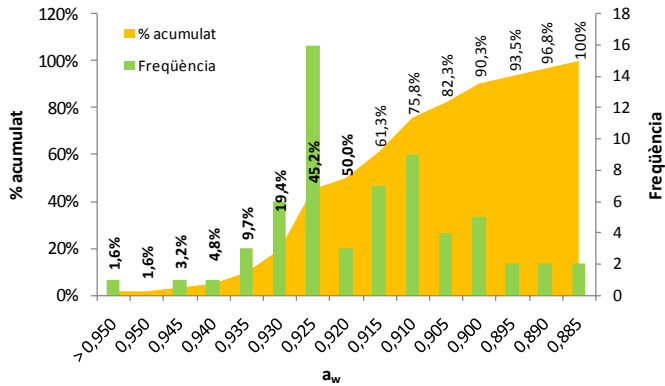


Figura 2. Distribució dels valors d' a_w de mostres comercials (n=62) de pernil curat tallat a llenques i envasat al buit (Hereu, 2009).

Tot i així, la presència d'altres factors antimicrobians (coneguts com a obstacles o barreres, *hurdles* en anglès) com els nitrits i l'alta concentració en sal, converteixen els productes carnis curats, i per extensió el pernil curat, en un substrat que generalment dificulta el creixement de la gran majoria de microorganismes (Arnau *et al.*, 2001).

1.1.1.1 Microbiologia

La presència de microorganismes a la superfície del pernil curat al final del procés d'elaboració es deu principalment a les operacions posteriors al sacrifici de l'animal. El seu origen pot ser tant del propi animal (*e.g.* de la pell) com ambiental (*e.g.* estris, manipuladors), i donat que en principi, els teixits dels animals sans estan lliures de microorganismes, l'origen d'aquests a l'interior del pernil és fonamentalment extern (Cornejo *et al.*, 1992). Per altra banda, però, els productes carnis curats RTE en general, i els pernills curats RTE a llenques en concret, es poden contaminar durant les etapes de post-processat de tallat a llenques i envasat.

Els microorganismes que es poden trobar al pernil curat es poden classificar en 3 grups diferents resumits a la **Taula 1**. Els microorganismes d'interès tecnològic (*e.g.* bacteris de l'àcid làctic (LAB), cocs gram positiu/catalasa positiu i llevats) influeixen en característiques organolèptiques com la textura, el color, l'aroma i el gust del producte final. Els microorganismes alterants, si són presents durant les primeres etapes de l'elaboració i proliferen poden deteriorar el producte, mentre que la presència, creixement i/o producció de toxines per part de microorganismes patògens poden provocar toxiinfeccions alimentàries, compromentent la salut del consumidor.

D'entre els patògens, *L. monocytogenes* ha centrat el focus d'atenció durant els últims anys (Christian, 2000) degut al seu caràcter halo- i psicrotolerant (vegeu apartat 1.2.1) i és particularment rellevant en els productes RTE com els que són objecte d'estudi d'aquesta tesi doctoral.

Taula 1. Alguns dels microorganismes associats al pernil curat.

Grup	Tipus	Efecte	Gèneres i espècies aïllades més freqüents	Referències
Tecnològics	Cocs GC ^a	Responsables de processos de lipòlisi i proteòlisi que determinen part de les característiques organolèptiques finals	<i>Staphylococcus xylosum</i> <i>Kocuria</i> spp.	(Paarup <i>et al.</i> , 1999) (Cornejo i Carrascosa, 1991)
	LAB	Actuen inhibint el creixement d'altres microorganismes indesitjables i contribueixen en les característiques organolèptiques finals	<i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Lactobacillus alimentarius</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>Rhamnosus</i>	(Molina <i>et al.</i> , 1989)
	Llevats	Responsables de processos de lipòlisi i proteòlisi que determinen part de les característiques organolèptiques finals	<i>Candida zeylanoides</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>D. maramba</i>	(Núñez <i>et al.</i> , 1996b) (Monte <i>et al.</i> , 1986)
Alterants	Gram -			
	Enterobacteris	Putrefacció profunda o "cala"	<i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Proteus vulgaris</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	(Losantos <i>et al.</i> , 2000) (Paarup <i>et al.</i> , 1999)
	Altres	Taca negra	<i>Carnimonas nigrificans</i>	(Garriga <i>et al.</i> , 1998)
	Gram +			
	Clostridis	Formació de gas	<i>Clostridium</i> spp.	(Marín <i>et al.</i> , 1993)
Fongs		Pigmentacions indesitjables a nivell superficial	<i>Penicillium</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp.	(Núñez <i>et al.</i> , 1996a)
			<i>Cladosporium</i> spp.	(Paarup <i>et al.</i> , 1999)
Patògens	Gram +	Intoxicació	<i>Staphylococcus aureus</i>	(Pascual Anderson, 1989)
			<i>Clostridium perfringens</i>	(Arnau <i>et al.</i> , 2001)
			<i>Clostridium botulinum</i>	(Sánchez-Molinero, 2003)
		Listeriosi	<i>Listeria monocytogenes</i>	(Sánchez-Molinero, 2003)
Gram -	Salmonel·losi	<i>Salmonella</i> spp.	(Sánchez-Molinero, 2003)	

^a: Cocs Gram positius, catalasa positius.

1.1.2 Productes carnis RTE cuits

Segons la Norma Genèrica de Qualitat pels productes carnis tractats per calor, els productes carnis cuits són "tots els productes preparats amb carn i despulles comestibles d'una o més espècies d'animals d'abast, aus i caça autoritzades que s'han sotmès a l'acció de la calor, arribant a una temperatura suficient que permet assolir la coagulació total o parcial de les proteïnes càrnies, i que posteriorment poden patir un procés de fumat i/o maduració" (Presidencia del Gobierno, 1981). Aquest document classifica aquest tipus de productes en 9 grups diferents segons les seves característiques. El pernil cuit es troba al grup 1 (producte enter no picat) on s'integren els productes

elaborats amb peces senceres i identificables, i la mortadel·la al grup 5 (producte picat i emulsionat) integrat pels productes preparats amb carn i greix, picats i emulsionats, emmotllats o embotits. Aquesta diferència en la forma d'utilitzar la carn fa que el procés de producció del pernil cuit i de la mortadel·la segueixi algunes etapes diferents, les quals es troben esquematitzades a la **Figura 3** i a la **Figura 4**, respectivament.

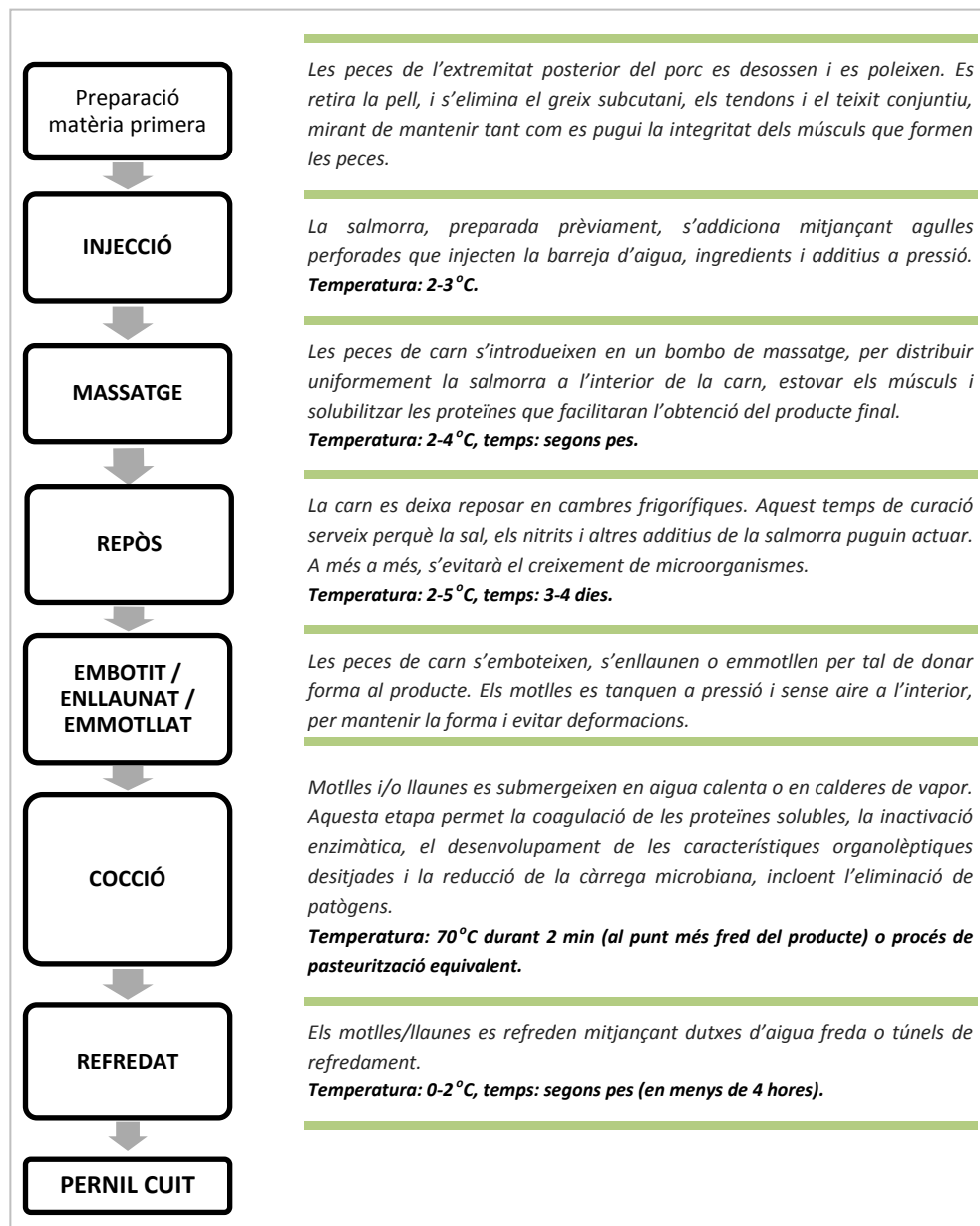


Figura 3. Esquema del procés d'elaboració del pernil cuit. Adaptat i modificat de: López *et al.* (2001); Toldrà (2007) i Toldrà *et al.* (2010).

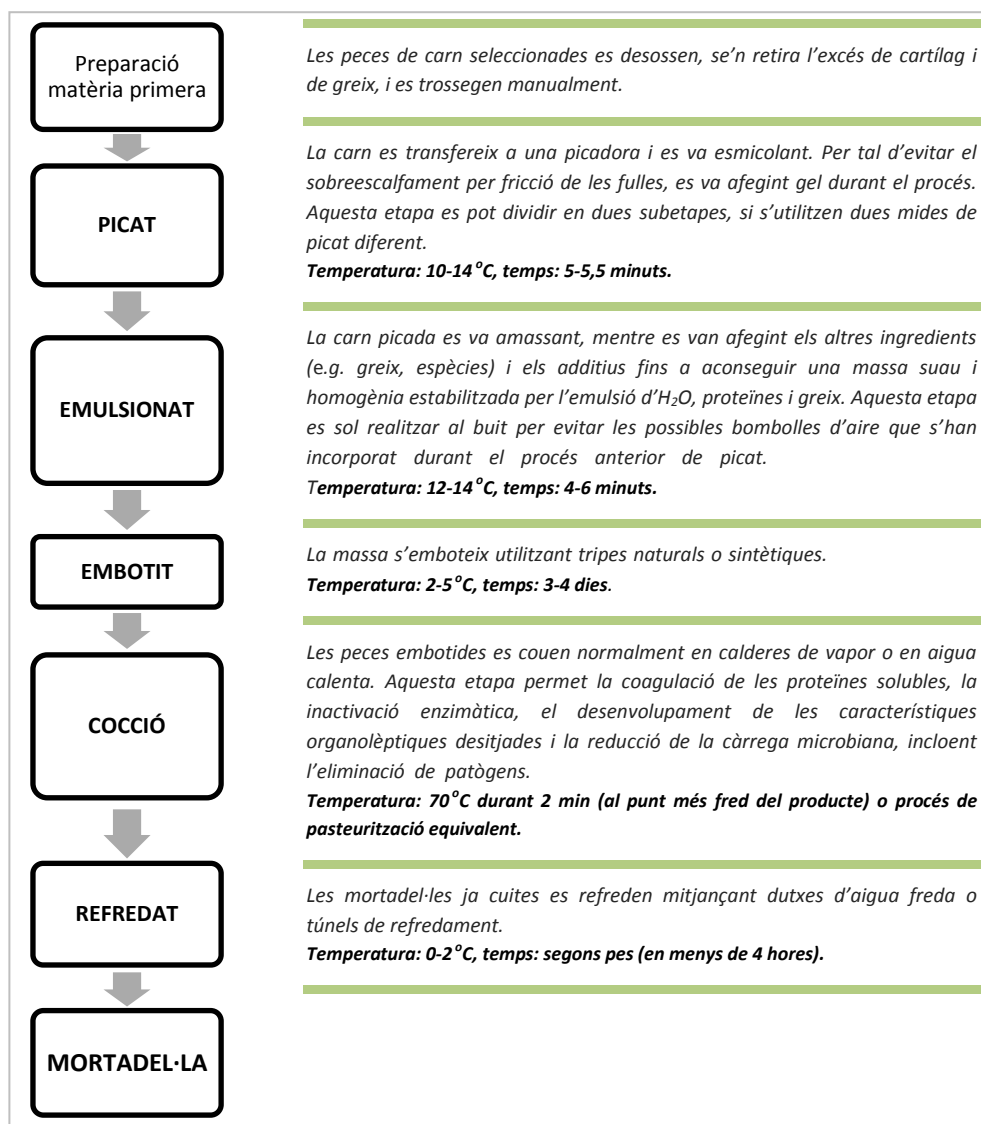


Figura 4. Procés d'elaboració de la mortadel·la. Adaptat i modificat de: Benito i Córdoba (2001) i Luzón i Martín Bejarano (2001).

Tot i que el pernil cuit té la seva pròpia Norma Específica de Qualitat (Presidencia del Gobierno, 1983) on es descriu el procés d'elaboració general i se'n regula la categorització comercial final segons el tipus i la qualitat de la carn (e.g. pernil cuit extra, pernil cuit de primera o "vianda/fiambre" de pernil de segona), tant el pernil com la mortadel·la s'han de preparar afegint a les peces de carn de les extremitats posteriors o a la massa càrnia, respectivament, els ingredients (e.g. sucres, proteïnes, fècules) i additius (e.g. nitrats, antioxidants, fosfats) que s'incorporen barrejats amb la sal. Aquesta barreja s'anomena salmorra i algunes de les formulacions típicament utilitzades per l'elaboració per exemple de pernills cuits amb i sense fosfats, es poden veure a la **Taula 2**.

Taula 2. Exemples de formulacions de salmorra injectada al 20% en pernills cuits sense fosfats (A) i amb fosfats (B). Adaptat de Luzón i Martín Bejarano (2001).

A	(g/l d'aigua)	B	(g/l d'aigua)
Sal fina	108	Sal fina	108
Ascorbat sòdic	6	Ascorbat sòdic	6
Nitrat potàssic	6	Nitrat potàssic	6
Nitrit sòdic	3	Nitrit sòdic	3
Dextrosa	30	Dextrosa	30
		Fosfats	18
		Carragenat	18
		Caseïnat	48
		Aroma de pernil	6

Els sucres i la sal actuen com a depressors de l' a_w , a més de contribuir al sabor final del producte, i les fècules, proteïnes i fosfats s'afegeixen al producte per tal d'augmentar la capacitat de retenció d'aigua. Els nitrits, a part de contribuir en la generació del color rosat característic d'aquest tipus de productes, tenen una funció conservadora ja que tenen un efecte bactericida sobre enterobacteris, *Clostridium perfringens* i essent especialment letals per la forma vegetativa de *Cl. botulinum* (Toldrà et al., 2010).

Posteriorment els productes reben un tractament tèrmic (procés de pasteurització o esterilització) suficient per tal que les proteïnes càrnies coagulin i mantinguin cohesionades les peces o pasta que els formen. Així, mitjançant l'acció de la calor, s'obtenen els anomenats gels carnis, els quals presenten una textura diferent de la carn pròpiament dita, i és característica dels productes carnis cuits (Benito i Córdoba, 2001). En ocasions el producte es cou directament dins l'envàs (llauna).

1.1.2.1 Microbiologia

Els productes carnis cuits, també anomenats semiconserves, són productes amb una càrrega microbiana baixa però amb una vida comercial relativament limitada, que es determina en funció del tipus d'ingredients i additius afegits, els tractaments aplicats i el format del producte i tipus d'envasat, pot anar dels pocs dies a temperatures d'entre 1 i 8°C en llencats sense envasar, fins a més de 4 mesos en productes llencats, envasats al buit i tractats per altes pressions (Vercammen et al. 2011). Aquests productes doncs, necessiten emmagatzematge i comercialització en fred degut a que durant l'etapa de cocció, els temps i les temperatures aplicades aconseguen una destrucció microbiològica parcial (pasteurització), eliminant les formes vegetatives de patògens i gran part dels alterants, però no els bacteris termoresistents ni les espores (Luzón i Martín Bejarano, 2001).

Tanmateix, la manipulació post-processat durant etapes posteriors a la cocció, com el tallat a llenques i l'envasat per a la preparació de productes de conveniència RTE, suposa un risc de contaminacions creuades (Vorst et al., 2006). En aquest tipus de productes doncs, cal extremar els plans de bones pràctiques de fabricació i d'higiene per tal de minimitzar aquest risc.

Les característiques pròpies dels productes carnis RTE cuits (e.g. pH al voltant de 6 i a_w de 0,98 segons un estudi de mercat propi no publicat) són condicions que permeten el creixement microbiològic. En cas de contaminació, els microorganismes troben poca competència i es poden desenvolupar més fàcilment que en productes no pasteuritzats.

Els principals microorganismes contaminants de productes carnis cuits RTE, tal i com es resumeix a la **Taula 3**, són els bacteris de l'àcid làctic o LAB (Vercammen *et al.*, 2011) que són els principals microorganismes alterants i actuen deteriorant sensorialment el producte (*e.g.* acidificació, producció de llim, males olors), sobretot si estan envasats al buit o en MAP (Samelis *et al.*, 2000). D'altra banda, d'entre els principals riscos sanitaris associats al consum de productes carnis RTE cuits recollits a l'apartat de patògens de la **Taula 3**, *L. monocytogenes* és el més rellevant. Diversos estudis i informes han exposat i alertat de l'alta freqüència amb la que *L. monocytogenes* es troba en productes carnis RTE cuits en comparació amb altres patògens (FSAI, 2005; Zhu *et al.*, 2005; RASFF, 2010; EFSA, 2011) (vegeu apartat 1.2.3), així com de la relació d'aquest tipus de productes amb casos de listeriosi (Sim *et al.*, 2002; Winter *et al.*, 2009; RASFF, 2011; Cartwright *et al.*, 2013) (vegeu apartat 1.2.2).

Taula 3. Alguns dels microorganismes associats als productes carnis cuits.

Grup	Tipus	Efecte	Gèneres i espècies aïllades més freqüents	Referències
Alterants	LAB	Responsables de males olors, acidificació del producte, aparició d'exsudats viscosos (llim) i envàs inflat per la producció de gas	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>L. curvatus</i> <i>Leuconostoc</i> spp.	(Björkroth <i>et al.</i> , 1998) (Björkroth <i>et al.</i> , 1998; Metaxopoulos <i>et al.</i> , 2002) (Vasilopoulos <i>et al.</i> , 2010)
		Produeixen coloracions verdoses a la superfície de les llenques	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> , <i>C. viridans</i>	(Peirson <i>et al.</i> , 2003)
	Enterobacteris	Generen males olors i exsudats viscosos	<i>Serratia</i> spp.	(Denis <i>et al.</i> , 2006)
	Altres	Generen males olors i acidesa del producte Produeixen coloracions verdoses a la superfície de les llenques	<i>Brochotrix thermosphacta</i> <i>Aerococcus viridans</i> , <i>Weissella viridescens</i>	(Rattanasomboon <i>et al.</i> , 1999) (Peirson <i>et al.</i> , 2003)
Patògens	Gram +	Intoxicació botulínica	<i>Clostridium botulinum</i>	(Lindström <i>et al.</i> , 2001)
		Listeriosi	<i>Listeria monocytogenes</i>	(Uyttendaele <i>et al.</i> , 1999; Cabedo <i>et al.</i> , 2008)
	Gram -	Salmonel·losi	<i>Salmonella</i> spp.	(Cabedo <i>et al.</i> , 2008; Hwang <i>et al.</i> , 2011)
		Infecció per <i>E.coli</i> enterohemorràgica	<i>Escherichia coli</i> O157:H7	(Hwang <i>et al.</i> , 2011)
		Yersiniosi	<i>Yersinia enterocolitica</i>	(Bari <i>et al.</i> , 2011)

1.2 *Listeria monocytogenes*

La presència de microorganismes patògens en els aliments no sol provocar canvis apreciables al producte (Barakat i Harris, 1999). El cas concret de *L. monocytogenes* en productes carnis RTE no n'és una excepció, fins i tot quan el patògen es troba a nivells que poden suposar un risc per a la salut del consumidor.

1.2.1 Característiques i ecologia

L. monocytogenes és un bacil curt d'entre 0,4 - 0,5 µm de diàmetre i 1 - 2 µm de llargada (**Figura 5**). És un bacteri Gram positiu, anaerobi facultatiu, catalasa positiu i oxidasa negatiu, no esporulat, que sol presentar flagels peritrics (Wagner i McLauchlin, 2008). És un microorganisme psicotolerant. La seva temperatura òptima de creixement es troba entre els 30 i 37 °C, tot i que pot créixer en un interval de temperatures molt més ampli, incloent temperatures de refrigeració (entre -1,5 i 45 °C) (Hudson *et al.* 1994). L'interval de creixement en funció del pH també és molt ampli: 4,39-9,4 (ICMSF, 1996).

És resistent a les altes concentracions de sal, podent créixer en medis de cultiu amb un 10% de sal. Algunes soques poden arribar a tolerar, encara que sense créixer, entre un 20 i un 30% de sal. Pel que fa a l' a_w , s'ha descrit el límit de creixement al voltant de 0,92 (Wagner i McLauchlin, 2008).

La distribució de *L. monocytogenes* a la natura és molt àmplia, s'ha aïllat del terra, de l'aigua, d'animals tant domèstics com salvatges, de vegetals i d'aigües residuals (Sauders i Wiedmann, 2007). Tot i així, els hàbitats primaris d'aquest patògen són la terra i l'aigua. A través dels vegetals i els animals entra a les plantes de processat, on es poden contaminar els aliments que després són consumits per la població. La capacitat de *L. monocytogenes* per romandre en plantes de processat i sobreviure-hi durant llargs períodes de temps es deu bàsicament a l'habilitat que presenta per formar biofilms (Gómez *et al.*, 2012) i desenvolupar resistències en ambients hostils tals com altes concentracions de sal, acidesa i baixa concentració d'oxigen, a més a més de poder créixer a baixes temperatures. Un altre hàbitat del patògen és la nevera domèstica, on se n'ha descrit una prevalença de fins al 20% (Kornacki i Gurtler, 2007), per la qual cosa es considera que la pròpia zona d'emmagatzematge domèstic i de preparació dels aliments pot resultar un focus de contaminació important.

S'ha descrit que entre un 5 i un 10% de la població és portadora asimptomàtica de *L. monocytogenes*, fet no necessàriament vinculat a la ingestió d'aquests aliments contaminats (Warriner i Namvar, 2009; Health Canada, 2011).

1.2.2 Listeriosi

La listeriosi és el nom donat a la malaltia provocada per *L. monocytogenes*. Normalment està associada al consum d'aliments contaminats amb aquest patògen, tot i que hi ha altres vies com la transmissió de la mare al fetus durant l'embaràs o en el moment del part, o per contacte directe amb el microorganisme. El temps d'incubació és molt variable, podent ésser d'entre poques hores i fins a 70 dies (FSAI, 2005), raó per la qual en brots d'origen alimentari es fa difícil associar quin és l'aliment concret causant del trastorn.

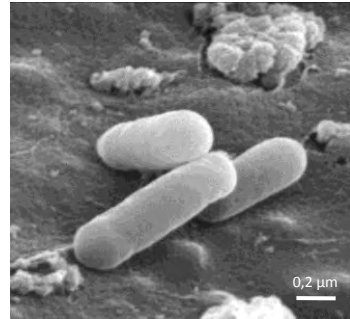


Figura 5. Cèl·lules de *L. monocytogenes* CTC1010, CTC1011 i CTC1034 inoculades en pernil cuit. La mostra es va fixar amb glutaraldehid (2,5%) i solució tampó de cacodilat 0,1 M (pH 7,4) i es va deshidratar amb etanol. Microfotografia realitzada amb microscopi electrònic de rastreig (© Programa de Seguretat Alimentària, IRTA).

La relació entre el nivell d'exposició i la malaltia, o altrament dit la dosi infectiva, no es coneix amb precisió. Les dades epidemiològiques existents són limitades i poc concloents. Alguns models realitzats amb animals, calculen que aquesta dosi infectiva en els animals assajats es troba entre 10^2 i 10^7 CFU/g (McLauchlin *et al.*, 2004).

La listeriosi es pot manifestar en humans de dues formes diferents, la forma no invasiva i la invasiva. La forma no invasiva està relacionada amb la ingestió d'aliments contaminats amb una alta concentració del patogen ($>10^5$ CFU/g) (McLauchlin *et al.*, 2004). Els principals símptomes solen ser mal de cap, esgarrifances i febre, normalment acompanyats dels típics problemes gastrointestinals com nàusees, vòmits i diarrea. Pel que fa a la forma invasiva de la listeriosi, aquesta sol afectar a individus susceptibles i que formen part dels grups de risc (immunodeprimits, dones embarassades, nens i gent gran). En aquests grups, la malaltia es pot manifestar en forma de septicèmia greu, meningitis i encefalitis, entre altres símptomes. És especialment problemàtica en dones embarassades, ja que els símptomes en la mare poden ser relativament lleus o inexistents, però si la infecció s'estén fins al fetus a través de la placenta pot provocar danys neurològics importants al fetus i problemes durant la gestació que poden acabar amb avortament (Kuhn *et al.*, 2008). En aquests casos, tot i que alguns textos suggereixen que la dosi infectiva podria ser relativament baixa, 10^2 i 10^3 CFU/g (NZFSA, 2008), aquesta pot variar en funció de la susceptibilitat del grup de risc al que pertany l'individu arribant a dosis de 10^{12} CFU/g segons les estimacions derivades d'avaluacions del risc publicades a la revisió de l'Institut Internacional de Ciències de la Vida (ILSI, 2005). Aquest treball també estima que la susceptibilitat relativa a patir listeriosi en comparació amb la població normal amb susceptibilitat 1, és de 14 en individus perinatals i de 2,6 en gent gran (majors de 60 anys).

La listeriosi és una malaltia poc freqüent en comparació amb altres toxiinfeccions com la salmonel·losi i la campilobacteriosi. No obstant, es considera una malaltia de gran importància per la severitat del procés, ja que comporta una alta taxa de mortalitat que pot arribar a ser de fins el 20 - 30% (Ministry for Primary Industries of New Zealand, 2012b).

La incidència de listeriosis a la Unió Europea ha seguit una tendència fluctuant durant els últims 5 anys. Durant el 2011, es van declarar i confirmar 1476 casos de listeriosi a la Comunitat Europea (0,32 casos per cada 100.000 habitants), un 12,7% dels quals va resultar amb la mort del pacient (EFSA, 2013). Dinamarca amb 0,88 casos per cada 100.000 habitants, Finlàndia amb un 0,80 i Espanya amb 0,79 casos per cada 100.000 habitants, van ser els països amb una taxa de notificació més alta. Als Estats Units, les autoritats competents van informar de 621 casos (0,29 casos per cada 100.000 habitants) durant el mateix any, amb una taxa de mortalitat, no associada a l'embaràs del 22% (CDC, 2013).

Els brots de listeriosi poden estar relacionats amb el consum d'una gran varietat d'aliments RTE, tanmateix, els productes carnis constitueixen una de les categories de productes amb més implicació en aquests brots (HHS/USDA, 2003; FSAI, 2005), un recull dels quals es pot veure a la **Taula 4**.

Taula 4. Brots de listeriosi associats a la ingesta de productes carnis entre els anys 2000 i 2013 recollits a la literatura. Garrido *et al.* (2010), ISID (2013), Fairfax New Zealand Limited (2012) i Ministry for Primary Industries of New Zealand (2012a).

Any	País	Aliments implicat	Nombre de casos (nombre morts) ^o
2000	Nova Zelanda	Productes carnis RTE delicatessen	31
2000	França	Gelatina de llengua de porc	26 (7)
2000	Estats Units	Productes de gall d'indi delicatessen	30 (4)
2002	França	Salsitxes cuites	8 (1)
2002	Estats Units	Productes de gall d'indi delicatessen	16
2005	Austràlia	Pernil cuit i vedella en conserva	4 (2)
2006-2007	Alemanya	Salsitxes cuites	16 (5)
2008	Canadà	Productes carnis RTE	57 (20)
2008	Àustria	Gelea de carn de porc	19
2009	Dinamarca	Carn de vedella	8 (2)
2009	Austràlia	Rotllet de daus de pollastre	7
2009	Xile	Productes carnis RTE	3 (1)
2010	Canadà	Pernil cuit i salami	14 (2)
2012	Nova Zelanda	Rotllets de salami	4 (2)
2013	Xile	Pernil de gall d'indi	18

^o: Informació sobre el nombre de morts no disponible segons la font.

1.2.3 *L. monocytogenes* en productes carnis

La presència de *L. monocytogenes* en productes carnis RTE disponibles al mercat, i per tant a l'abast del consumidor, ha estat objecte de diversos estudis, enregistant valors de prevalença entre 0 i 25%, segons es recull a la **Taula 5**.

Són pocs els estudis on a més de determinar la presència de *L. monocytogenes*, s'aportin dades quantitatives de concentració. D'entre les dades disponibles, s'extreu que la major part de les mostres contaminades contenien nivells de *L. monocytogenes* per sota de 10 CFU/g. En alguns casos, el 10,8%, el 12,5% i el 20% de les mostres analitzades de *cured dried pork sausages*, *cooked ham* i *cooked turkey breast* respectivament, presentaven valors inferiors a 100 CFU/g (Cabedo *et al.*, 2008) i en altres, un 0,7% de les mostres de *cooked ham* (Little *et al.*, 2009) i un 0,9% de les mostres de *deli meat products* en les que s'inclouen pernil, pollastre i gall dindi cuit i a llenques (Garrido *et al.*, 2009) van presentar nivells del patogen per sobre de 100 CFU/g.

D'aquests estudis se n'extreu que, en general, els productes crus-curats (inclosos els fermentats) presenten uns valors de prevalença de *L. monocytogenes* generalment majors (excepte alguns casos) que els productes cuits. D'altra banda, els productes amb una major concentració del patogen (> 100 CFU/g) es dona en els productes cuits. Tanmateix, les estadístiques publicades per l'EFSA (2013) referents a la presència de *L. monocytogenes* en un gran nombre d'aliments RTE a nivell europeu, indiquen que de les mostres individuals d'embotits fermentats recollides a l'establiment de venda (n = 1.768) un 0,6% sobrepassaven el límit de 100 CFU/g, en canvi de les mostres individuals d'altres RTE carnis diferents dels fermentats (n = 13.485), aquest límit únicament s'excedia en un 0,2%.

Taula 5. Prevalença de *L. monocytogenes* en productes carnis RTE del circuit comercial.

Producte ^a (n)	Tipus envasat	Punt de mostreig	Origen	Prevalença (% mostres presència del patogen)	Referència
Cooked ham (879)	^b	productor i comerç minorista	Bèlgica	6,1%	(Uyttendaele <i>et al.</i> , 1999)
Cooked loin (127)				10,2%	
Cooked poultry (32)				6,3%	
Pâtés (217)				2,8%	
Cured loin (121)				19,8%	
Cured raw ham (169)				11,8%	
Cured pork bacon (153)				18,3%	
Dry fermented sausages (308)				11,7%	
Cooked ham (4)	-	productor i comerç minorista	Portugal	25%	(Mena <i>et al.</i> , 2004)
Dry-cured ham (44)				2,3%	
Spanish-style sausages (27)				3,7%	
Bacon heat treated (49)	Al buit o MAP ^c	supermercat	Grècia	24,5%	(Angelidis i Koutsoumanis, 2006)
Cooked ham (27)				3,7%	
Mortadella heat treated (13)				0%	
Pit de gall d'indi (21)				0%	
Pit de pollastre (4)				0%	
Turkey breast (100)	Al buit	comerç minorista i supermercat	Canadà	3%	(Bohaychuk <i>et al.</i> , 2006)
Beef wieners (100)				5%	
Chicken wieners (101)				3%	
Fermented sausages (100)				4%	
Cooked ham (24)	-	productor i comerç minorista	Catalunya	12,5%	(Cabedo <i>et al.</i> , 2008)
Cooked turkey breast (15)				20%	
Cured dried pork sausage (65)				16,9%	
Cooked ham (301)	No envasat	comerç minorista	Nova Zelanda	4,3%	(Cornelius <i>et al.</i> , 2008)
Deli meat products (220)	Al buit	supermercat i comerç minorista	Navarra	2,7%	(Garrido <i>et al.</i> , 2009)
Pâté (120)				0,8%	
Cooked ham (949)	-	comerç minorista	Regne Unit	4,2%	(Little <i>et al.</i> , 2009)
Salami (112)	Al buit	supermercats	Itàlia	20,5%	(Di Pinto <i>et al.</i> , 2010)
Fuet (19)	No envasat	productor	Catalunya	15,8%	(Martin <i>et al.</i> , 2011)
Cooked ham (65)	Al buit	comerç minorista	Brasil	1,5%	(Martins i Leal Germano, 2011)
Salami (65)				7,7%	

^a: S'ha mantingut el nom original del producte o grup de productes sense traduir per evitar confusions i/o males interpretacions. En alguns casos no s'ha pogut determinar el tipus de producte (*i.e.* curat, cuit, fermentat) per manca d'informació a la publicació.

^b: No s'ha pogut determinar el tipus d'envasat (*i.e.* envasat al buit, MAP) per manca d'informació a la publicació.

^c: MAP: Envasat en atmosfera modificada, de l'anglès *Modified Atmosphere Packaging*.

1.3 Gestió del risc de *L. monocytogenes* en productes RTE

Els costos tant a nivell de salut com econòmics derivats dels casos de listeriosi en la població (*e.g.* el nombre d'hospitalitzats i morts al Regne Unit per casos de listeriosi es xifra amb uns 245 milions de lliures/any, FSA, 2013), fan que la minimització del risc de *L. monocytogenes* en productes RTE, s'hagi

convertit en els últims anys en un dels principals objectius a tractar en matèria de salut pública (Warriner i Namvar, 2009; Garrido *et al.*, 2010).

Des de fa uns anys, governs i indústries centren esforços de gestió de minimització del risc associat a la presència de *L. monocytogenes* en productes RTE mitjançant la implementació d'accions enfocades a seguir unes bones pràctiques de fabricació i manipulació dins el sector alimentari mitjançant l'aplicació de mesures específiques per a la reducció i/o eliminació del risc, així com amb la verificació i control de la presència i nivells del patogen en els productes comercialitzats.

1.3.1 Marc actual de l'avaluació i gestió de la seguretat microbiològica dels aliments

Amb l'acord de mesures sanitàries i fitosanitàries de l'Organització Mundial del Comerç (WTO) signat el 1995, es reafirma el dret dels estats membres a determinar el nivell de protecció de la salut (ALOP, de l'anglès, *Appropriate Level Of Protection*) dels seus ciutadans que creguin apropiat, evitant al mateix temps un mal ús d'aquest dret, que amb finalitats proteccionistes, es pugui traduir amb una obstaculització del comerç internacional. Tanmateix, l'acord també autoritza als governs a aplicar mesures que es tradueixin en normes més riguroses, sempre i quan es puguin justificar científicament, amb la qual cosa es poden aplicar nivells que constitueixin barreres comercials (WTO, 1995).

Així doncs amb l'adopció del terme ALOP, s'inicia un nou plantejament basat en l'anàlisi de riscos, per abordar els aspectes relatius a la seguretat alimentària, que culmina amb l'aparició de diversos conceptes que conformen un sistema de mesura de la seguretat microbiològica dels aliments que es descriu a la **Taula 6** (ICMSF, 2002; CAC, 2010).

Taula 6. Descripció dels conceptes que conformen el sistema de mesura de la seguretat microbiològica dels aliments basat en l'anàlisi de riscos (WTO, 1995; ICMSF, 2002; CAC, 2010).

Nivell adequat de protecció (ALOP, <i>Appropriate Level Of Protection</i>)	Nivell de protecció que una societat està disposada a acceptar per la seva població en relació a la seguretat alimentària (<i>e.g.</i> 3 morts/10 ⁶ habitants x any)
Objectiu de seguretat alimentària (FSO, <i>Food Safety Objective</i>)	Nivell màxim de perill (en termes de prevalença o concentració) en un aliment en el moment del seu consum, que contribueix a assolir l'ALOP (<i>e.g.</i> 100 CFU/g)
Objectiu de rendiment/funcionament (PO, <i>Performance Objective</i>)	Nivell màxim de perill en un aliment en una etapa específica de la cadena alimentària abans del seu consum, que contribueix a la consecució de l'FSO i per tant de l'ALOP (<i>e.g.</i> absència en 25g)
Criteri de rendiment/funcionament (PC, <i>Performance Criteria</i>)	Efecte en el nivell d'un perill que s'ha d'assolir mitjançant l'aplicació d'una o varies mesures de control, per tal de complir els objectius (FSO i PO) establerts (<i>e.g.</i> 6 reduccions decimals en la càrrega microbiana durant la pasteurització)
Criteris de procés o producte	Paràmetres de control d'una mesura de control per assegurar el compliment del PC establert (<i>e.g.</i> 70 °C durant 2 min)

Aquest sistema permet relacionar de manera més efectiva les activitats i accions de control que han de dur a terme els productors per garantir la seguretat alimentària dels aliments que elaboren i comercialitzen, amb l'impacte que aquestes comporten a nivell de salut i de protecció del consumidor (Gorris, 2005).

El terme ALOP no s'expressa en unes unitats útils per al productor d'aliments. En canvi, els FSO i els PO són la traducció del terme ALOP per tal de fer-lo aplicable a processos industrials. De forma similar, els PC s'assoleixen mitjançant la seva traducció en paràmetres de control d'etapes (criteris) de procés o de producte degudament validats (Gorris, 2005).

Aquests paràmetres s'estableixen tenint en compte els nivells de contaminació inicial del producte i les possibles reduccions o increments del perill (per recontaminació o creixement) en totes les etapes de transformació, conservació, distribució, venda i fins al consum, tal i com mostra la següent fórmula conceptual proposada per la ICMSF (2002):

$$H_0 - \sum R + \sum I \leq FSO$$

on H_0 és el nivell inicial de perill, $\sum R$ la reducció total (acumulada) del perill al llarg de la cadena alimentària, $\sum I$ l'increment total (acumulat) del perill per recontaminació i/o creixement del microorganisme patògen al llarg de la cadena alimentària fins al moment del consum.

Els FSO serveixen de base per establir els criteris microbiològics (apartat 1.3.2.1) que són els que constitueixen els límits legals per establir l'acceptabilitat dels productes, a més de ser de gran utilitat per validar i verificar els processos i procediments, i en general el bon funcionament de les mesures de control, dins del sistema d'anàlisi de perills i punts de control crítics (APPCC) de les indústries (apartat 1.3.2.2) (European Commission, 2005).

1.3.2 Mesures de gestió del risc associat a *L. monocytogenes*

Les mesures de gestió dels riscos microbiològics s'apliquen a diferents nivells. Els governs i òrgans legislatius s'encarreguen de redactar normatives i controlar que aquestes es compleixin en relació als límits (criteris microbiològics) sobre la presència de *L. monocytogenes* en aliments. Les mesures també han d'anar enfocades al sector industrial perquè conegui i apliqui d'una manera estricta les pautes de fabricació correctes, així com també realitzi els controls pertinents de la producció, i implementi protocols de vigilància i verificació efectius en el marc de l'autocontrol (ILSI, 2005). Alhora, la conscienciació dels treballadors de les indústries i establiments (manipuladors) i dels propis consumidors, mitjançant la difusió del coneixement i la comunicació del risc en relació a *L. monocytogenes*, és un altre pilar fonamental per a una adequada gestió dels riscos microbiològics dels aliments.

1.3.2.1 Criteris microbiològics de referència i normatives

Des d'una perspectiva legal, els **criteris microbiològics** "defineixen l'acceptabilitat d'un producte, un lot de productes o un procés, basant-se en l'absència, presència o nombre de microorganismes, i/o en la quantitat de les seves toxines o metabòlits, per unitat de massa, volum, superfície o lot" (European Commission, 2005). Generalment, a més del pla de mostreig i la metodologia analítica a aplicar, els criteris microbiològics indiquen la categoria d'aliment i el punt o punts de la cadena alimentària on s'apliquen els criteris, així com les mesures a adoptar quan aquests no es compleixen (Gorris, 2005).

L'aplicació d'aquests criteris microbiològics és una de les moltes mesures de gestió per minimitzar el risc per als consumidors (EFSA, 2007). Amb el seu compliment es pretén que determinats patògens, i en aquest cas *L. monocytogenes*, no es trobin per sobre dels límits màxims permesos, i per tant, no estiguin presents als aliments en nivells inacceptables i que puguin suposar un risc per al consumidor.

El coneixement per part de les empreses dels criteris aplicables en el territori on estan ubicades és fonamental; però també cal tenir en compte les normatives que regeixen altres països en el cas de voler exportar el seu producte. Actualment no hi ha un consens internacional pel que fa al límit acceptable de *L. monocytogenes* en els aliments per tal de protegir al consumidor. En conseqüència, tampoc existeix un acord internacional comú per als criteris d'elaboració o recomanacions de producció per tal de complir amb les exigències en relació a *L. monocytogenes* en productes RTE. A nivell internacional, existeixen dues grans posicions en relació als criteris microbiològics de *L. monocytogenes* en aliments, les quals es presenten a continuació:

Les legislacions més restrictives, basades en polítiques de "tolerància zero", s'apliquen a països com els Estats Units i Japó.

Als **Estats Units**, mitjançant la "*Listeria Rule*" (FSIS, 2003) es requereix l'absència de *L. monocytogenes* en 25 g en productes carnis RTE. Segons les estimacions de l'administració nord-americana, si aquest nivell de contaminació s'aconseguís a tots els productes alimentaris dels Estats Units, els casos de listeriosi en aquest territori serien de menys d'1 per any (HHS/USDA, 2003). Tanmateix, les estadístiques mostren una incidència molt allunyada d'aquest valor, ja que només durant l'any 2011 el nombre de casos va ser de 621 (CDC, 2013). La "*Listeria Rule*" exigeix analitzar superfícies en les que els aliments han estat en contacte (*food contact surfaces*) definint procediments de "retenció i anàlisi" (*hold-and-test*) en funció de quina de les 3 alternatives d'intervenció, per tal de gestionar el risc de contaminació de *L. monocytogenes*, aplica l'establiment productor (vegeu apartat 1.3.2.2). En aquests casos, tots els aliments RTE que han estat en contacte amb una superfície on s'ha detectat presència del patògen es consideren contaminats (*i.e.* adulterat segons la terminologia americana), amb la qual cosa s'han de destruir o bé reprocessar per eliminar *L. monocytogenes* (5 unitats logarítmiques).

El **Japó** és un altre dels països on s'exigeix l'absència de *L. monocytogenes* en productes carnis RTE que no han estat sotmesos a un tractament tèrmic. No s'ha pogut trobar el text legal específic, però sí referències en matèria d'exportació de productes carnis (en concret pernil curat) d'Espanya cap a Japó, que avalen aquesta restricció (MSPS, 2010; ICEX, 2012).

Aquesta política tan restrictiva obliga a les indústries de països exportadors a aplicar tractaments addicionals als seus productes per tal d'eliminar el patògen, augmentant considerablement els costos de producció i fent que aquesta mesura, amb uns nivells més estrictes dels generalment acceptats a

nivell europeu, es vegi com un obstacle en el comerç internacional i d'exportació (MSPS, 2010). Aquesta rigidesa, a més, és motiu de crítica pel fet que no sembla contribuir a una menor incidència de listeriosi en la població dels països on s'aplica. Segons dades epidemiològiques, països amb criteris microbiològics que permeten nivells baixos del patogen com els que es presenten a continuació, presenten nivells similars de la malaltia als països on s'aplica la tolerància zero (ILSI, 2005).

L'altre enfoc pel que fa als criteris microbiològics en relació a *L. monocytogenes*, és l'aplicació de límits segons el risc de la població a qui va destinat el producte i/o la naturalesa d'aquest, pel que fa al possible creixement de *L. monocytogenes* durant la seva vida útil.

La **Comissió del Codex Alimentarius** (CAC), va elaborar una proposta de criteris microbiològics per *L. monocytogenes* en productes RTE (CAC, 2009) basats en el risc, segons si permetien o no el creixement del patogen, definint a més el tipus d'actuació a seguir en cas de no complir amb el criteri establert (**Taula 7**).

Taula 7. Criteris microbiològics proposats per la Comissió del Codex Alimentarius en relació a *L. monocytogenes* en productes RTE (CAC, 2009).

Categoria de producte	Pla de presa de mostres		Límits		Pla d'actuació	Fase on s'aplica el criteri
	n	c	m	M		
Aliments RTE que poden afavorir el creixement de <i>L. monocytogenes</i>	5	0	Absència en 25g		2 ^o	Aliments RTE enviats del processador o port d'entrada (per productes importats), al punt de venda
Aliments RTE que no poden afavorir el creixement de <i>L. monocytogenes</i> ^b	5	0	100 CFU/g		2	

On: n= nombre de mostres representatives d'un lot que han de complir amb els criteris; c= nombre màxim admissible de mostres amb valors entre m i M (essent m = M).

^o: 2: Retirar el producte del mercat.

^b: Es determinarà en base a una justificació científica, e.g. amb factors com el pH i a_w on *L. monocytogenes* pugui ser controlada: pH < 4,4, a_w < 0,92, productes amb pH < 5,0 i a_w < 0,94 i els que es mantenen en congelació, o demostrant que *L. monocytogenes* no pot créixer més de 0,5 log CFU/g durant la vida útil esperada del producte.

En el **marc europeu**, el Reglament Europeu 2073/2005 (European Commission, 2005) i les seves posteriors modificacions², contempla criteris microbiològics de seguretat per *L. monocytogenes* en productes RTE. Aquesta normativa, classifica els productes RTE en tres grups basant-se en el risc de la població de destí i el tipus de producte, segons si permet o no el creixement de *L. monocytogenes*. Es proposen plans de mostreig i límits microbiològics més o menys rigorosos en cada cas, tal i com es mostra a la **Taula 8**.

Els explotadors de les empreses alimentàries es veuran obligats a no comercialitzar o a retirar del mercat tots aquells lots de productes que no compleixin amb els criteris de seguretat que els són d'aplicació.

Al **Canadà**, recentment es va modificar la legislació (Health Canada, 2011) per tal que els criteris fossin més similars als anteriorment citats de la CAC (2009). Aquest document es basa en una

² Disponibles a: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32005R2073:EN:NOT>

avaluació del risc, i té en compte també els resultats de les tasques d'inspecció, mostreig ambiental i anàlisi del producte final per verificar el control de *L. monocytogenes*, fent èmfasi en les etapes posteriors als tractaments bactericides o de post-letalitat (e.g. tallat a llenques i envasat) per a la preparació de productes carnis RTE.

Així, els criteris microbiològics canadencs (**Taula 9**), es defineixen en funció del tipus de producte RTE i del seu risc per la salut, i en funció d'aquests paràmetres se n'assenyala el nivell de prioritat de supervisió pel que fa a la verificació i al control dels processos de producció.

Taula 8. Criteris microbiològics de seguretat aplicables a la Unió Europea en relació a *L. monocytogenes* en productes RTE segons el Reglament Europeu 2073/2005 (European Commission, 2005).

Categoria de producte	Pla de presa de mostres		Límits		Fase on s'aplica el criteri
	n	c	m	M	
Aliments RTE destinats a lactants i per a usos mèdics especials ^a	10	0	Absència en 25g		Productes comercialitzats durant la seva vida útil
Aliments RTE que poden afavorir el creixement de <i>L. monocytogenes</i> , que no siguin els destinats a lactants ni per a usos mèdics especials	5	0	100 CFU/g ^b		Productes comercialitzats durant la seva vida útil
	5	0	Absència en 25g ^c		Abans que l'aliment deixi d'estar sota el control immediat de l'explotador de l'empresa alimentària que l'ha produït
Aliments RTE que no poden afavorir el creixement de <i>L. monocytogenes</i> , que no siguin els destinats a lactants ni per a usos mèdics especials ^a	5	0	100 CFU/g		Productes comercialitzats durant la seva vida útil

On: n= nombre de mostres representatives d'un lot que han de complir amb els criteris; c= nombre màxim admissible de mostres amb valors entre m i M (essent m = M).

^a: En circumstàncies normals, no s'exigeix realitzar proves regulars respecte aquest criteri en productes que hagin rebut un tractament tèrmic o altre procés eficaç per eliminar *L. monocytogenes*, quan la recontaminació no sigui possible després d'aquest tractament. A més, es considera automàticament que pertanyen a aquesta categoria els productes amb pH ≤ 4,4 o a_w ≤ 0,92, productes amb pH ≤ 5,0 i a_w ≤ 0,94, i els productes amb una vida útil inferior a 5 dies. També es poden considerar d'aquesta categoria altres productes, sempre que es justifiqui científicament.

^b: Aquest criteri s'aplica si el fabricant pot demostrar que el producte no superarà el límit de 100 CFU/g al final de la seva vida útil. El fabricant podrà fixar límits intermedis durant el procés, que haurien de ser suficientment baixos com per garantir que no es superi el límit de 100 CFU/g al final de la vida útil

^c: Aquest criteri s'aplica als productes abans que hagin abandonat el control immediat de l'explotador de l'empresa alimentària quan aquest no pugui demostrar que el producte no superarà el límit de 100 CFU/g durant la seva vida útil.

A **Austràlia i Nova Zelanda** els criteris aplicables actuals (FSANZ, 2000) (**Taula 10**) s'estan reavaluant, i s'ha elaborat una proposta basada en l'avaluació del risc, que enfoca els criteris microbiològics aplicables d'una forma molt similar a les directrius proposades pel Comitè del Codex Alimentarius (CAC, 2009). Així, segons l'esborrany de modificació dels criteris microbiològics, es plantegen diferents límits en funció del tipus d'aliment. D'una banda, els productes RTE que requereixen de conservació en refrigeració i permeten el creixement de *L. monocytogenes* (caldrà absència en 25g); i d'altra banda, altres productes en els que es podrà arribar a tolerar fins a 100 CFU/g (FSANZ, 2012).

Taula 9. Criteris microbiològics en relació a *L. monocytogenes* en productes RTE al Canadà (Health Canada, 2011).

Categoria de producte i fase on s'aplica el criteri	Pla de presa de mostres		Límits m M	Nivell de prioritat de supervisió ^a
	n	c		
Aliments RTE on <i>L. monocytogenes</i> pot créixer , durant la seva vida útil establerta (e.g. productes carnis selectes, formatges tous, frankfurts i patés)	5	0	Absència en 25 g	Alt
Aliments on hi ha una probabilitat limitada de creixement de <i>L. monocytogenes</i> a nivells no superiors a 100 CFU/g i que es pot donar durant la vida útil establerta ^b . (e.g. truita i salmó fumat refrigerats, productes tallats frescos, etc)	5	0	100 CFU/g	Mitjà a baix
Aliments RTE on <i>L. monocytogenes</i> no pot créixer , durant la seva vida útil establerta (e.g. gelats, formatge curat, salami, peix sec i salat, certes varietats de pernil)				Baix

On: n= nombre de mostres representatives d'un lot que han de complir amb els criteris; c= nombre màxim admissible de mostres amb valors entre m i M (essent m = M).

^a: Referent a la verificació i control per part de la indústria, així com de les activitats de supervisió i de compliment de les regulacions.

^b: Considerar-hi productes RTE que poden contenir baixos nivells del patogen i que no tenen una etapa de letalitat i/o els refrigerats amb una vida útil ≤ 5 dies (no cal validació).

^c: pH < 4,4, a_w< 0,92, productes amb pH < 5,0 i a_w< 0,94 i els que es mantenen en congelació, o demostrant que *L. monocytogenes* que no pot créixer (e.g. 0,5 log CFU/g durant la vida útil esperada del producte).

Taula 10. Criteris microbiològics aplicables als productes RTE en relació a *L. monocytogenes* a Austràlia i a Nova Zelanda (FSANZ, 2000).

Aliment RTE	Pla de mostreig		Límits m M
	n	c	
Formatges tous i semi tous Formatges de llet crua, llet no pasteuritzada i mantega Carn envasada cuïta i curada/salada Patés i pastes càrnies tractades amb calor i envasades Mol·luscs bivalves	5	0	Absència en 25g
Peixos amb aleta (<i>finfish</i>)	5	1	100 CFU/g

On: n= nombre de mostres representatives d'un lot que han de complir amb els criteris; c= nombre màxim admissible de mostres amb valors entre m i M (essent m = M).

Altres països com **Hong Kong** es regeixen per uns criteris microbiològics basats en el risc de la població a la qual van destinats i el tipus de producte, i en fan una classificació microbiològica segons la concentració en que es troba el patogen, tal i com es pot veure a la **Taula 11** (Centre for Food Safety-Hong Kong, 2007).

Taula 11. Criteris microbiològics aplicables als aliments RTE en relació a *L. monocytogenes* a Hong Kong (Centre for Food Safety-Hong Kong, 2007).

Criteri (<i>L. monocytogenes</i>)	Qualitat microbiològica			
	Classe A Satisfactòria	Classe B Acceptable	Classe C Insatisfactòria	Classe D Inacceptable
Aliments RTE refrigerats (excloent els congelats) o els destinats a infants	Absència en 25 g	N/A ^a	N/A	Presència en 25 g
Altres aliments RTE	< 20 CFU/g	Entre 20 i 100 CFU/g	N/A	≥ 100 CFU/g

^a: N/A: no aplicable

1.3.2.2 Mesures de control a nivell operacional (elaborador)

La gestió del risc associat a *L. monocytogenes* requereix de mesures al llarg de tota la cadena alimentària amb l'objectiu de (ILSI, 2005):

- a) Minimitzar la possibilitat que un aliment es contamiï amb *L. monocytogenes*.
- b) Eliminar o reduir a un nivell acceptable la presència del patògen (en cas d'una hipotètica contaminació), i
- c) Prevenir o minimitzar el seu creixement durant la vida útil del producte.

A nivell d'empresa, aquests objectius es poden assolir mitjançant diferents estratègies, com bones pràctiques de fabricació, plans d'higienització, sistemes i tecnologies de producció específiques, així com procediments basats en el sistema d'APPCC que validin i verifiquin l'eficàcia de les accions o mesures aplicades (Gorris, 2005).

Com a exemple és interessant citar les guies del govern dels Estats Units, que apliquen una estratègia particular amb la finalitat de facilitar el procés de producció i l'acompliment de les exigències de l'anteriorment citada "*Listeria Rule*". Per això, el Servei d'Inspecció i Seguretat Alimentària Americana (FSIS, de l'anglès *Food Safety Inspection Service*) va elaborar una guia, recentment actualitzada (FSIS, 2014), en la qual es proposen recomanacions específiques per als productors de productes RTE carnis i d'aus susceptibles de ser contaminats per *L. monocytogenes*. A més a més, informa sobre higiene, anàlisi i prevenció de contaminació creuada per aquest patògen en concret. El procés s'inicia un cop s'ha determinat que el producte RTE és susceptible de ser contaminat per *L. monocytogenes* (e.g. després d'un tractament de post-letalitat com seria el procés de cocció (pasteurització) en l'elaboració dels productes carnis cuits) i per tant s'ha de regir per la "*Listeria Rule*" (FSIS, 2003). La guia defineix 3 alternatives d'intervenció diferents que els establiments elaboradors de productes RTE poden implementar per tal de gestionar el risc associat a la contaminació de *L. monocytogenes*:

- L'**alternativa 1**, consisteix en aplicar un tractament de post-letalitat amb la finalitat de reduir o eliminar *L. monocytogenes* i utilitzar una substància o procés antimicrobià per tal de limitar o eliminar la possibilitat de que creixi, a més dels procediments estàndard d'higienització o SSOP (de l'anglès *Sanitation Standard Operating Procedures*).
- L'**alternativa 2** estableix, **a**) aplicar un tractament de post-letalitat per reduir o eliminar el patògen, **o b**) aplicar una substància antimicrobiana o procés antimicrobià per limitar o evitar la presència del patògen, a més dels SSOP.
- L'**alternativa 3**, no aplicar cap tipus de mesura específica addicional, sempre que es tinguin en compte unes mesures de control de *L. monocytogenes* al producte, basades en els SSOP inclosos al sistema d'APPCC.

Els establiments poden utilitzar al·legacions (prèviament validades) en l'etiquetatge dels seus productes RTE en relació al procés o substàncies que utilitzen per eliminar o reduir *L. monocytogenes* o evitar o limitar-ne el creixement. L'objectiu d'aquestes al·legacions és informar als consumidors sobre les mesures adoptades pels productors per garantir la seguretat del producte i permetre que els consumidors, amb la informació necessària, prenguin les decisions de compra amb ple coneixement de causa (FSIS, 2014).

En aquesta guia es citen dins dels tractaments de post-letalitat i d'aplicació de substàncies o processos antimicrobians, els tractaments per altes pressions i l'aplicació de bacteriocines (i.e. nisina), ambdues tecnologies objecte d'estudi de la present tesi doctoral.

1.3.2.3 Educació del consumidor

L'educació i conscienciació dels consumidors pel que fa als perills alimentaris associats als aliments RTE és bàsica per a una bona gestió del risc de *L. monocytogenes*. Aquesta educació ha de ser generalitzada, però ha d'anar sobretot dirigida a aquells individus que formen part de grups vulnerables i de risc, tals com els individus immunodeprimits, les dones embarassades, els nens i la gent gran i en conseqüència els seus cuidadors i personal sanitari associat. Així, amb una bona informació, el consumidor hauria de ser capaç de prendre decisions més correctes sobre el risc de consumir un determinat producte i hauria de saber com manipular i/o preparar un aliment concret. D'aquesta manera molts brots de toxiinfecció alimentària que es produeixen a nivell domèstic degut a males pràctiques de manipulació i conservació per desconeixement es podrien evitar (Sofos, 2008).

Com a exemple de manca de coneixement en el tema que ens ocupa, es pot citar l'estudi realitzat per Ogunmodede *et al.* (2005) als Estats Units, on van demostrar que només un 18% de les dones embarassades enquestades tenien alguna noció sobre el risc de consumir productes contaminats amb *L. monocytogenes*.

D'altra banda, en un recull d'estudis, l'EFSA (2007) va posar de manifest la mala pràctica d'emmagatzematge dels aliments peribles, en què es va determinar que les temperatures de les neveres domèstiques no són les més adequades per mantenir els productes, trobant-se la majoria entre valors de 6 i 10 °C, augmentant el risc de creixement microbiològic en productes refrigerats.

Aquests resultats demostren que els canals informatius existents s'haurien de millorar, sobretot en els grups de risc, per tal de reduir l'exposició d'aquesta població al patògen. Aquesta conscienciació per part de les autoritats sanitàries s'ha començat a estendre arreu i en els últims anys han aparegut tríptics informatius, tal i com es pot veure a la **Figura 6**.



Figura 6. Fulletons informatius en relació a *L. monocytogenes* i el consum d'aliments en grups de risc publicats recentment per diferents autoritats competents en la matèria (ACSA, 2011; FSANZ, 2013).

1.4 Tecnologies de conservació emergents

La demanda creixent per part dels consumidors d'aliments mínimament processats, amb menys additius, de conveniència (facilitat d'ús) i amb una vida útil cada vegada més llarga, suposa un repte per a la indústria en relació a la seguretat i qualitat dels aliments, i fa necessària l'aplicació de nous procediments i tecnologies de conservació innovadores. Algunes de les tecnologies d'ús emergent, amb major projecció a la indústria alimentària i que són objecte d'estudi en aquest treball són: els tractaments per altes pressions i l'ús de substàncies antimicrobianes naturals.

1.4.1 Altes pressions

Les altes pressions (hidrostàtiques) (HP o HHP, de l'anglès *High (Hydrostatic) Pressure*) són una tecnologia no tèrmica, que aplicada al tractament dels aliments, permet obtenir productes de gran qualitat, microbiològicament segurs i amb una vida útil més llarga (Patterson, 2005). El seu ús és d'especial interès en aliments amb característiques nutricionals, sensorials i funcionals termosensibles (Aymerich *et al.*, 2005).

L'efecte de les HP en el processat d'aliments es regeix per dos principis bàsics. El primer és el principi de Le Chatelier, pel qual, qualsevol fenomen o procés que vagi acompanyat d'una disminució de volum es veu afavorit per la pressió, i a l'inrevés. D'altra banda, la llei de Pascal o de la isostàtica, per la qual la pressió exercida a un aliment, independentment de la seva mida i forma, es transmet de manera instantània i uniforme a totes les seves parts (Smelt, 1998). D'aquesta manera es dona un procés temps/massa independent que, a diferència dels tractaments tèrmics, no genera un gradient, i permet que el temps de processat es redueixi considerablement (Mújica-Paz *et al.*, 2011). Tot i que es pot donar un cert escalfament degut a la compressió, aquesta tecnologia sovint rep el nom de pasteurització en fred o pascalització per altes pressions. L'increment de temperatura, quan el líquid pressuritzant és aigua, és de l'ordre de només 3 °C cada 100 megapascals (MPa) (Aymerich *et al.*, 2008). Així, a diferència dels tractaments tèrmics habituals, es pot aconseguir una inactivació microbiana, tant de microorganismes patògens com alterants, sense canvis importants en el *flavor*, la textura i el color de molts aliments (amb excepció dels productes crus com la carn fresca i el peix) (Hugas *et al.*, 2002; Morales *et al.*, 2006).

Un avantatge afegit d'aquesta tecnologia és que el tractament dels aliments, tant sòlids com líquids, es pot realitzar en productes ja envasats en el seu envàs final, per la qual cosa es minimitzen els riscos associats a una contaminació posterior al processat del producte (Garriga i Aymerich, 2009; Jung *et al.*, 2011).

1.4.1.1 Efecte sobre els microorganismes

La causa primària de la destrucció microbiana per HP és la desestabilització de la integritat funcional i estructural de la membrana citoplasmàtica (*e.g.* modificació de la permeabilitat i de l'intercanvi iònic) (McClements *et al.*, 2001). Les HP, a més, induïxen canvis morfològics, genètics i bioquímics (desestabilització de les proteïnes i dels enzims intracel·lulars, i alteració de l'equilibri de reaccions

químiques i bioquímiques) en els microorganismes que poden tenir efectes subletals o letals segons la intensitat del tractament (Mentré *et al.*, 1999; Mújica-Paz *et al.*, 2011).

Diversos autors han demostrat que el nivell d'inactivació bacteriana mitjançant tractaments per HP no només depèn de factors relacionats amb paràmetres tecnològics, sinó també del producte que es pressuritzava i del microorganisme. En general, la destrucció cel·lular augmenta quan s'incrementa la pressió i el temps d'exposició (Simpson i Gilmour, 1997a; Garriga *et al.*, 2002). La temperatura de pressurització també és un factor a tenir en compte, tot i que l'efecte no és del tot clar i depèn del tipus de microorganisme. En *L. monocytogenes* s'ha descrit un augment en la inactivació en processos d'HP a temperatures per sota i per sobre de 20 °C (Rendueles *et al.*, 2011). Amb l'ús d'altres temperatures (>50°C) no es podria parlar de pasteurització en fred, ja que aquestes actuen addicional o sinèrgicament aportant un efecte tèrmic (Patterson, 2005).

La composició de l'aliment pel que fa a la presència de proteïnes, hidrats de carboni i lípids pot tenir un efecte protector vers les HP (Simpson i Gilmour, 1997a; Molina-Höppner *et al.*, 2004). Contràriament, la presència de substàncies antimicrobianes al producte pot augmentar-ne l'efectivitat (Kalchayanand *et al.*, 1998). El pH i l'activitat d'aigua (a_w) del producte també són determinants en l'efecte de la pressió. En general, els microorganismes són més sensibles als tractaments per HP a pH àcid (Alpas *et al.*, 2000). Hi ha estudis que demostren que el pH actua sinèrgicament amb la pressió aconseguint valors d'inactivació microbiana majors, fet que s'explica en part, degut a que el pH per si mateix actua sensibilitzant les cèl·lules front les HP (Patterson, 2005). Pel que fa a la a_w , uns valors baixos es tradueixen en una major concentració de soluts que protegeixen les estructures proteïques i de membrana de l'efecte de la pressió (Oxen i Knorr, 1993; Patterson, 2005).

D'entre els diferents tipus de microorganismes, els eucariotes, com els fongs i els llevats, són els més sensibles, amb pressions lliandar d'inactivació a partir de 200 MPa (Cheftel, 1995). Entre els microorganismes procariotes, els bacteris Gram positius són més resistents que els Gram negatius degut a la diferent composició de la paret cel·lular (Smelt, 1998). La morfologia de la cèl·lula bacteriana també té importància: els bacils són més sensibles que els cocs (Hugas *et al.*, 2002). A més, cal tenir en compte que dins d'una mateixa espècie no totes les soques són igualment resistents a la pressió (Tay *et al.*, 2003; Patterson *et al.*, 2011). L'estat fisiològic del microorganisme determina també el seu comportament sota pressió, essent les cèl·lules en estat estacionari molt més resistents que les que es troben en fase exponencial de creixement (McClements *et al.*, 2001). És important conèixer les condicions a les que els microorganismes s'han exposat abans del tractament per HP, ja que les cèl·lules poden respondre de molt diferent manera. Shearer *et al.* (2010) van observar que cèl·lules de *L. monocytogenes* crescudes a 43 °C i inoculades en llet, que posteriorment va ser tractada a 400 MPa (2 minuts a 21 °C), eren més resistents a les pressions que les cèl·lules que havien crescut entre 10 i 25 °C. L'estrès de la cèl·lula previ al tractament (*e.g.* congelació, estrès osmòtic, oxidatiu, acidificació, esgotament dels nutrients o *starving*) és important, ja que s'ha demostrat que el nivell de supervivència de microorganismes pressuritzats és més alt en cèl·lules prèviament estressades per un xoc per fred o per calor que les mantingudes en condicions òptimes (Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002; Tasara i Stephan, 2006; Hayman *et al.*, 2008).

Les espores bacterianes són les formes més resistents a l'acció de la pressió, ja que calen tractaments de més de 1.000 MPa per inactivar-les. Tractades a pressions més baixes i sovint en combinació amb altes temperatures, s'aconsegueix sensibilitzar-les, estimulant-ne la germinació i posteriorment perden la viabilitat per l'acció de la pressió (Smelt, 1998; Bermúdez-Aguirre i Barbosa-Cánovas,

2011). Els virus degut a la seva coberta proteica, en general presenten una protecció limitada (Bermúdez-Aguirre i Barbosa-Cánovas, 2011). Alguns bacteriòfags s'inactiven a pressions d'entre 300 i 400 MPa (Brauch *et al.*, 1990). Tot i així, la gran diversitat estructural que presenten els virus fa que es pugui observar un ampli rang de resistència a la pressió (Smelt, 1998). Els prions poden arribar a ser més resistents que les espores bacterianes, amb la qual cosa és necessària la combinació de pressió i temperatura. En alguns casos tractaments de més de 700 MPa a 60 °C durant 2 hores han aconseguit disminuir la infectivitat dels prions (Fernández García *et al.*, 2004) però en altres casos, han calgut pressions i temperatures encara més altes (690-1200 MPa a temperatures d'entre 121 i 137 °C) per inactivar prions inoculats en carn (Brown *et al.*, 2003).

L'efecte antimicrobià de les HP en productes carnis RTE ha sigut objecte d'una gran diversitat d'investigacions, tant a nivell de microorganismes alterants del producte com de patògens. Alguns dels estudis que s'han trobat a la literatura relacionats amb els efectes de les HP en *L. monocytogenes* inoculada en productes carnis RTE es troben resumits a la **Taula 12**.

En termes d'inactivació immediata, es pot observar que la reducció logarítmica aconseguida mitjançant tractaments per HP, en general, és força més alta en els productes carnis cuits i els curats-fermentats amb alta a_w que en els productes curats i els curats-fermentats amb baixa a_w . Per tant, és important considerar el tipus de producte i les seves característiques fisicoquímiques. En productes carnis tractats per HP però, no sempre s'aconsegueix una eliminació del risc de *L. monocytogenes*, ja que les cèl·lules supervivents, subletalment danyades o no, poden recuperar-se i créixer si troben les condicions òptimes (*e.g.* temperatura, nutrients, pH i a_w) constituint un risc potencial per al consumidor (Bozoglu *et al.*, 2004; Ritz *et al.*, 2006). Per tant, els productes carnis peribles (*e.g.* cuits) requereixen d'un emmagatzematge en refrigeració per tal de mantenir-ne l'estabilitat microbiològica, així com les característiques sensorials (Rendueles *et al.*, 2011). Així doncs pren força també la necessitat d'estudi del comportament d'aquest patògen durant la vida útil del producte. A la **Taula 12**, es pot observar que l'evolució del patògen durant l'emmagatzematge posterior es dona únicament en els productes cuits, on s'observa una recuperació, que en alguns casos ha arribat a nivells de més de 8 log CFU/g. En canvi en els productes curats, on els nivells de *L. monocytogenes* eren quantificables, el patògen no ha crescut en cap cas, i fins i tot els seus nivells s'han vist reduïts en més d'una unitat logarítmica, possiblement degut a les condicions adverses que troba el patògen en el producte.

La gran majoria de treballs disponibles a la literatura científica s'han realitzat mitjançant assajos d'inoculació de *L. monocytogenes* en productes de característiques, condicions de processat i emmagatzematge molt concretes (Simpson i Gilmour, 1997b; Mussa *et al.*, 1999; Lucore *et al.*, 2000; Koseki *et al.*, 2007; Pal *et al.*, 2008; Myers *et al.*, 2013a). Els resultats obtinguts, malgrat mostrar l'efectivitat i l'interès de la tecnologia, són poc versàtils i difícilment extrapolables a altres productes, tractaments o condicions de conservació.

Altres treballs també han estudiat l'efecte dels tractaments per HP en aquest patògen des de l'enfoc de la modelització matemàtica. Aquests estudis però, bàsicament s'han realitzat en medi de cultiu o matrius líquides, condicions que generalment no s'ajusten al que succeeix en matrius càrnies. Únicament Koseki *et al.* (2007) van desenvolupar un model probabilístic sobre la recuperació de *L. monocytogenes* inoculada en pèril cuit tractat per HP (500 – 600 MPa/10 min) emmagatzemat a 10 °C. Per la qual cosa, són necessàries més investigacions en aquest camp, com les que s'inclouen en la present memòria, on s'aporten noves dades de quantificació i modelització de la inactivació

assolida a diferents tractaments per HP, i de modelització del comportament posterior durant l'emmagatzematge, en diferents productes carnis cuits RTE.

Taula 12. Recull d'informació bibliogràfica sobre l'efecte de les altes pressions en *L. monocytogenes* en productes carnis RTE, en termes de reducció immediata i comportament durant el posterior emmagatzematge en refrigeració mitjançant assajos d'inoculació (*challenge tests*).

Producte (pH / a _w) ^o	Tractament HP	Nombre de soques inoculades	Nivell d'inòcul (log CFU/g)	Reducció immediata (log N ₀ /N)	Evolució durant l'emmagatzematge (dies a T°C)	Referència
Curats						
Pernil ibèric (5,9 / 0,90)	450 MPa, 10 min, 12°C	1	~6	1,5	Reducció d'1 log (60 dies a 4°C) Reducció de 2 logs (60 dies a 8°C)	(Morales <i>et al.</i> , 2006)
Pernil Serrano (5,61 / 0,88)	450 MPa, 10 min, 12°C	1	~6	~1	Reducció de 2,1 logs (60 dies a 4°C) Reducció de 2,66 logs (60 dies a 8°C)	
Pernil curat (5,88 / 0,92)	600 MPa, 6 min, 31°C	3	~3,5	<LQ ^b	Es manté <LQ (120 dies a 4°C)	(Jofré <i>et al.</i> , 2009b)
Pernil curat fumat (5,84 / 0,94)	600 MPa, 5 min, 13°C	3	~1	<LQ	Es manté <LQ (38 dies a 4°C + 74 dies a 8°C)	(Stollewerk <i>et al.</i> , 2012)
Curats-fermentats						
Fuet (-)	400 MPa, 10 min, 17°C	3	6,6 ^c	0,6	Sense canvis significatius (13 dies a 7°C) Reducció d'1,5 logs (13 dies a 22°C)	(Jofré <i>et al.</i> , 2009a)
Salami (- / 0,88)	483 MPa, 5 min, 19°C	5	5,8	2,2	Reducció de 0,6 logs (28 dies a 4°C)	(Porto-Fett <i>et al.</i> , 2010)
	600 MPa, 5 min, 19°C	5	5,8	2,4	Reducció de 0,9 logs (28 dies a 4°C)	
Salami (- / 0,93)	483 MPa, 5 min, 19°C	5	6,1	3	Reducció fins a nivells <LQ (28 dies a 4°C)	
	600 MPa, 5 min, 19°C	5	6,1	3,9	Reducció fins a nivells <LQ (28 dies a 4°C)	
Cuits						
Pernil cuit (-)	400 MPa, 10 min, 17°C	3	2,5	1,8	Sense canvis significatius (40 dies a 6°C) i creix fins a 6,3 log CFU/g (84 dies a 6°C)	(Aymerich <i>et al.</i> , 2005)
			2,5	1,8	Creix fins a 1,2 log CFU/g (84 dies a 1°C)	
Pernil cuit (-)	400 MPa, 10 min, 17°C	3	4,5	1,8	Creix fins a 6,5 log CFU/g (90 dies a 6°C)	(Jofré <i>et al.</i> , 2007)
Pernil cuit (-)	400 MPa, 10 min, 17°C	3	4	3,4	Reducció fins a nivells <LQ (fins dia 8 a 6°C), creix fins a 8,6 log CFU/g (14 dies a 6°C)	(Marcos <i>et al.</i> , 2008)
			4	2,3	Reducció fins a nivells <LQ (60 dies a 1°C)	
Pernil cuit (-)	400 MPa, 15 min	3	~3	- ^d	Creix fins a 8,6-9,9 log CFU/g (45 dies a 12°C)	(Pal <i>et al.</i> , 2008)
			~4	-	Creix fins a 8,9-9,2 log CFU/g (60 dies a 8°C)	

Taula 12. Continuació.

Producte (pH/a _w) ^a	Tractament HP	Nombre de soques inoculades	Nivell d'inòcul (log CFU/g)	Reducció immediata (log N ₀ /N)	Evolució durant l'emmagatzematge (dies a T°C)	Referència
Pernil cuït (-)	400 MPa, 15 min	3	~4	-	Creix fins a 7,5-9,1 log CFU/g (90 dies a 4°C)	(Pal <i>et al.</i> , 2008)
Pernil cuït (6,3 / 0,98)	500 MPa, 10 min, 25°C	1	5	<LQ	Creix fins a 7,5 log CFU/g (70 dies a 10°C)	(Koseki <i>et al.</i> , 2007)
	600 MPa, 10 min, 25°C	1	5	<LQ	Es manté <LQ (30 dies a 10°C), creix fins a 7 log CFU/g (70 dies a 10°C)	
Pernil cuït (6,28 / 0,98)	600 MPa, 5 min, 10°C	3	4	<LQ	Es manté <LQ (90 dies a 1 i 6°C)	(Jofré <i>et al.</i> , 2008)
Pernil cuït (6,11 / 0,98)	600 MPa, 6 min, 31°C	3	3,5	<LQ	Es manté <LQ (120 dies a 4°C)	(Jofré <i>et al.</i> , 2009b)
Pernil cuït (6,40 / -)	600 MPa, 3 min, 17°C	5	5	4,2	-	(Myers <i>et al.</i> , 2013b)
Pit de gall d'indi cuït (-)	400 MPa, 15 min	3	~3,5	-	Creix fins a 9,1-10,2 log CFU/g (45 dies a 12°C)	(Pal <i>et al.</i> , 2008)
			~3	-	Creix fins a 9,3-9,9 log CFU/g (60 dies a 8°C)	
			~4	-	Creix fins a 9,1-9,4 log CFU/g (90 dies a 4°C)	
Pit de pollastre cuït (-)	600 MPa, 2 min, 20°C	4	~3	<LQ (1,7 log CFU/g)	Creix fins més de 8 log CFU/g (entre dies 7 i 20 a 8°C) i es manté fins a dia 105	(Patterson <i>et al.</i> , 2011)
Vedella cajún (6,10-6,34 / 0,97)	600 MPa, 3 min, 20°C	5	4	<LD ^c (0,04 log CFU/g)	Es manté <LD (95 dies a 4°C)	(Hayman <i>et al.</i> , 2004)
"Altres" alta a_w						
Llom vedella marinat (6,26 / 0,99)	600 MPa, 6 min, 31°C	3	3,5	<LQ	Reducció fins a nivells <LD (120 dies a 4°C)	(Jofré <i>et al.</i> , 2009b)

^a: S'inclouen els valors de pH i a_w, si la informació està disponible en el treball publicat.

^b: <LQ: sota el límit de quantificació (1 log CFU/g, a menys que no s'indiqui un altre valor).

^c: Concentració de *L. monocytogenes* en producte just abans del tractament per HP.

^d: (-) El valor de reducció immediata o d'evolució durant l'emmagatzematge no es determina.

^e: <LD: sota el límit de detecció (0,04 log CFU/g = absència en 25g).

1.4.1.2 Aplicació industrial

L'aplicació de les HP en el camp de la tecnologia alimentària es coneix des de 1899, quan Hite (1899) va demostrar que mitjançant aquesta tecnologia es podia allargar la vida útil de la llet. Tanmateix, no és fins a principis dels anys 90 que la tecnologia de les HP s'implanta industrialment per primera vegada per a la producció de purés de fruites al Japó (Considine *et al.*, 2008). Des de llavors, i

concretament a partir del segle XXI, aquesta tecnologia ha reemergit, i el seu ús ha experimentat un creixement constant, especialment a les indústries de productes d'origen vegetal i carnis (**Figura 7**). L'increment en el nombre d'equips industrials adquirits per empreses del sector alimentari demostra el gran interès i l'augment del reconeixement i la confiança dels beneficis que aporta aquesta tecnologia a la indústria alimentària, tot i l'elevat cost de la maquinària (Hernando *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2011).

Actualment, els tractaments comercials més interessants a nivell higiènic, sanitari i sobretot econòmic comprenen la combinació de pressions entre 400 - 600 MPa, a temperatura ambient i en cicles curts de temps de menys de 10 minuts (Bajovic *et al.*, 2012).

Pel que fa a l'aplicació industrial en el sector carni, l'ús d'aquesta tecnologia s'ha vist afavorida a fi de poder garantir el compliment de les exigències derivades de la política de tolerància zero en relació a *L. monocytogenes* en productes RTE i la problemàtica que comporta aquest patògen per a la salut de la població. La **Taula 13** recull algunes de les empreses càrnies que actualment utilitzen tractaments per HP per als productes que comercialitzen.

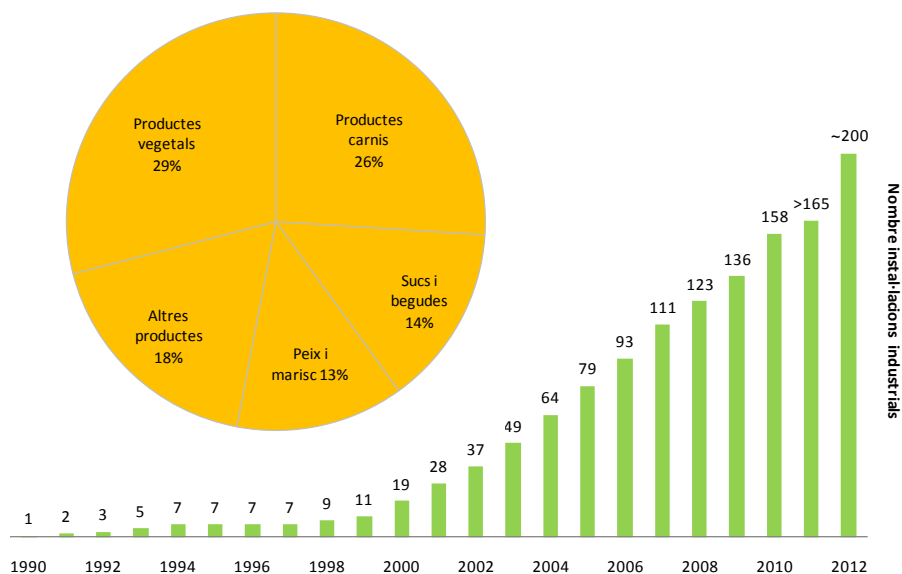


Figura 7. Increment mundial en nombre d'equips de tractament per HP durant els últims anys i estimació de l'ús de la tecnologia en els diferents sectors de la indústria alimentària durant l'any 2012. Adaptat de Tonello (2012).

Taula 13. Empreses del sector carni a nivell mundial que utilitzen les altes pressions. Adaptat de Jung *et al.* (2011).

Empresa	Producte tractat	País
Abraham	Pernils curats i fumats	Alemanya
Campofrío	Curats llescats	Espanya
Cooper Farms	Cuits sencers i llescats d'aviram i pernil cuit	EUA
DuBreton	Pernil cuit	Canadà
España	Cuits i curats i tapes	Espanya
Fosters Farms	Cuits i llescats d'aviram	EUA
Hormel Foods Corp.	Cuits i curats llescats	EUA
Ifantis	Cuits i curats llescats	Grècia
Iotham	Productes llescats naturals	Japó
Maple Lodge Farms Ltd.	Cuits i llescats d'aviram	Canadà
Martiko	Productes carnis	Espanya
MRM	Productes cuits	Espanya
Organic Prairie	Cuits i fumats llescats	EUA
Perdue Farms Inc.	Cuits i llescats d'aviram	EUA
Sadler's Smokehouse	Carn fumada	EUA
Schwarz Cranz	Cuits, curats i fumats llescats	Alemanya
Wellshire Farms Inc.	Productes cuits	EUA
Zwanenberg	Plats preparats RTE, <i>steak tàrtar</i> i <i>carpaccio</i>	Holanda

1.4.1.3 Status legal dels productes tractats per altes pressions hidrostàtiques

Els productes tractats per HP es podrien considerar “*novel foods*” o nous aliments segons la legislació europea i concretament segons el Reglament Europeu 258/1997 (European Commission, 1997), ja que en general:

- No tenen un històric de consum humà important a la Comunitat Europea, anterior al 15 de maig de 1997.
- S'han obtingut mitjançant un nou procés de producció.

No obstant, i seguint la reglamentació esmentada i simplificada (Norton i Sun, 2008), en els casos que sigui possible demostrar que el nou producte és “substancialment equivalent” a un producte que ja es troba comercialitzat, mitjançant un procés d'avaluació del risc tenint en compte qüestions microbiològiques, toxicològiques, nutricionals, d'ús previst i d'aspectes al·lèrgics, aquest nou producte no caldrà tractar-lo com a “*novel food*”, i per tant no haurà de regir-se per la normativa aplicable a aquest tipus de productes (Hugas *et al.*, 2002).

En aquest sentit, la Comissió del Senat en Seguretat Alimentària (SKLM, de l'alemany *Senatskommission zur gesundheitlichen Bewertung von Lebensmitteln*) de la Fundació Alemanya de Recerca (DFG, de l'alemany *Deutsche Forschungsgemeinschaft*) va emetre la seva opinió pel que fa als aspectes generals de l'avaluació del risc dels productes tractats per HP, determinant que els estudis sobre els efectes de les HP no mostren cap evidència de risc microbiològic, toxicològic o al·lèrgic. Tanmateix, reconeixen que no es pot fer una generalització per a tots els aliments i calen estudis individuals exhaustius per a cada nova categoria de productes (Eisenbrand, 2005). Així, diversos estudis realitzats en diferents productes com el suc de taronja (França), el pernil cuit (Espanya) i les ostres (Gran Bretanya) demostren l'equivalència substancial entre els productes tractats per HP i els no tractats. D'aquesta manera, aquests productes tractats per HP no es

considerarien com a “*novel foods*”, i per tant es podrien comercialitzar directament (Eisenbrand, 2005).

L’AESAN (2005) va concloure que els tractaments per HP en carn i productes carnis no permeten assolir l’esterilització del producte tot i que sí que l’higienitzen, assimilant-lo als tractaments de pasteurització tèrmica.

Al **Canadà** la comercialització d’aquests productes també es troba explícitament reconeguda i legislada. En aquest sentit, l’agència de salut canadenca va publicar una guia (Health Canada, 2012) que permet identificar si un producte tractat per HP s’ha de considerar un “*novel food*”, entès aquest com un producte que s’ha fabricat, preparat, mantingut i envasat mitjançant un procés:

- No utilitzat mai abans en el producte en qüestió.
- I el qual genera en el producte un canvi important.

Aquesta guia permet també als productors determinar si el seu producte tractat per HP es considera com a nou i, per tant, requereix d’una avaluació del risc per part de la mateixa agència abans de posar-lo a la venda.

Tanmateix, la *Health Canada* l’any 2007, també va emetre unes recomanacions vers els tractaments per HP, per les quals regulava i permetia el tractament per altes pressions (cicles de 600 MPa entre 2 i 27 minuts) de productes RTE carnis i d’aviram, com a tractament per reduir els nivells de *L. monocytogenes* (Health Canada, 2007).

Als **Estats Units**, on aquesta tecnologia es proposa com a possible tractament de post-letalitat (FSIS, 2014), no existeix una regulació específica per als productes tractats per HP. Els requeriments són similars als que es demanen per a processos tradicionals de pasteurització o esterilització, i les autoritats competents com la FDA i l’ USDA (de l’anglès *Food and Drug Administration* i *United States Department of Agriculture*, respectivament) en fan una avaluació i en valoren la seguretat. L’aprovació de l’ús de les HP com a operació de post-tractament per eliminar *L. monocytogenes* en productes RTE envasats data del 2003 (Professional Research Organization Inc, 2003).

1.4.2 Bioconservació

Es defineix com a bioconservació “l’increment de la vida útil i de la seguretat sanitària dels aliments utilitzant la seva microbiota natural o controlada i/o els seus metabòlits antimicrobians” (Hugas, 2001). El seu interès sorgeix a partir de la tendència general de la població que demana productes més segurs, mínimament processats i amb un baix nivell d’additius afegits.

La bioconservació centra gran part de la seva investigació en l’efecte de productes antimicrobians naturals sintetitzats per LAB (bacteris de l’àcid làctic) tals com els àcids orgànics i les seves sals (e.g. lactat, acetat/diacetat), el peròxid d’hidrogen, el diòxid de carboni, el diacetil, l’etanol i les bacteriocines (Hugas, 2001). Les bacteriocines en general, i la nisina en particular, que ha estat objecte d’estudi en aquesta tesi, es poden aplicar als aliments de diverses maneres: a través de l’addició del cultiu iniciador del microorganisme productor de la bacteriocina, directament a la massa càrnia i/o sobre la superfície de l’aliment o bé com a envasat actiu formant part de l’envàs (vegeu apartat 1.4.3) (Coma, 2008).

1.4.2.1 Nisina

La nisina és una bacteriocina, produïda per *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que presenta activitat antimicrobiana d'ampli espectre contra bacteris Gram positius. És especialment efectiva contra esporulats com *Clostridium* i contra *L. monocytogenes*. D'altra banda, presenta poca o nul·la activitat inhibidòria enfront de bacteris Gram negatius, llevats i fongs, tot i que poden presentar certa sensibilitat quan la permeabilitat de la membrana cel·lular està alterada per altres substàncies o degut a algun altre procés (*e.g.* tractaments per HP) (Boziaris i Adams, 2000).

El mode d'acció de la nisina consisteix en la desestabilització funcional de les membranes citoplasmàtiques dels bacteris. Aquesta desestabilització es realitza en 3 etapes diferenciades segons s'il·lustra a la **Figura 8**: unió a la membrana (1), inserció en aquesta (2) i formació de porus (3), els quals faciliten la sortida de fluids citoplasmàtics, conduint a la mort cel·lular (Millette *et al.*, 2007).

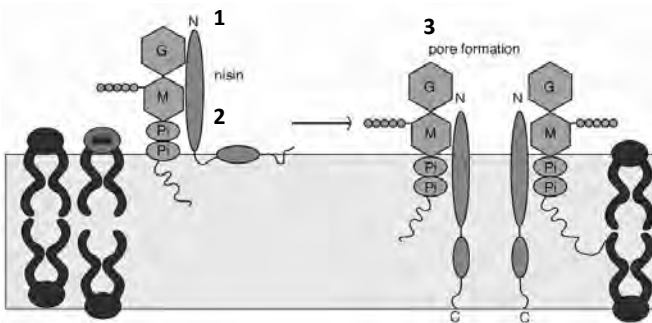


Figura 8. Representació esquemàtica del mode d'acció de la nisina sobre la paret cel·lular. Imatge reproduïda amb permís de l'autor (Wiedemann *et al.*, 2001).

Diversos estudis han demostrat que l'aplicació d'aquesta bacteriocina en carn fresca i productes carnis (*e.g.* fermentats i cuïts) altera de manera efectiva el comportament de *L. monocytogenes*. En alguns casos s'observa una reducció dels nivells del patògen durant els primers dies, en altres augmenta significativament la durada de la fase de latència tal i com es pot veure com a exemple a la **Figura 9**. En conseqüència, la nisina aconsegueix allargar la vida útil segura dels aliments on s'aplica (Nielsen *et al.*, 1990; Degnan *et al.*, 1992; Hugas *et al.*, 1995; Aymerich *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2005; Marcos *et al.*, 2006; Lopez-Mendoza *et al.*, 2007; Jofré *et al.*, 2008; Moon *et al.*, 2011).

La nisina comercialitzada sol contenir un 2,5% de component actiu, corresponent a una activitat microbiana de 1.000 IU/mg (IU= *International Units*, 1 mg de nisina pura equival a 40.000 IU) (Delves-Broughton, 1990).

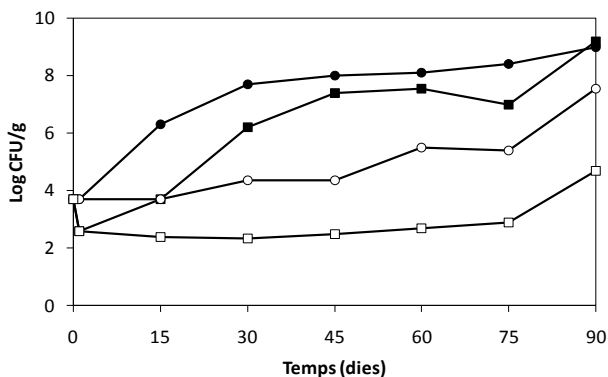


Figura 9. Comportament de *L. monocytogenes* inoculada en pernil cuit formulat amb (■, □) o sense (●, ○) nisina (800 AU/g), emmagatzemat durant 90 dies a 1°C (símbols buits) i 6°C (símbols plens). Adaptat de Jofré *et al.* (2008).

La nisina és l'única bacteriocina autoritzada com a additiu alimentari (European Commission, 2010) amb el codi E-243 (MSC, 2002; MSPSI, 2011). El seu ús està restringit com a conservant en postres a base de semolina i tapioca (màx. 3 mg/kg), formatge fos i formatge curat (màx. 12,5 mg/kg), mascarpone i "clotted cream" (màx. 10 mg/kg) i ou líquid pasteuritzat (màx. 6,5 mg/l). Així, en l'àmbit europeu, la nisina no està permesa per a l'elaboració o conservació de productes carnis. Als EUA, la nisina està declarada com a GRAS (*Generally Recognized As Safe*) i se'n permet el seu ús com a agent antimicrobià en cobertura per frankfurts (6,9 mg/kg en el producte acabat), i com a additiu conservant en algunes carns cuites i productes d'aviram (5,5 mg/kg) (FDA, 1988). A Austràlia, Nova Zelanda i al Japó, la legislació també n'autoritza l'addició en productes carnis (12,5 mg/kg) (Japan Ministry of Health and Welfare and Japan Food Chemical Research Foundation, 2000; FSANZ, 2007).

1.4.3 Envasat actiu

L'envasat actiu és un concepte relativament innovador, l'ús del qual actualment està regulat pels Reglaments Europeus 1935/2004 i 450/2009 (European Parliament and the Council of the European Union, 2004; European Commission, 2009). Es pot definir com un tipus d'envasat on l'envàs, el producte i l'entorn interaccionen per allargar la vida útil dels aliments, millorar-ne les propietats organolèptiques i/o la seguretat alimentària i mantenint la qualitat del producte (Suppakul *et al.*, 2003). Aquest tipus d'envasat permet millorar la funcionalitat de l'embolcall del producte mitjançant l'addició d'una substància activa al material d'envasat (Appendini i Hotchkiss, 2002), que pot, per exemple, absorbir l'oxigen, controlar la concentració de diòxid de carboni o etilè, alliberar etanol o antioxidants, regular la humitat o controlar el creixement de microorganismes (Pereira de Abreu *et al.*, 2012).

Alguns dels agents antimicrobians utilitzats en l'envasat actiu d'aliments són el diòxid de carboni, alcohols, els ions de plata, els àcids orgànics, sulfits, nitrats, i altres antimicrobians naturals com els olis essencials de plantes i espècies i les bacteriocines com la nisina (Coma, 2006). Aquestes

substàncies com que poden migrar cap a l'aliment es consideren additius alimentaris i, per tant, han de regir-se per la legislació vigent en matèria d'additius, en el cas d'Espanya pel Reial Decret 142/2002 (MSC, 2002).

Quan les substàncies antimicrobianes i, en particular la nisina, s'incorporen al material d'envasat destinat a estar en contacte amb l'aliment s'obté un envàs antimicrobià. Aquest tipus d'envàs afavoreix l'augment de la vida útil del producte i redueix el risc associat a alguns microorganismes patògens, ja que les bacteriocines migren des del material d'envasat cap a l'aliment de manera gradual durant l'emmagatzematge i la distribució. D'aquesta manera el creixement dels patògens afectats es limita o s'inhibeix, ja sigui degut a l'allargament de la fase de latència, a la reducció de la taxa de creixement i/o fins tot a la reducció de recomptes (Quintavalla i Vicini, 2002).

Els materials més estudiats i alhora utilitzats en aquesta nova tecnologia són polímers de fàcil obtenció com biopolímers que s'obtenen mitjançant l'extracció directa de fonts naturals (alginat i zeïna, cel·lulosa), o polímers biodegradables que s'obtenen per síntesi química (polivinil alcohol). Ambdós tipus són biodegradables, per la qual cosa contribueixen a reduir els problemes mediambientals derivats de l'ús excessiu de materials plàstics en el sector alimentari (Quintavalla i Vicini, 2002).

En aquesta tesi que es presenta s'ha utilitzat el polivinil alcohol (PVOH) per a l'elaboració de films separadors actius (amb nisina incorporada). Aquest és un polímer sintètic i soluble a l'aigua que es considera un additiu indirecte als EUA i, utilitzat en forma de film, pot estar en contacte amb la superfície dels aliments (FDA, 1977). A Europa, l'EFSA també va concloure que aquest producte no suposa un risc per a la seguretat dels consumidors (EFSA, 2005).

Aquesta tecnologia d'envasat és molt atractiva per al sector carni, i en concret pels productes RTE, ja que utilitzant-se com a recobriments comestibles o com a films separadors de llenques, resulta efectiva per prevenir el creixement microbià procedent de la contaminació superficial dels aliments que es dona normalment durant les operacions de post-processat (Han, 2005). Diversos autors han demostrat l'efectivitat de la nisina aplicada mitjançant envasat actiu vers *L. monocytogenes* en productes carnis cuits RTE (Janes *et al.*, 2002; Franklin *et al.*, 2004; Marcos *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2008; FSAI, 2011). Nguyen *et al.* (2008), per exemple, van observar una reducció de 2 unitats logarítmiques en 2 dies d'emmagatzematge a 4 °C respecte el lot control en frankfurts envasats amb films de cel·lulosa impregnats amb nisina (2500 IU/g). La diferència del lot tractat amb el lot no tractat es va mantenir fins al final de l'emmagatzematge (14 dies).

Tanmateix, l'ús de la nisina en general i, també formant part d'envasat actiu antimicrobià, amb l'objectiu de millorar la seguretat dels productes carnis curats ha estat poc estudiat.

1.4.4 Tecnologia de barreres

La tecnologia de barreres (*hurdle technology*) es basa en l'aplicació d'una combinació de diversos factors conservants (anomenats barreres o obstacles) que els microorganismes presents als aliments són incapaços de vèncer (Leistner, 1978). L'efecte barrera és fonamental per a la conservació dels aliments, i entenent aquest concepte, s'ha pogut desenvolupar la tecnologia de barreres. Amb aquesta tecnologia, la combinació intel·ligent d'obstacles pretén assegurar l'estabilitat i seguretat microbiana, mantenint les propietats tecnològiques, sensorials i nutritives dels aliments, ja que la

intensitat dels tractaments aplicats i/o la concentració de substàncies afegides es pot reduir (Leistner i Gorris, 1995).

Els mètodes de conservació dels aliments, en general, i la tecnologia de barreres, en concret, impliquen sotmetre els microorganismes a condicions hostils per tal d'inhibir el seu creixement i escurçar la seva supervivència o provocar la seva destrucció. Existeix la possibilitat que diferents barreres no només tinguin efectes additius sinó que actuïn sinèrgicament. Aquest efecte sinèrgic es pot aconseguir si les barreres afecten a diferents parts o dianes de la cèl·lula microbiana, afectant a la homeòstasi dels microorganismes en diversos sentits. A efectes pràctics, això vol dir que és més efectiu utilitzar més d'un tipus de factor conservador (barrera) en petites dosis o intensitats que només una en gran quantitat. Per il·lustrar aquest efecte sinèrgic, la **Taula 14** mostra els resultats obtinguts per Chung *et al.* (2005), on es combinaven els tractaments HP (600 MPa a 28 °C durant 5 min) i l'aplicació de nisina (100 IU/g) en salsitxes cuites inoculades amb *L. monocytogenes* (c.a. $5,5 \cdot 10^6$ CFU/g). La reducció del patògen per sota del límit de detecció es va aconseguir en el 70-90% de les mostres quan es van combinar els tractaments, mentre que només en un 5-15% amb l'aplicació d'HP i en cap mostra (100% de presència) quan únicament es va aplicar nisina.

Taula 14. Percentatge de presència/absència de *L. monocytogenes* en mostres de salsitxes cuites tractades per HP (600 MPa a 28 °C durant 5 min) i/o en combinació amb nisina (100 IU/g) (Chung *et al.*, 2005).

Condicions de tractament	Presència (%)	Absència (%)
Nisina	100	0
HP	85-95	5-15
nisina + HP	10-30	70-90

Els obstacles (factors conservadors) poden ser de naturalesa física, química o biològica, i es poden aplicar als aliments de manera seqüencial i/o simultàniament. Els obstacles més freqüentment utilitzats, que s'apliquen tant com a part del procés de producció o com a additius, inclouen la temperatura (alta o baixa), l' a_w baixa, l'acidesa, el potencial redox baix, els conservants (nitrit, sulfat, lactat, etc.), així com la microbiota competitiva (LAB) (Leistner, 2000).

En el cas particular del pernil curat, el primer obstacle que troben la majoria de microorganismes és la concentració de sal i de nitrits durant el procés de salat. Posteriorment, durant l'assecat, l'activitat d'aigua és el factor limitant per al creixement microbià, ja que els seus valors van disminuint fins a valors per sota de 0,90 (Bello Gutiérrez, 2008).

El pernil cuit també es formula i elabora mitjançant una combinació d'obstacles que a mesura que es van afegint, fan més difícil la supervivència i el creixement de microorganismes (**Figura 10**).

La combinació de les tècniques tradicionals i les tècniques de conservació emergents poden establir barreres més efectives contra el creixement microbià indesitjat. Els tractaments per altes pressions hidrostàtiques han estat objecte de molts estudis, ja que combinats amb altres obstacles convencionals tenen un gran potencial per a l'estabilització microbiològica de productes mínimament processats. De la mateixa manera, la combinació de bacteriocines amb altres mètodes de

conservació poden ser un sistema eficaç per inhibir el desenvolupament de bacteris patògens com *L. monocytogenes* en aliments.

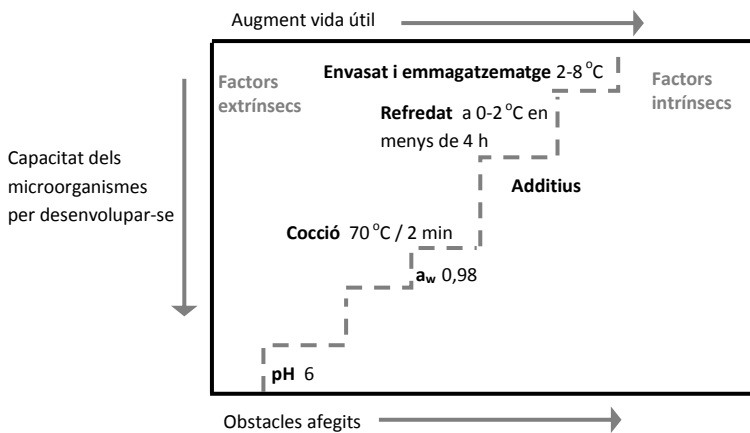


Figura 10. Combinació d'obstacles en el procés de producció del pernil cuit. Adaptat de FSAI (2005).

El concepte, de fet, es va desenvolupar en el sector carni coneixedor de la importància de l'aplicació conscient de diferents barreres per a la producció d'embotits fermentats autoestables (Leistner, 2007). L'aparició de factors conservadors nous o emergents (*e.g.* HP, bioconservació, envasat actiu, etc.) sovint es desenvolupa en el marc d'aquest concepte de la tecnologia de barreres.

Concretament, en els tractaments combinats d'HP i bacteriocines s'observa un augment del grau d'inactivació de les cèl·lules que han sobreviscut a la pressió. Aquestes han patit danys subtils i moren després per l'acció de les bacteriocines (Garriga *et al.*, 2002).

Per tant, la comprensió de la resposta microbiana davant dels obstacles és fonamental per a poder dissenyar estratègies efectives basades en la tecnologia de barreres.

1.5 Eines per avaluar la seguretat microbiològica durant la vida útil dels aliments RTE

El Reglament Europeu 2073/2005 (European Commission, 2005) defineix la vida útil com el període anterior a la data de durada mínima o "data de caducitat", essent aquesta la data fins la qual el producte alimentari manté les seves propietats específiques en condicions de conservació adequades, tal i com defineix el Reglament Europeu 1169/2011 (European Parliament and of the Council, 2011). L'establiment i per tant, el control de la vida útil dels aliments és responsabilitat de l'explotador de l'empresa alimentària, i constitueix una de les principals mesures que aquests han d'adoptar per a garantir el compliment dels criteris microbiològics de seguretat alimentària (European Commission, 2005).

A l'Annex II del citat Reglament es descriuen els tipus d'estudis que han de realitzar els productors, quan sigui necessari, per tal de poder demostrar els criteris microbiològics aplicables durant tota la vida útil del producte, especialment en aquells que són RTE i en referència a *L. monocytogenes*. Aquests estudis es basen en la caracterització del producte i les condicions de conservació, la consulta de dades de la literatura en relació al creixement i supervivència del patogen en les condicions caracteritzades, l'històric de dades del producte fabricat, l'ús de la microbiologia predictiva i els assaigs de laboratori, tant d'inoculació com de durabilitat del producte.

Les guies d'interpretació de la normativa (vegeu apartat 1.5.3) i també l'arbre de decisió que es presenta a la **Figura 11** poden ser de gran ajuda per a la realització d'aquest tipus d'estudis.

1.5.1 Caracterització del producte, revisió bibliogràfica i històric de dades

En primer lloc, cal tenir informació sobre el producte, en relació a les característiques intrínseques i extrínseques. Per tant, caldrà saber-ne les propietats fisicoquímiques (e.g. pH, a_w) i de composició (concentració de sal, conservants, etc.) tenint en compte la variabilitat que pot existir dins i entre lots, així com també el tipus d'envasat. El productor també hauria de conèixer les condicions raonablement previsibles de distribució, conservació (emmagatzematge) i utilització que tindrà el producte durant tota la seva vida útil. Tots aquests factors determinaran la supervivència i desenvolupament dels microorganismes patògens i deteriorants en el producte (FSAI, 2011).

Amb la informació sobre les característiques del producte, per exemple, ja es podria determinar si el producte no afavoreix el creixement de *L. monocytogenes*, e.g.: $\text{pH} \leq 4,4$; $a_w \leq 0,92$ o $\text{pH} \leq 5,0$ i $a_w \leq 0,94$ (European Commission, 2005), per la qual cosa es podria incloure a la categoria de productes que no en permeten el creixement.

Posteriorment, cal consultar dades existents a la literatura (llibres, publicacions científiques, informes d'organismes oficials, bases de dades informàtiques sobre el comportament de patògens com per exemple el ComBase (www.combase.cc)) en relació a la supervivència i creixement del patogen, en unes condicions concretes equivalents a les del producte i la seva conservació.

A més a més, el productor pot recórrer al seu històric de dades recopilat al llarg del temps, amb verificacions fetes al producte final, així com al final de la seva vida útil.

Si la informació aportada, per les dades sobre caracterització del producte, la bibliografia científica i l'històric de dades, no és suficientment concloent, s'haurien de portar a terme estudis complementaris basats en l'aplicació de models predictius i/o assaigs de laboratori que es descriuen a continuació.

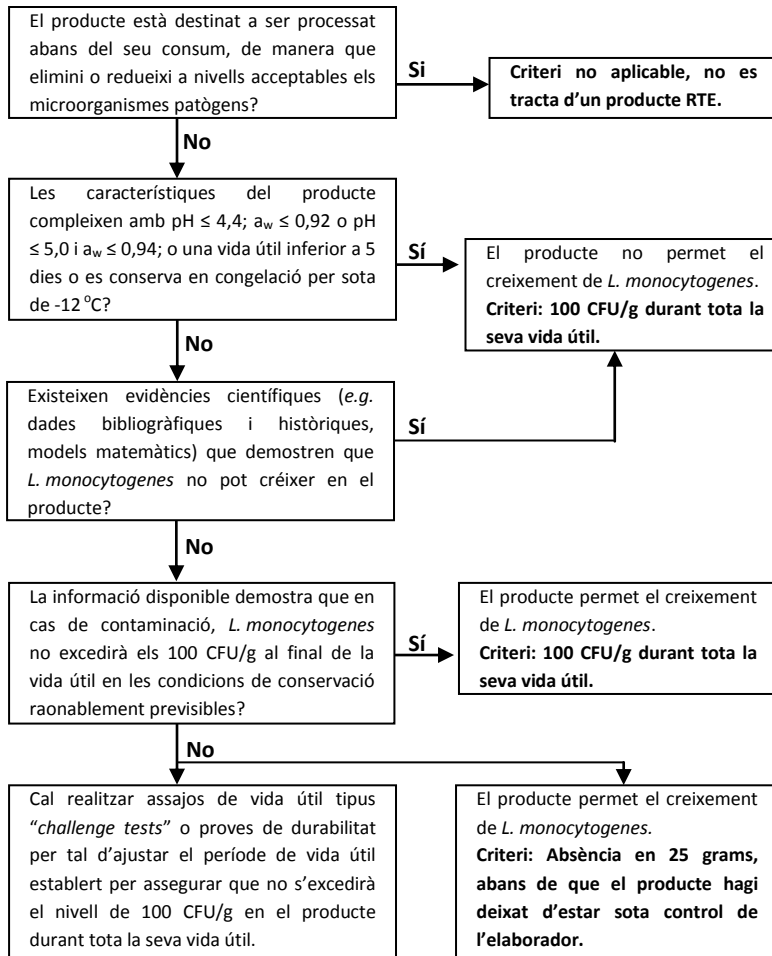


Figura 11. Arbre de decisió d'aplicació dels criteris microbiològics i per a la determinació de la vida útil segura d'un aliment RTE. Adaptat de: CFA / BRC (2006) i FSAI (2011).

1.5.2 Microbiologia predictiva

La microbiologia predictiva, també anomenada ecologia microbiana quantitativa, és una branca de la microbiologia dels aliments que caracteritza quantitativament el comportament dels microorganismes en funció de les condicions del medi a les que estan sotmesos. Aquests comportaments se suposen reproduïbles i per tant, es poden caracteritzar a partir de les observacions realitzades en determinades condicions i descriure mitjançant funcions matemàtiques. Aquestes funcions o models degudament validats poden predir les respostes d'aquests microorganismes en altres condicions no assajades explícitament (Ross et al., 2000).

Els models matemàtics en el camp de la microbiologia predictiva es poden utilitzar per descriure la inactivació, la supervivència i el creixement de microorganismes i són de gran utilitat per avaluar la

seguretat, l'estabilitat i la vida útil dels aliments (Pérez-Rodríguez i Valero, 2013). A més a més, poden utilitzar-se per determinar la idoneïtat d'una nova formulació o l'aplicació d'una nova tecnologia o procés en relació a la seguretat del producte final i a la seva vida útil (Van Boekel, 2008), podent així avaluar quina combinació d'obstacles és més adequada.

Els models matemàtics poden classificar-se en funció de diversos criteris, *e.g.* models cinètics vs. models sobre límits de creixement (*growth/no growth*), probabilístics vs. determinístics, empírics vs. mecanicistes, etc.

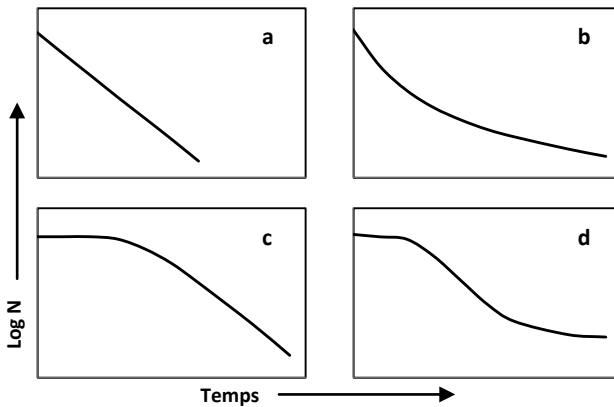
Per als models cinètics (*e.g.* de creixement o inactivació) sovint s'utilitza la classificació de Whiting i Buchanan (1993) en 3 nivells:

- a) Els **models primaris** descriuen la cinètica o evolució dels recomptes microbians en unes condicions ambientals donades i constants. Permeten estimar paràmetres cinètics d'inactivació com el valor D (temps necessari per aconseguir una reducció d'1 log) i *k* (constant d'inactivació), o bé de creixement com la λ (període de latència) i la μ (velocitat específica de creixement).
- b) Els **models secundaris** són els que descriuen l'efecte de les condicions ambientals intrínseques i/o extrínseques sobre els valors de paràmetres cinètics estimats amb els models primaris.
- c) Els **model terciaris** són la integració, en paquets o suports informàtics de fàcil ús, de models primaris i secundaris, amb la finalitat d'estimar de manera senzilla, el comportament de microorganismes en unes condicions ambientals determinades.

1.5.2.1 Modelització de la inactivació microbiana

Models primaris d'inactivació

Tradicionalment, la inactivació microbiana per tractaments letals (*e.g.* tèrmic) s'ha descrit utilitzant models lineals o log-lineals del conegut valor D o temps de reducció decimal (**Figura 12a**). Amb l'aparició de noves tecnologies per tractar aliments (*e.g.* HP), s'ha observat que el comportament dels microorganismes en els aliments no sempre segueix una relació lineal amb el temps, per la qual cosa es requereix d'altres models per descriure'ls. Així trobem models que descriuen respostes biològiques en forma de cua o *tail* resultat d'un remanent de cèl·lules resistents al tractament aplicat (*e.g.* model Weibull amb forma còncava) (**Figura 12b**); una fase subletal o *shoulder* abans d'iniciar-se la inactivació (*e.g.* model Weibull amb forma convexa) (**Figura 12c**) o una resposta sigmoïdal, amb fase subletal i cua final (model log-lineal amb *shoulder* i *tail*) (**Figura 12d**) (McKellar i Lu, 2004; Geeraerd *et al.*, 2005; Marks, 2008; Pérez-Rodríguez i Valero, 2013).



a) Model lineal/ log-lineal

$$\text{Log}(N_t) = \text{Log}(N_0) - \frac{t}{D} = \text{Log}(N_0) - \frac{k_{\max} \cdot t}{\text{Ln}(10)}$$

b) Model Weibull (còncav, $p < 1$)

$$\text{Log}(N_t) = \text{Log}(N_0) - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p$$

c) Model Weibull (convex, $p > 1$)

d) Model log-lineal amb
shoulder i *tail*

$$\text{Log}(N_t) = \text{Log} \left[\left(10^{\text{Log}(N_0)} - 10^{\text{Log}(N_{\text{res}})} \right) \cdot e^{-k_{\max} \cdot t} \cdot \left(\frac{e^{k_{\max} \cdot S_1}}{1 + (e^{k_{\max} \cdot S_1} - 1) \cdot e^{-k_{\max} \cdot t}} \right) + 10^{\text{Log}(N_{\text{res}})} \right]$$

Figura 12. Models genèrics d'inactivació microbiana i la seva fórmula matemàtica: a) lineal/log-lineal, b) Weibull còncav amb *tail*, c) Weibull convex amb *shoulder* i d) models log-lineal amb *shoulder* i *tail* (Geeraerd *et al.*, 2005).

Per tal de poder fer més senzilla l'aplicació dels models primaris d'inactivació, existeixen eines informàtiques com el complement de Microsoft® Excel GlnaFIT (Geeraerd *et al.*, 2005). Aquest complement permet estimar els diferents paràmetres cinètics d'inactivació mitjançant l'ajust de diferents models disponibles a les dades observades de concentració microbiana (**Log N**).

Models secundaris d'inactivació

A partir de la relació dels valors de D en funció del temps de tractament (**t**) als quals han estat obtinguts, s'obté el valor Z o constant d'inactivació tèrmica ($Z = -1/\text{Log } D$) que representa l'increment de temperatura necessari per aconseguir una reducció d'una unitat logarítmica en un determinat valor de D. Aquest exemple seria el cas més típic de model secundari d'inactivació utilitzat per predir els efectes letals dels tractaments tèrmics (McKellar i Lu, 2004).

Altres models secundaris molt utilitzats en microbiologia predictiva són els que descriuen els efectes de diversos paràmetres ambientals, en els valors del paràmetre cinètic, de manera conjunta mitjançant **funcions polinòmiques** o altrament dits models de superfície de resposta. Aquests models utilitzen equacions polinomial de segon ordre i tenen l'avantatge que es poden representar gràficament de manera senzilla mitjançant gràfics de superfície.

1.5.2.2 Modelització del creixement microbià

Models primaris de creixement

La corba de creixement dels microorganismes inclou 3 fases: la latència, el creixement exponencial i la fase estacionària (Monod, 1949) (**Figura 13**), les quals es poden descriure mitjançant els paràmetres numèrics λ , μ_{max} i N_{max} , respectivament.

La **fase de latència** o **lag time** (λ) es caracteritza per ser la fase on els microorganismes s'adapten a l'ambient que els envolta sense duplicar-se. La durada d'aquesta fase ve determinada per l'estat fisiològic inicial dels microorganismes, és a dir, la història prèvia, així com per les condicions del medi on es troba (Ross i Dalgaard, 2004).

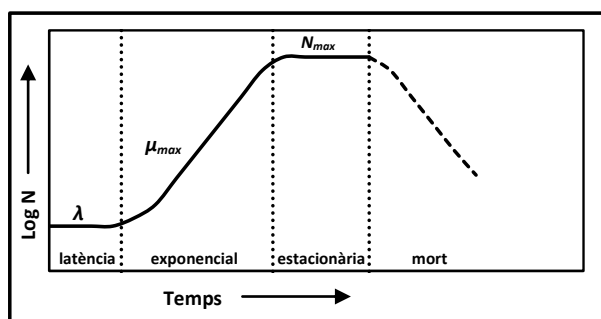
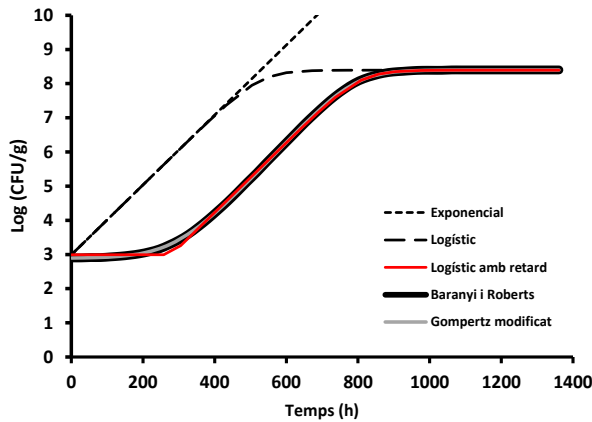


Figura 13. Corba típica de creixement de les poblacions microbianes en cultius tancats.

Durant la **fase de creixement exponencial**, els microorganismes es dupliquen a una "velocitat" constant, anomenada velocitat específica de creixement (μ_{max}), que ve determinada per les condicions ambientals (*e.g.* temperatura, pH, etc.) però no per l'estat fisiològic previ del microorganisme.

La **fase estacionària** arriba quan els microorganismes assoleixen la densitat màxima de població (N_{max}) degut entre altres raons, a l'esgotament de nutrients i a l'acumulació de metabòlits que fan que el medi esdevingui desfavorable.

Per tal de poder descriure el comportament dels microorganismes, i així estimar els diferents paràmetres cinètics durant el seu creixement, s'han desenvolupat diversos models. Alguns dels models primaris més rellevants es presenten a la **Figura 14**.



Model exponencial

$$\text{Log}(N_t) = \text{Log}[N_0 \cdot \exp(\mu_{\max} \cdot t)]$$

Model logístic

$$\text{Log}(N_t) = \text{Log} \left(\frac{N_{\max}}{1 + \left[\frac{N_{\max}}{N_0} - 1 \right] \cdot \exp(-\mu_{\max} \cdot t)} \right)$$

Model logístic amb retard

$$\text{Log}(N_t) = \text{Log} \left(N_0 + \frac{N_{\max} - N_0}{1 + \exp(-\mu_{\max}(t - t_i))} \right)$$

Model de Baranyi i Roberts

$$\text{Log}(N_t) = \text{Log}(N_0) + \frac{1}{\mu_{\max}} \cdot \left[t + \frac{1}{\mu_{\max}} \cdot \text{Ln} \left(\frac{\exp(-\mu_{\max} \cdot t) + q_0}{1 + q_0} \right) \right] - \frac{1}{\text{Log}(10)} \cdot \text{Ln} \left(1 + \frac{\exp(\mu_{\max} \cdot [t + \frac{1}{\mu_{\max}} \cdot \text{Ln}(\frac{\exp(-\mu_{\max} \cdot t) + q_0}{1 + q_0})]) - 1}{\exp(\text{Log}(N_{\max}) - \text{Log}(N_0))} \right)$$

Model de Gompertz modificat

$$\text{Log}(N_t) = \text{Log}(N_0) + \left(A \cdot \exp \left(-\exp \left[\frac{\mu_{\max} \cdot \exp(-\lambda \cdot t)}{A} \cdot (\lambda - t) + 1 \right] \right) \right) / \text{Ln}(10)$$

Figura 14. Representació gràfica i fórmula matemàtica d'alguns models primaris que permeten descriure el creixement de microorganismes (Dalgaard *et al.* 1994; McKellar i Lu, 2004).

Tots aquests models parteixen del model exponencial, al qual se li han anat afegint paràmetres per descriure una fase estacionària on els microorganismes deixen de multiplicar-se (model logístic) o una fase d'adaptació al medi prèvia al creixement exponencial (model logístic amb retard) (McKellar i Lu, 2004). Altres models com el de Baranyi i Roberts (1994) o el de Gompertz modificat (Zwietering *et al.*, 1990) són similars al model logístic amb retard, però amb un fonament més mecanicista, permetent una descripció més acurada de les fases de transició (entre la λ i la μ_{\max} i entre la μ_{\max} i la N_{\max}). Aquests dos últims models primaris s'han popularitzat mitjançant eines informàtiques com el DMFit, que es pot utilitzar *on-line* (disponible al portal www.combase.cc) o com a complement de Microsoft® Excel (<http://www.combase.cc/index.php/en/downloads/category/11-dmfit>). Aquestes

eines permeten modelitzar dades observades per obtenir les corbes de creixement i estimar els corresponents paràmetres cinètics (Baranyi i Roberts, 1994).

Models secundaris de creixement

Els models secundaris sobre el creixement microbià descriuen l'efecte de les condicions ambientals en la velocitat específica de creixement (μ_{max}) o fase de latència (λ). A part dels models polinomials, en microbiologia dels aliments s'utilitzen altres tipus de models, com els que es descriuen a continuació:

Els **models d'arrel quadrada** (*square-root type models*) van ser proposats inicialment per Ratkowsky *et al.* (1982) en observar una relació lineal entre l'arrel quadrada de la μ_{max} i la temperatura "subòptima" de creixement dels microorganismes, així aquest paràmetre de creixement microbià es pot definir en funció de la temperatura (**T**) mitjançant la següent equació:

$$\sqrt{\mu_{max}} = b \cdot (T - T_{min})$$

Els models de **concepte gamma (γ)** es basen en l'adimensionalitat dels factors de creixement proposada per Zwietering *et al.* (1993). Aquests models descriuen el valor màxim de la velocitat de creixement (μ_{max}) a partir de la velocitat en condicions òptimes com a valor de referència:

$$\mu_{max} = \mu_{opt} \cdot \gamma(T) \cdot \gamma(pH) \cdot \gamma(a_w), \text{ essent:}$$

$$\gamma(\text{Factor}) = \left(\frac{\text{Factor} - \text{Factor}_{min}}{\text{Factor}_{opt} - \text{Factor}_{min}} \right)^2$$

En aquests models s'assumeix que l'efecte de qualsevol dels factors es pot descriure com a una fracció de la μ_{opt} , mitjançant una funció normalitzada (γ) entre el 0 (sense creixement) i l'1 (condicions òptimes de creixement) i que els factors ambientals actuen independentment de la velocitat de creixement (μ_{max}). Conseqüentment, l'efecte combinat dels diferents factors es pot obtenir multiplicant l'efecte obtingut per cada un dels factors.

Els **models de paràmetres cardinals (CPM)** introduïts per Rosso (1995) i basats en els models de concepte gamma anteriors, descriuen l'efecte relatiu de factors (X) com la temperatura, el pH i l' a_w en la velocitat de creixement del microorganismes a partir de X_{min} , X_{max} i X_{opt} . L'avantatge d'aquests models és que no existeix cap correlació estructural entre els paràmetres inclosos i el significat biològic de tots els paràmetres. Le Marc *et al.* (2002) van proposar un model CPM expandit en el que es tenien en compte les interaccions entre els diferents paràmetres ambientals (ξ).

En els textos específics sobre microbiologia predictiva en els aliments (Ross i Dalgaard, 2004; Pérez-Rodríguez i Valero, 2013), es poden trobar equacions matemàtiques concretes que s'utilitzen pels models de creixement bacterià basats en els conceptes gamma i de paràmetres cardinals.

Per altra banda, la fase de latència o λ també es pot descriure en funció de la temperatura (T). Entre els models més utilitzats, s'inclou el **model hiperbòlic** (Zwietering *et al.*, 1994; Oscar, 2002):

$$\lambda = \left[\frac{p}{T - q} \right]^m$$

En alguns casos s'ha observat que la λ és proporcional al temps de generació (t_{gen}) del microorganisme, i per tant, inversament proporcional a la μ_{max} . Aquest fet s'associa al concepte “treball que ha de fer” (“*work to be done*”) un microorganisme per adaptar-se a un nou ambient i que la velocitat a la que pot fer aquest treball depèn de la seva μ_{max} potencial (Robinson *et al.*, 1998). En aquestes situacions els models secundaris de la λ poden derivar directament de models de la μ_{max} , com el concepte anomenat temps de latència relativa (**RLT**, de l'anglès *relative lag time*) (Mellefont i Ross, 2003):

$$\frac{\lambda}{t_{gen}} = RLT, \quad \lambda = \frac{RLT \cdot \ln(2)}{\mu_{max}}$$

1.5.2.3 Avaluació dels models predictius

A banda de la bondat d'ajust estadístic, per tal de poder aplicar un model amb fins predictius, s'ha de demostrar la seva validesa predictiva, és a dir, que prediu amb una adequada exactitud i precisió el comportament dels microorganismes en els aliments durant el seu processat, l'emmagatzematge i/o la distribució. Aquesta demostració s'anomena avaluació i/o validació i consisteix en comparar les estimacions obtingudes amb el model (prediccions), amb observacions experimentals provinents d'experiments no utilitzats per al desenvolupament del model en qüestió (Mejlholm *et al.*, 2010). Aquesta comparació es pot realitzar gràficament, enfrontant els valors observats amb els valors predits pel model desenvolupat i d'aquesta manera visualitzar fàcilment si el model dona estimacions “segures” (*e.g.* sobreestimant els valors de μ o subestimant els valors de λ) o “perilloses” (*e.g.* en cas que prediguin μ més lentes i λ més llargues que les observades).

En el cas concret dels models que prediuen la velocitat de creixement (μ), es poden calcular uns índexs de validació, com són el factor de biaix (**Bf**) i d'exactitud (**Af**), proposats per Ross (1996):

$$B_f = 10^{\frac{\sum \log\left(\frac{\mu_{pred}}{\mu_{obs}}\right)}{n}} \quad A_f = 10^{\frac{\sum \left| \log\left(\frac{\mu_{pred}}{\mu_{obs}}\right) \right|}{n}}$$

El factor de biaix indica si el model prediu sistemàticament un creixement més ràpid ($B_f > 1$) o més lent ($B_f < 1$) que l'observat. És una mesura de la mitjana de la diferència entre els valors observats i els valors predits pel model. S'han proposat diversos límits d'acceptació de models segons aquests índexs, com per exemple el proposat per Dalgaard i Jorgensen (1998) en què s'estableix que un model és acceptable sempre que el valor de B_f es trobi entre 0,75 i 1,25. El factor d'exactitud és similar a l'anterior però amb valors absoluts de la relació entre els valors observats i els valors predits, essent una coincidència perfecta entre valors quan $A_f = 1$.

1.5.2.4 Models terciaris, eines predictives en relació al comportament de *L. monocytogenes*

En els últims temps, gràcies al desenvolupament de les tecnologies de la informació i la comunicació (TIC), s'han desenvolupat diferents eines informàtiques de fàcil ús, sovint disponibles a la xarxa *online*, per a la predicció del comportament de diferents microorganismes en funció de factors ambientals concrets (Tamplin *et al.*, 2004). A la **Taula 15** es recullen alguns dels sistemes actualment disponibles en relació a *L. monocytogenes*. Alguns dels models disponibles, com el Combase i el PMP, s'han desenvolupat a partir de dades de creixement en medi de cultiu en laboratori, i no han estat validats en aliments. Tanmateix, alguns treballs els utilitzen i en fan una validació específica per productes objecte d'estudi. Altres models com l'SSSP, estan validats per a diferents productes. I en alguns casos com a MicroHibro, l'aplicatiu permet introduir dades experimentals (pròpies o de la literatura) i calcular els índex de validació descrits a l'apartat 1.5.2.3.

L'ús d'aquests models ajuda a quantificar l'efecte combinat de diversos obstacles i a estimar el potencial de creixement del microorganisme d'interès en unes condicions i temps específics. L'elecció correcta del model a utilitzar és de vital importància per a poder obtenir unes prediccions acurades i adequades a l'objectiu perseguit. Sovint és recomanable utilitzar més d'un model, havent-ne definit els criteris d'elecció i els paràmetres de validació (*e.g.* el tipus de producte i les variables i intervals de valors o domini, que ens interessa considerar) per avaluar comparativament la informació que aporta cadascun.

1.5.3 Assajos de laboratori

Quan la informació prèvia, comentada als apartats anteriors, no és suficient per poder demostrar la innocuïtat d'un producte o si hi ha dubtes de l'adequació de la vida útil que se li ha establert, pot ser necessària la realització d'assajos de laboratori (Bover-Cid i Garriga, 2012).

Amb aquests assajos es pot determinar i/o validar la vida útil en relació a la presència de *L. monocytogenes* en un producte, mitjançant el càlcul del potencial de creixement i/o quantificar la velocitat de creixement del patogen. Cal remarcar que aquest tipus d'estudis serveixen per determinar la vida útil segura d'un producte RTE i no la seva vida útil comercial, ja que no es consideren les possibles alteracions organolèptiques degudes al creixement de microorganismes alterants.

Són nombroses les guies publicades per tal d'orientar en la realització d'aquest tipus d'assajos. En l'àmbit europeu, el Laboratori Comunitari de Referència per a *L. monocytogenes* sota petició del Directorat General de Salut i Consumidors (DG Sanco), va elaborar una guia per tal d'orientar als laboratoris amb recomanacions de com planificar, executar i interpretar els resultats d'aquests assajos (CRL/AFSSA, 2008). El DG Sanco també va elaborar un document guia dirigit a les empreses productores, per tal de guiar-los en el procés d'identificació del risc de *L. monocytogenes* i de presa de decisió sobre el tipus d'estudis a realitzar (DG Sanco, 2008). A part d'aquests documents, altres autoritats sanitàries d'Irlanda, Regne Unit, Estats Units i Canadà entre altres, també han publicat guies d'ajuda per a la realització d'aquests assajos (HPA, 2010; NACMCF, 2010; FSAI, 2011; Health Canada, 2012).

Taula 15. Sistemes predictius del creixement, supervivència i/o inactivació de *L. monocytogenes* disponibles i de lliure accés.

Eina	Tipus ^b	Matriu utilitzada	Factors (domini) ^c							Àcids orgànics ^e (ppm)	Nitrit (ppm)	Altres (%)
			T (°C)	NaCl (%)	a _w	pH	Humitat (%)	Fenol (ppm)	Nitrit (ppm)			
Combase ¹	C	medi de cultiu	1-40	0-11,4	0,92-1	4,4-7,5			làctic (0-20.000) acètic (0-10.000)	0-200	CO ₂ (0-100)	
DMR ²	C	carnis	2-12	1,6-6 ^c		5,4-6,6	53-78		lactat Na (0-3%) acetat Na (0-0,5%)	0-150 ^d	CO ₂ (0-100) greix (≤10; >10)	
MicroHibro ³	C	carni cuit sense nitrats			0,96-0,99	5,9-6,9						
		carni cuit amb nitrats				5,9-6,9		0-315				
		carni cuit amb nitrats RTE		0,8-3,6			45,5-83,5		diacetat Na (0-0,25%) lactat K (0,25-9,25%)			
		enciam	5-25									
		enciam MAP	7-30									
		medi de cultiu	0-37		0,92-1	4,4-9,6						
IT		carn de porc	55-70									
PMP ⁴	C	medi de cultiu	4-37	0,5-5		4,5-8		0-150				
IT		medi de cultiu							lactat Na (0-4,8%) diacetat Na (0-0,25%)			
S		fermentació carnis				4,6-6						
		assecat carnis ferment.			0,84-0,95	4,6-6						
		emmagatzematge carnis fermentats	4-30		0,84-0,95	4,6-6						
S		salmó fumat		0-6				0-15				
PURAC 2012 ⁵	C	carnis	3,3-15	0-6	0,95-1	5,8-7,2	40-100	0-200	lactat Na (0-4,8%) acetat Na (0-1,14%) diacetat Na (0-0,24%)		NaK (0-6)	
SSSP v 3.1 ⁶	C	productes de la pesca (validat també per productes carnis cuits)	2-15	0-8 ^c		5,6-7,7	0-20	0-200	acètic (0-11.000) benzoic (0-12.00) cítric (0-6.500) diacètic (0-2.000) làctic (0-20.000) sòrbic (0-1.000)		CO ₂ (0-100)	

^a: interval de valors utilitzats per al desenvolupament del model. ^b: on: C= creixement; S= supervivència; IT= inactivació tèrmica. ^c: en fase aquosa. ^d: afegit a la fórmula. ^e: o la seva sal. ¹: (<http://www.combase.co>); ²: Danish Meat Research Institute, Listeria growth model (<http://3.test.dezone.dk>); ³: (<http://www.microhibro.com/>); ⁴: Pathogen Modeling Program (<http://pmp.atserc.gov/>); ⁵: Purac® Listeria Control Model 2012 (<http://lcm.purac.com/index.php>); ⁶: Seafood Spoilage and Safety Predictor (sssp.dtuqua.dk)

1.5.3.1 “Challenge tests” o proves d’inoculació

Els *challenge tests* són assajos on s’estudia el comportament del microorganisme inoculat (*L. monocytogenes* en el cas que ens ocupa) en un producte amb una concentració coneguda. Es tracta de monitoritzar la supervivència o possible creixement del microorganisme inoculat durant la vida útil prevista del producte i en les condicions previsibles de distribució, emmagatzematge i ús.

Aquestes proves es poden plantejar amb dos objectius diferents (CRL/AFSSA, 2008): avaluar el potencial de creixement (δ) o estimar la velocitat màxima de creixement (μ) d’un microorganisme. Són útils per establir i validar la seguretat d’un producte durant la seva vida útil, però també per avaluar l’efecte de determinades mesures de control (e.g. aplicació de tractaments per HP) en el comportament d’un microorganisme determinat, tal i com s’ha aplicat en aquesta tesi.

Per determinar la capacitat de creixement de *L. monocytogenes* en un producte durant el seu emmagatzematge, es realitza l’avaluació del potencial de creixement (δ), determinant la diferència entre la concentració del patogen (log CFU/g) al final i a l’inici de l’assaig. Aquest δ depèn de diversos factors com poden ser la soca i l’estat fisiològic de *L. monocytogenes*, però també de factors intrínsecs i extrínsecs, essent entre aquests la temperatura d’emmagatzematge el factor clau, per la qual cosa és molt important definir un perfil de temperatura-temps durant l’assaig que emuli les possibles condicions d’emmagatzematge a les que es sotmetrà el producte (FSAI, 2011).

D’altra banda, per determinar la velocitat màxima de creixement, els estudis s’han de realitzar a una temperatura concreta i constant, amb una determinació dels recomptes periòdica (i.e. entre 10 i 15 punts de mostreig) que permeti estimar aquest paràmetre cinètic mitjançant l’ajust d’un model primari de creixement (e.g. apartat 1.5.2.2). Amb els resultats obtinguts i utilitzant un model predictiu secundari derivat del model d’arrel quadrada de Ratkowsky, es poden estimar velocitats de creixement a altres temperatures no assajades.

1.5.3.2 Proves de durabilitat

Aquestes proves estudien el comportament d’un microorganisme concret en un aliment contaminat de manera natural i sota les condicions previsibles de distribució, emmagatzematge i ús.

Aquests estudis es consideren més pròxims a la realitat que els *challenge tests*, ja que la contaminació és natural. Per contra, els resultats són més difícils d’interpretar ja que sol haver-hi una baixa prevalença d’unitats contaminades i els nivells de contaminació del microorganisme solen ser molt baixos i heterogenis (no totes les unitats d’un mateix lot han d’estar contaminades o tenir el mateix nivell de contaminació) (FSAI, 2011). Per tant, per tenir un nivell de confiança amb els resultats obtinguts, cal un nombre considerable d’unitats i/o lots estudiats (AESAN, 2011).

1.6 Bibliografia

- Agència Catalana de Seguretat Alimentària (ACSA)** (2011) Durant l'embaràs, aliments segurs més que mai! (Fulletó informatiu). Disponible a: http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir3586/3tic_embaras_cat.pdf [Consulta: 20 juliol 2013]
- Agència Espanyola de Seguretat Alimentària i Nutrició (AESAN)** (2005) 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 (Ref. AESA-2003-007). Revista del Comité Científico de la AESAN **1**, 36-71.
- Agència Espanyola de Seguretat Alimentària i Nutrició (AESAN)** (2011) Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios. Revista del Comité Científico de la AESAN **14**, 43-59.
- Alpas, H., Kalchayanand, N., Bozoglu, F. i 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. International Journal of Food Microbiology **60**, 33-42.
- Angelidis, A.S. i Koutsoumanis, K.** (2006) Prevalence and concentration of *Listeria monocytogenes* in sliced ready-to-eat meat products in the Hellenic retail market. Journal of Food Protection **69**(4), 938-42.
- Appendini, P. i Hotchkiss, J.H.** (2002) Review of antimicrobial food packaging. Innovative Food Science & Emerging Technologies **3**, 113-126.
- Arnau, J.** (1993) Tecnología de elaboración del jamón curado. Microbiología SEM **9** extraordinario, 3-9.
- Arnau, J., Guerrero, L., Gou, P. i Monfort, J.M.** (2001) Tecnología, microbiología y principales problemas tecnológicos del jamón curado. A *Enciclopedia de la carne y los productos cárnicos*. Vol. II, pp. 1177-1204. Editat per M. Martín Bejarano. Plasencia: Ediciones Martín & Macías.
- Arnau, J. i Monfort, J.M.** (1998) *El jamón curado: Tecnología y análisis de consumo*. Simposio Especial - 44th ICoMST. Editat per: IRTA i Eurocarne. Madrid: Editorial Estrategias Alimentarias S.L.
- Aymerich, T., Jofré, A., Garriga, M. i Hugas, M.** (2005) Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. Journal of Food Protection **68**(1), 173-177.
- Aymerich, T., Picouet, P.A. i Monfort, J.M.** (2008) Decontamination technologies for meat products. Meat Science **78**(1-2), 114-129.
- Bajovic, B., Bolumar, T. i Heinz, V.** (2012) Quality considerations with high pressure processing of fresh and value added meat products. Meat Science **92**(3), 280-289.
- Barakat, R.K. i Harris, L.J.** (1999) Growth of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on cooked modified-atmosphere-packaged poultry in the presence and absence of a naturally occurring microbiota. Applied and Environmental Microbiology **65**(1), 342-345.
- Baranyi, J. i Roberts, T.A.** (1994) A dynamic approach to predict bacterial growth responses. International Journal of Food Microbiology **23**(3-4), 277-294.
- Bari, M.L., Hossain, M.A., Isshiki, K. i Ukuku, D.** (2011) Behavior of *Yersinia enterocolitica* in foods. Journal of Pathogens **2011**, 1-13.
- Bello Gutiérrez, J.** (2008) Jamón curado: Aspectos científicos y tecnológicos. Perspectiva desde la Unión Europea. Ediciones Díaz de Santos.
- Benito, M.J. i Córdoba, J.J.** (2001) Semiconservas cárnicas tratadas por el calor. Tecnología de elaboración. Defectos y alteraciones. Conservabilidad. A *Enciclopedia de la carne y los productos cárnicos*. Vol. II, pp. 1305-1315. Editat per M. Martín Bejarano. Plasencia: Ediciones Martín & Macías.
- Bermúdez-Aguirre, D. i Barbosa-Cánovas, G.** (2011) An update on high hydrostatic pressure, from the laboratory to industrial applications. Food Engineering Reviews **3**(1), 44-61.

- Björkroth, K.J., Vandamme, P. i Korkeala, H.** (1998) Identification and characterization of *Leuconostoc carnosum*, associated with production and spoilage of vacuum-packaged, sliced, cooked ham. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(9), 3313-3319.
- Bohaychuk, V.M., Gensler, G.E., King, R.K., Manninen, K.I., Sorensen, O., Wu, J.T., Stiles, M.E. i McMullen, L.M.** (2006) Occurrence of pathogens in raw and ready-to-eat meat and poultry products collected from the retail marketplace in Edmonton, Alberta, Canada. *Journal of Food Protection* **69**(9), 2176-2182.
- Bover-Cid, S. i Garriga, M.** (2012) ¿Cómo abordar la gestión de la seguridad alimentaria a través de los estudios de vida útil de acuerdo con el Reglamento (CE) 2073/2005 de criterios microbiológicos? *Eurocarne* **211**, 66-75
- Bozaris, I.S. i Adams, M.R.** (2000) Transient sensitivity to nisin in cold-shocked Gram negatives. *Letters in Applied Microbiology* **31**(3), 233-237.
- Bozoglu, F., Alpas, H. i Kaletunç, G.** (2004) Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **40**, 243-247.
- Brauch, G., Hänslers, U. i Ludwig, H.** (1990) The effect of pressure on bacteriophages. *High Pressure Research* **5**(1-6), 767-769.
- Brown, P., Meyer, R., Cardone, F. i Pocchiari, M.** (2003) Ultra-high-pressure inactivation of prion infectivity in processed meat: A practical method to prevent human infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(10), 6093-6097.
- Cabedo, L., Picart-Barrot, L. i Teixidó-Canelles, A.** (2008) Prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in ready-to-eat food in Catalonia, Spain. *Journal of Food Protection* **71**(4), 855-859.
- Cartwright, E.J., Jackson, K.A., Johnson, S.D., Graves, L.M., Silk, B.J. i Mahon, B.E.** (2013) Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. In *Emerging Infectious Diseases*, **19**(1), 175-184.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC)** (2013) National *Listeria* surveillance annual summary, 2011. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. Disponible a : <http://www.cdc.gov/listeria/pdf/listeria-annual-summary-2011-508c.pdf> [Consulta: 5 novembre 2013]
- Centre for Food Safety-Hong Kong** (2007) Microbiological guidelines for ready-to-eat food. Disponible a : [http://www.cfs.gov.hk/english/whatsnew/whatsnew_act/files/MBGL RTE%20food_e.pdf](http://www.cfs.gov.hk/english/whatsnew/whatsnew_act/files/MBGL_RTE%20food_e.pdf) [Consulta: 6 febrer 2010]
- Codex Alimentarius Commission (CAC)** (2009) Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods (Annex II) - Alinorm 09/32/13. 42-47. Disponible a : www.codexalimentarius.org/input/download/report/725/al32_22e.pdf [Consulta: 20 agost 2013]
- Codex Alimentarius Commission (CAC)** (2010) Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Alimentarius Commission. Procedural Manual. Nineteenth Edition. World Health Organization/Food and Agriculture Organization. 1-28. Disponible a : ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_19e.pdf [Consulta: 20 agost 2013]
- Coma, V.** (2006) Perspectives for the active packaging of meat products. In *Advanced technologies for meat processing*, pp. 449-472. Edited by L.M.L. Nollet i F. Toldrá. Boca Raton (Florida): CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Coma, V.** (2008) Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science* **78**(1-2), 90-103.
- Community Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* / Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (CRL/AFSSA)** (2008) Technical guidance document on shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Disponible a : http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/shelflife_listeria_monocytogenes_en.pdf [Consulta: 16 juliol 2013]
- Considine, K.M., Kelly, A.L., Fitzgerald, G.F., Hill, C. i Sleator, R.D.** (2008) High-pressure processing – effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiology Letters* **281**(1), 1-9.
- Cornejo, I. i Carrascosa, A.V.** (1991) Characterization of *Micrococccaceae* strains selected as potential starter cultures in spanish dry-cured ham processes. 1. Fast process. *Fleischwirtschaft* **71**(1), 99-101.

- Cornejo, I., Carrascosa, A.V., Marin, M.E. i Martin, P.J.** (1992) Dry-cured ham- Consideration about the origin of microorganisms that grow on the deep muscular tissues of dry-cured spanish hams during processing. *Fleischwirtschaft* **72**(10), 1422-1425.
- Cornelius, A.J., Hudson, J.A. i Wong, T.L.** (2008) Enumeration and growth of naturally occurring *Listeria* spp. in unpackaged ham. *Food Microbiology* **25**(2), 407-412.
- Cheftel, J.C.** (1995) Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International* **1**, 75-90.
- Chilled Food Association / British Retail Consortium (CFA/BRC)** (2006) Guidance on practical implementation of the EC regulation on microbiological criteria for foodstuffs. Disponible a: http://www.chilledfood.org/Resources/Chilled%20Food%20Association/Public%20Resources/BRC_CFA_Micro_Criteria_Guidance_Ed_1.2.pdf [Consulta: 5 setembre 2013]
- Christian, J.H.B.** (2000) Drying and reduction of water activity. A *Microbiological Safety and Quality of Food*. Vol. 1, pp. 146-174. Editat per B. Lund, T.C. Baird-Parker i G.W. Gould. Springer.
- Chung, Y.K., Vurma, M., Turek, E.J., Chism, G.W. i Yousef, A.E.** (2005) Inactivation of barotolerant *Listeria monocytogenes* in sausage by combination of high-pressure processing and food-grade additives. *Journal of Food Protection* **68**(4), 744-750.
- Dalgaard, P.; Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K. i McMeekin, T.A.** (1994) Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology* **23**(3-4), 391-404.
- Dalgaard, P. i Jorgensen, L.V.** (1998) Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology* **40**(1-2), 105-115.
- Degnan, A.J., Yousef, A.E. i Luchansky, J.B.** (1992) Use of *Pediococcus acidilactici* to control *Listeria monocytogenes* in temperature-abused vacuum-packaged wieners. *Journal of Food Protection* **55**(2), 98-103.
- Delves-Broughton, J.** (1990) Nisin and its uses as a food preservative. *International Journal of Dairy Technology* **43**, 73-76.
- Denis, C., Cadot, P., Leguerinel, I., Thuault, D. i Sohier, D.** (2006) Heat resistance of coliform species isolated from cooked ham, snail flesh, and 'bouchées à la reine'. *Letters in Applied Microbiology* **42**(2), 160-164.
- Di Pinto, A., Novello, L., Montemurro, F., Bonerba, E. i Tantillo, G.** (2010) Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods from supermarkets in Southern Italy. *The New Microbiologica* **33**(3), 249-52.
- Direction Générale Santé et Consommateurs (DG Sanco)** (2008) Guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs Disponible a: http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/guidoc_listeria_monocytogenes_en.pdf [Consulta: 8 abril 2009]
- Eisenbrand, G.** (2005) Safety assessment of high pressure treated foods. *Molecular Nutrition & Food Research* **49**(12), 1168-1174.
- Espanya Exportación e Inversores (ICEX)** (2012) El mercado porcino en Japón. Disponible a: <http://www.icex.es/icex/cma/contentTypes/common/records/mostrarDocumento/?doc=4644395> [Consulta: 20 setembre 2013]
- European Commission** (1997) Regulation (EC) N°258/1997 of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. *Official Journal of the European Communities* **L 043**, 1-6.
- European Commission** (2005) Commission Regulation (EC) N°2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Communities* **L 338**, 1-26.
- European Commission** (2009) Commission Regulation (EC) N° 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal of the European Communities* **L135**, 3-11.
- European Commission** (2010) Commission Directive 2010/69/EU of 22 October 2010 amending the Annexes to European Parliament and Council Directive 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners. *Official Journal of the European Union* **L279**, 22-31.

- European Food Safety Authority (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**, 1-15.
- European Food Safety Authority (EFSA)** (2007) Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness. The EFSA Journal **599**, 1-42.
- European Food Safety Authority (EFSA)** (2011) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. The EFSA Journal **9**(3), 2090-2468.
- European Food Safety Authority (EFSA)** (2013) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2011. The EFSA Journal **11**(4), 3129-3379.
- European Parliament and of the Council** (2011) Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004. Official Journal of the European Union **L 304**, 18-63.
- European Parliament and the Council of the European Union** (2004) Regulation (EC) No 1935/2004 of the European Parliament and of the Council of 27 October 2004 on materials and articles intended to come into contact with food and repealing Directives 80/590/EEC and 89/109/EEC. Official Journal of the European Communities **L338**, 4-17.
- Fairfax New Zealand Limited** (2012) Hundreds could have eaten suspect meat (20 August 2012). Disponible a: <http://www.stuff.co.nz/national/health/7312795/Hundreds-could-have-eaten-suspect-meat> [Consulta: 12 gener 2013]
- Fernández García, A., Heindl, P., Voigt, H., Büttner, M., Wienhold, D., Butz, P., Stärke, J., Tauscher, B. i Pfaff, E.** (2004) Reduced proteinase K resistance and infectivity of prions after pressure treatment at 60°C. Journal of General Virology **85**(1), 261-264.
- Food and Drug Administration (FDA)** (1977) Polyvinyl alcohol film: substances for use as basic components of single and repeated use food contact surfaces. 21CFR177.1670. Disponible a: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=177.1670> [Consulta: 23 maig 2009]
- Food and Drug Administration (FDA)** (1988) Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food substance. 21CFR184.1538. Disponible a: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=184.1538> [Consulta: 25 maig 2009]
- Food Safety Authority of Ireland (FSAI)** (2005) The control and management of *Listeria monocytogenes* contamination of food. Disponible a: <http://www.fsai.ie/WorkArea/DownloadAsset.aspx?id=1234> [Consulta: 13 juny 2010]
- Food Safety Authority of Ireland (FSAI)** (2011) Guidance Note No. 18: Validation of product shelf-life (Revision 1). Disponible a: <http://www.fsai.ie/WorkArea/DownloadAsset.aspx?id=10946> [Consulta: 28 octubre 2012]
- Food Standards Agency (FSA)** (2013) *Listeria*. Disponible a: <http://food.gov.uk/policy-advice/microbiology/listeria/#.UXqjzfs6eY> [Consulta: 15 desembre 2013]
- Food Standards Australia New Zealand (FSANZ)** (2000) The Australia New Zealand Food Standards Code - Standard 1.6.1 - Microbiological limits for food. Disponible a: <http://www.comlaw.gov.au/Details/F2011C00582> [Consulta: 13 setembre 2009]
- Food Standards Australia New Zealand (FSANZ)** (2007) Final assessment report. Application A565 - Use of nisin in processed meat products. Disponible a: http://www.foodstandards.gov.au/srcfiles/A565_FAR_Nisin_FINAL.pdf [Consulta: 25 maig 2009]

- Food Standards Australia New Zealand (FSANZ)** (2012) Criteria for *Listeria monocytogenes* - Microbiological limits for foods (Proposal P1017). Disponible a : http://www.foodstandards.gov.au/srcfiles/P1017_CFS.pdf [Consulta: 12 febrer 2013]
- Food Standards Australia New Zealand (FSANZ)** (2013) *Listeria* and food, advice for people at risk. Disponible a : <http://archive.foodstandards.gov.au/consumerinformation/listeria/> [Consulta: 14 octubre 2013]
- Franklin, N.B., Cooksey, K.D. i Getty, K.J.K.** (2004) Inhibition of *Listeria monocytogenes* on the surface of individually packaged hot dogs with packaging film coating containing nisin. *Journal of Food Protection* **67**(3), 480-485.
- Food Safety and Inspection Service (FSIS)** (2003) 9 CFR Part 430: Control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat and poultry products. *Federal Register* **68**(109), 34208-34254.
- Food Safety and Inspection Service (FSIS)** (2014) Compliance guideline: Controlling *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products. Disponible a : http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/d3373299-50e6-47d6-a577-e74a1e549fde/Controlling_LM_RTE_Guideline_0912?MOD=AJPERES [Consulta: 8 març 2014]
- Garrido, V., Vitas, A.I. i García-Jalón, I.** (2009) Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: Prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. *Food Control* **20**(11), 986-991.
- Garrido, V., Vitas, A.I. i García-Jalón, I.** (2010) The problem of listeriosis and ready-to-eat products: prevalence and persistence. A *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology* Vol. 2, pp. 1182-1189. Editat per A. Méndez-Vilas. Badajoz: Edicions Formatex.
- Garriga, M. i Aymerich, M.T.** (2009) Advanced decontamination technologies: high hydrostatic pressure on meat products. A *Safety of meat and processed meat*. pp. 183-208. Editat per F. Toldra. New York: Springer Science+Business Media.
- Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M. i Hugas, M.** (2002) Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiology* **19**(5), 509-518.
- Garriga, M., Ehrmann, M.A., Arnau, J., Hugas, M. i Vogel, R.F.** (1998) *Carnimonas nigrificans* gen. nov., sp. nov., a bacterial causative agent for black spot formation on cured meat products. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**, 677-686.
- Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P. i Van Impe, J.F.** (2005) GlnaFIT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology* **102**, 95– 105.
- Gómez, D., Ariño, A., Carramiñana, J.J., Juan, J., Rota, C. i Yangüela, J.** (2012) Comparison of sampling procedures for recovery of *Listeria monocytogenes* from stainless steel food contact surfaces. *Journal of Food Protection* **75**(6), 1077-1082.
- Gorris, L.G.M.** (2005) Food safety objective: An integral part of food chain management. *Food Control* **16**(9), 801-809.
- Han, J.H.** (2005) Antimicrobial packaging systems. A *Innovations in food packaging*. pp. 80-107. Editat per J.H. Han. London: Elsevier Academic Press.
- Hayman, M.M., Anantheswaran, R.C. i Knabel, S.J.** (2008) Heat shock induces barotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* **71**(2), 426-430.
- Hayman, M.M., Baxter, I., O'Riordan, P.J. i Stewart, C.M.** (2004) Effects of high-pressure processing on the safety, quality, and shelf life of ready-to-eat meats. *Journal of Food Protection* **67**(8), 1709-1718.
- Health and Human Services / United States Department of Agriculture (HHS/USDA)** (2003) Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Disponible a : <http://www.fda.gov/downloads/food/science/research/researchareas/riskassessmentsafetyassessment/ucm197330.pdf> [Consulta: 13 maig 2009]
- Health Canada** (2007) Use of high hydrostatic pressure for the control of *L. monocytogenes* in ready to eat (RTE) meats and poultry. Disponible a : <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/appro/nf-an138decdoc-eng.php>

- Health Canada** (2011) Policy on *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods. Disponible a: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/pdf/legislation/pol/policy_listeria_monocytogenes_2011-eng.pdf [Consulta: 18 agost 2012]
- Health Canada** (2012) Draft guidance for industry on novelty determination of high pressure processing (HPP)-treated food products. Disponible a: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/pdf/consult/high-pressure-haute-pression/document-consultation-eng.pdf [Consulta: 20 desembre 2012]
- Health Canada.** (2012) *Listeria monocytogenes* challenge testing of refrigerated ready-to-eat food. Disponible a: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/pol/listeria_monocytogenes-test-eng.php [Consulta: 20 desembre 2012]
- Health Protection Agency (HPA)** (2010) Guidelines for assessing the microbiological safety of ready-to-eat foods placed on the market. Disponible a: http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1259151921557 [Consulta: 30 gener 2011]
- Hereu, A.** (2009) Bioconservació i alta pressió hidrostàtica com a obstacles per millorar la seguretat del pernil curat llescat amb diferent activitat d'aigua. Treball Final de Màster. Universitat de Girona.
- Hernández, E. i Huerta, T.** (1993) Evolución de los parámetros microbiológicos del jamón curado. *Microbiología SEM* **9**, 10-19.
- Hernando, A., Tarrago, S., Purroy, F. i Tonello, C.** (2008) Advances in design for successful commercial high pressure food processing. *Food Australia* **60**(4), 3.
- Hite, B.H.** (1899) The effects of pressure in the preservation of milk. *Bulletin of the West Virginia University Agricultural Experimental Station Morgantown* **58**, 15-35.
- Hudson, J.A., Mott, S.J. i Penney, N.** (1994) Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. *Journal of Food Protection* **57**(3), 204-208.
- Hugas, M.** (2001) Bioconservación de los productos cárnicos. A *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos*. Vol. 2, pp. 1561-1584. Editat per M. Martín Bejarano. Plasencia: Ediciones Martín & Macias.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. i Monfort, J.M.** (1995) Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *Journal of Applied Bacteriology* **79**, 322-330.
- Hugas, M., Garriga, M. i Monfort, J.M.** (2002) New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science* **62**(3), 359-371.
- Hwang, C., Sheen, S. i Juneja, V.** (2011) Effects of sodium lactate on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* spp. in cooked ham at refrigerated and abuse temperatures. *Food and Nutrition Sciences* **2**(5), 464-470.
- ILSI Research Foundation/Risk Science Institute i Expert Panel on *Listeria monocytogenes* in Foods** (2005) Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis - a risk-based approach. *Journal of Food Protection* **68**(9), 1932-1994.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)** (1996) *Microorganisms in foods 5: Microbiological specifications of food pathogens*. London: Blackie Academic & Professional, pp. 524.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)** (2002) *Microorganisms in foods 7: Microbiological Testing in Food Safety Management*. Springer, pp. 362.
- International Society for Infectious Diseases (ISID)** (2013) ProMED-mail. Prrogram for monitoring emerging diseases. Bookline, Massachussets. Disponible a: <http://www.promedmail.org/> [Consulta: 11 novembre 2013]
- Janes, M.E., Kooshesh, S. i Johnson, M.G.** (2002) Control of *Listeria monocytogenes* on the surface of refrigerated, ready-to-eat chicken coated with edible zein film coatings containing nisin and/or calcium propionate. *Journal of Food Science* **67**(7), 2754-2757.
- Japan Ministry of Health and Welfare and Japan Food Chemical Research Foundation** (2000) Japan's specifications and standards for food additives (7th edition). Disponible a: <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/foodadditives/> [27 novembre 2012]

- Jofré, A., Aymerich, T. i Garriga, M. (2009a) Improvement of the food safety of low acid fermented sausages by enterocins A and B and high pressure. *Food Control* **20**(2), 179-184
- Jofré, A., Aymerich, T., Grèbol, N. i Garriga, M. (2009b) Efficiency of high hydrostatic pressure at 600 MPa against food-borne microorganisms by challenge tests on convenience meat products. *LWT-Food Science and Technology* **42**(5), 924-928.
- Jofré, A., Garriga, M. i Aymerich, T. (2007) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham through active packaging with natural antimicrobials and high-pressure processing. *Journal of Food Protection* **70**(11), 2498-2502.
- Jofré, A., Garriga, M. i Aymerich, T. (2008) Inhibition of *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cooked ham by combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration. *Meat Science* **78**(1-2), 53-59.
- Jung, S., Tonello, C. i De Lamballerie, M. (2011) High hydrostatic pressure food processing. A *Alternatives to Conventional Food Processing*. pp. 254-306. Editat per A. Proctor. RSC Pub.
- Kalchayanand, N., Sikes, A., Dunne, C.P. i Ray, B. (1998) Factors influencing death and injury of foodborne pathogens by hydrostatic pressure-pasteurization. *Food Microbiology* **15**(2), 207-214.
- Kornacki, J.L. i Gurtler, J. (2007) Incidence and control of *Listeria* in food processing facilities. A *Listeria, listeriosis and food safety*. pp. 681-766. Editat per E.T. Ryser i E.H. Marth. New York: CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Koseki, S., Mizuno, Y. i Yamamoto, K. (2007) Predictive modelling of the recovery of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked ham after high pressure processing. *International Journal of Food Microbiology* **119**(3), 300-307.
- Kuhn, M., Scortti, M. i Vázquez-Boland, J.A. (2008) Pathogenesis. A *Handbook of Listeria monocytogenes*. pp. 97-136. Editat per D. Liu. Boca Raton (Florida): CRC Press.
- Leistner, L. (1978) Hurdle effect and energy saving. A *Food Quality and nutrition*. pp. 553-557. Editat per W.K. Downey. London: Applied Science.
- Leistner, L. (2000) Use of combined preservative factors in foods of developing countries. A *Microbiological Safety and Quality of Food*. Vol. 1, p. 294. Editat per B. Lund, T.C. Baird-Parker i G.W. Gould. Gaithersburg (Maryland): Springer.
- Leistner, L. (2007) Update on hurdle technology for mild and effective preservation of foods. A *Handbook of Food Preservation*. pp. 895-904. Editat per S. Rahman. Boca Raton (Florida): CRC Press, Taylor & Francis.
- Leistner, L. i Gorris, L.G.M. (1995) Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science and Technology* **6**(2), 42-46.
- Le Marc, Y., Huchet, V., Bourgeois, C.M., Guyonnet, J.P., Mafart, P., and Thuault, D. (2002) Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *International Journal of Food Microbiology* **73**(2), 219-237.
- Lindström, M., Morkkila, M., Skyttä, E., Hyytiä-Trees, E., Lähhteinmäki, L., Hielm, S., Ahvenainen, R. i Korkeala, H. (2001) Inhibition of growth of nonproteolytic *Clostridium botulinum* type B in sous vide cooked meat products is achieved by using thermal processing but not nisin. *Journal of Food Protection* **64**(6), 838-844.
- Little, C.L., Sagoo, S.K., Gillespie, I.A., Grant, K. i McLauchlin, J. (2009) Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in selected retail ready-to-eat foods in the United Kingdom. *Journal of Food Protection* **72**(9), 1869-1877.
- Lopez-Mendoza, M.C., Ruiz, P. i Mata, C.M. (2007) Combined effects of nisin, lactic acid and modified atmosphere packaging on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw ground pork. Antimicrobials to control *Listeria* in meat. *International Journal of Food Science & Technology* **42**(5), 562-566.
- López, N., Martínez, M., Pascual, A., Gisber, M., Aparicio, J., Giner, N. i Monleón, C. (2001) Tecnología de elaboración del jamón cocido. A *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos*. Vol. 2, pp. 1352-1376. Editat per S. Martín Bejarano. Plasencia: Ediciones Martín & Macías.

- Losantos, A., Sanabria, C., Cornejo, I. i Carrascosa, A.V. (2000) Characterization of *Enterobacteriaceae* strains isolated from spoiled dry-cured hams. *Food Microbiology* **17**(5), 505-512.
- Lucore, L.A., Shellhammer, T.H. i Yousef, A.E. (2000) Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A on artificially contaminated frankfurters by high-pressure processing. *Journal of Food Protection* **63**(5), 662-664.
- Luzón, F. i Martín Bejarano, S. (2001) Fabricación de productos cárnicos tratados por el calor. A *Enciclopedia de la carne y los productos cárnicos*. Vol. 2, pp. 1377-1458. Editat per S. Martín Bejarano. Plasencia: Ediciones Martín & Macías.
- Marcos, B., Aymerich, T., Garriga, M. i Monfort, J.M. (2006) Envasado activo biodegradable para el control de *Listeria monocytogenes* en jamón cocido. *Eurocarne* **145**, 1-5.
- Marcos, B., Aymerich, T., Monfort, J.M. i Garriga, M. (2008) High-pressure processing and antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of cooked ham. *Food Microbiology* **25**(1), 177-182.
- Marín, M.E., Cornejo, I. i Carrascosa, A.V. (1993) Evaluación de riesgos e identificación de puntos críticos de control para jamón serrano español. *Eurocarne* **20**, 23-25.
- Marks, B.P. (2008) Status of microbial modeling in food process models. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **7**(1), 137-143.
- Martín, B., Garriga, M. i Aymerich, T. (2011) Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* at small-scale Spanish factories producing traditional fermented sausages *Journal of Food Protection* **74**(5), 812-815.
- Martins, E.A. i Leal Germano, P.M. (2011) *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. *Food Control* **22**(2), 297-302.
- McClements, J.M.J., Patterson, M.F. i Linton, M. (2001) The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. *Journal of Food Protection* **64**(4), 514-522.
- McKellar, R.C. i Lu, X. (2004) Primary models. A *Modeling microbial responses in food*. Editat per R. McKellar i X. Lu. Boca Raton, FL.: CRC Press.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J. i Jewell, K. (2004) *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology* **92**(1), 15-33.
- Mejlholm, O., Gunvig, A., Borggaard, C., Blom-Hanssen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F., Else, T., Visser, D. i Dalgaard, P. (2010) Predicting growth rates and growth boundary of *Listeria monocytogenes* - An international validation study with focus on processed and ready-to-eat meat and seafood. *International Journal of Food Microbiology* **141**(3), 137-150.
- Mellefont, L.A. i Ross, T. (2003) The effect of abrupt shifts in temperature on the lag phase duration of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *International Journal of Food Microbiology* **83**(3), 295-305.
- Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., amp, x, sa, Teixeira, P., Hogg, T. i Gibbs, P.A. (2004) Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology* **21**(2), 213-216.
- Mentré, P., Hamraoui, L., Hui Bon Hoa, G. i Debey, P. (1999) Pressure-sensitivity of endoplasmic reticulum membrane and nucleolus as revealed by electron microscopy. *Cellular and Molecular Biology* **45**(3), 353-362.
- Metaxopoulos, J., Mataragas, M. i Drosinos, E.H. (2002) Microbial interaction in cooked cured meat products under vacuum or modified atmosphere at 4°C. *Journal of Applied Microbiology* **93**(3), 363-373.
- Millette, M., Le Tien, C., Smoragiewicz, W. i Lacroix, M. (2007) Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control* **18**(7), 878-884.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM) (2008) Real Decreto 1079/2008, de 27 de junio, por el que se regula el marcado de los jamones y paletas y los periodos de elaboración para la utilización de determinadas menciones en el etiquetado. *Boletín Oficial del Estado* **169**, 30786-30787.

- Ministerio de Sanidad Política Social e Igualdad (MSPSI)** (2011) Orden SPI/681/2011, de 28 de marzo, por la que se modifican los anexos del 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. Boletín Oficial del Estado **76**, 33049-33056.
- Ministerio de Sanidad y Consumo (MSC)** (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. Boletín Oficial del Estado **44**, 6756-6799.
- Ministerio de Sanidad y Política Social (MSPS)** (2010) Requisitos sanitarios para la exportación de carne y productos cárnicos a Japón: *Listeria monocytogenes* Disponible a: http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/sanidadExterior/docs/auto_carne_Japon.pdf [27 novembre 2012]
- Ministry for Primary Industries of New Zealand** (2012a) Food recall issued after *Listeria* detected - reminder (3 August 2012). Disponible a: <http://www.mpi.govt.nz/news-resources/news/food-recall-issued-after-listeria-detected-remin> [Consulta: 3 agosto 2012]
- Ministry for Primary Industries of New Zealand** (2012b) Guidance for the control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Part 1: *Listeria* management and glossary. Disponible a: <http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/listeria-management-and-glossary.pdf> [Consulta: 12 settembre 2012]
- Molina-Höppner, A., Doster, W., Vogel, R.F. i Ganzle, M.G.** (2004) Protective effect of sucrose and sodium chloride for *Lactococcus lactis* during sublethal and lethal high-pressure treatments. Applied and Environmental Microbiology **70**(4), 2013-2020.
- Molina, I., Silla, H., Flores, J. i Monzo, J.L.** (1989) Study of the microbial flora in dry-cured ham. 2. *Micrococcaceae*. Fleischwirtschaft **69**(9), 1488-1490.
- Monod, J.** (1949) The growth of bacterial cultures. Annual Review of Microbiology **3**, 371-394.
- Monte, E., Villanueva, J.R. i Dominguez, A.** (1986) Fungal profiles of Spanish country-cured hams. International Journal of Food Microbiology **3**(6), 355-359.
- Moon, S.H., Paik, H.D., White, S., Daraba, A., Mendonca, A.F. i Ahn, D.U.** (2011) Influence of nisin and selected meat additives on the antimicrobial effect of ovotransferrin against *Listeria monocytogenes*. Poultry Science **90**(11), 2584-2591.
- Morales, P., Calzada, J. i Nuñez, M.** (2006) Effect of high-pressure treatment on the survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in sliced vacuum-packaged iberian and serrano cured hams. Journal of Food Protection **69**(10), 2539-2543.
- Mújica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Tonello Samson, C., Welti-Chanes, J. i Torres, J.A.** (2011) High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. Food and Bioprocess Technology **4**(6), 969-985.
- Mussa, D.M., Ramaswamy, H.S. i Smith, J.P.** (1999) High-pressure destruction kinetics of *Listeria monocytogenes* on pork. Journal of Food Protection **62**(1), 40-45.
- Myers, K., Cannon, J., Montoya, D., Dickson, J., Lonergan, S. i Sebranek, J.** (2013a) Effects of high hydrostatic pressure and varying concentrations of sodium nitrite from traditional and vegetable-based sources on the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE) sliced ham. Meat Science **94**(1), 69-76.
- Myers, K., Montoya, D., Cannon, J., Dickson, J. i Sebranek, J.** (2013b) The effect of high hydrostatic pressure, sodium nitrite and salt concentration on the growth of *Listeria monocytogenes* on RTE ham and turkey. Meat Science **93**(2), 263-268.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF)** (2010) Parameters for determining inoculated pack/challenge study protocols. Journal of Food Protection **73**(1), 140-202.
- New Zealand Food Safety Authority (NZFSA)** (2008) Microbial pathogen data sheets - *Listeria monocytogenes*. Disponible a: http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/listeria_monocytogenes-science_research.pdf [Consulta: 13 settembre 2009]
- Nguyen, V.T., Gidley, M.J. i Dykes, G.A.** (2008) Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats. Food Microbiology **25**(3), 471-478.

- Nielsen, J.W., Dickson, J.S. i Crouse, J.D. (1990) Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Applied and Environmental Microbiology* **56**(7), 2142-2145.
- Norton, T. i Sun, D.W. (2008) Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology* **1**(1), 2-34.
- Núñez, F., Rodríguez, M.M., Bermúdez, M.E., Córdoba, J.J. i Asensio, M.A. (1996a) Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology* **32**(1-2), 185-197.
- Núñez, F., Rodríguez, M.M., Córdoba, J.J., Bermúdez, M.E. i Asensio, M.A. (1996b) Yeast population during ripening of dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology* **29**, 271-280.
- Ogunmodede, F., Jones, J.L., Scheftel, J., Kirkland, E., Schulkin, J. i Lynfield, R. (2005) Listeriosis prevention knowledge among pregnant women in the USA. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* **13**(1), 11-5.
- Oscar, T.P. (2002) Development and validation of a tertiary simulation model for predicting the potential growth of *Salmonella typhimurium* on cooked chicken. *International Journal of Food Microbiology* **76**(3), 177-190.
- Oxen, P. i Knorr, D. (1993) Baroprotective effects of high solute concentrations against inactivation of *Rhodotorula rubra*. *LWT - Food Science and Technology* **26**(3), 220-223.
- Paarup, T., Nieto, J.C., Pelaez, C. i Reguera, J.I. (1999) Microbiological and physico-chemical characterisation of deep spoilage in Spanish dry-cured hams and characterisation of isolated *Enterobacteriaceae* with regard to salt and temperature tolerance. *European Food Research and Technology* **209**(5), 366-371.
- Pal, A., Labuza, T.P. i Diez-Gonzalez, F. (2008) Shelf life evaluation for ready-to-eat sliced uncured turkey breast and cured ham under probable storage conditions based on *Listeria monocytogenes* and psychrotroph growth. *International Journal of Food Microbiology* **126**(1-2), 49-56.
- Pascual Anderson, M.R. (1989) *Microbiología alimentaria: Detección de bacterias con significado higiénico-sanitario*. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, pp. 440.
- Patterson, M.F. (2005) Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology* **98**(6), 1400-1409.
- Patterson, M.F., Mackle, A. i Linton, M. (2011) Effect of high pressure, in combination with antilisterial agents, on the growth of *Listeria monocytogenes* during extended storage of cooked chicken. *Food Microbiology* **28**(8), 1505-1508.
- Patterson, M.F., McKay, A.M., Connolly, M. i Linton, M. (2010) Effect of high pressure on the microbiological quality of cooked chicken during storage at normal and abuse refrigeration temperatures. *Food Microbiology* **27**(2), 266-273.
- Peirson, M.D., Guan, T.Y. i Holley, R.A. (2003) Aerococci and carnobacteria cause discoloration in cooked cured bologna. *Food Microbiology* **20**(2), 149-158.
- Pereira de Abreu, D.A., Cruz, J.M. i Paseiro Losada, P. (2012) Active and intelligent packaging for the food industry. *Food Reviews International* **28**(2), 146-187.
- Pérez-Rodríguez, F. i Valero, A. (2013) *Predictive microbiology in foods*. New York: Springer, pp. 128.
- Porto-Fett, A.C.S., Call, J.E., Shoyer, B.E., Hill, D.E., Pshebniski, C., Cocoma, G.J. i Luchansky, J.B. (2010) Evaluation of fermentation, drying, and/or high pressure processing on viability of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Trichinella spiralis* in raw pork and Genoa salami. *International Journal of Food Microbiology* **140**(1), 61-75.
- Presidencia del Gobierno (1981) Orden de 5 de noviembre de 1981, por la que se aprueba la norma genérica de calidad para los productos cárnicos tratados por el calor. *Boletín Oficial del Estado* **268**, 26300-26303.
- 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. *Boletín Oficial del Estado* **159**, 18679-18687.

- Professional Research Organization Inc** (2003) Petitions. New uses for high pressure processing (HPP), an USDA-FSIS approved technology. Disponible a: http://www.fsis.usda.gov/PDF/Petition_Professional_%20Research_Organization.pdf [Consulta: 3 desembre 2010]
- Quintavalla, S. i Vicini, L.** (2002) Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* **62**(3), 373-380.
- Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)** (2010) The Rapid Alert System for Food and Feed Annual Report 2010. 1-64. Disponible a: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff_annual_report_2010_en.pdf [Consulta: 21 gener 2013]
- Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)** (2011) The Rapid Alert System for Food and Feed Annual Report 2011. 1-64. Disponible a: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff_annual_report_2011_en.pdf [Consulta: 21 gener 2013]
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A. i Ball, A.** (1982) Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology* **149**(1), 1-5.
- Rattanasomboon, N., Bellara, S.R., Harding, C.L., Fryer, P.J., Thomas, C.R., Al-Rubeai, M. i McFarlane, C.M.** (1999) Growth and enumeration of the meat spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology* **51**(2-3), 145-158.
- Rendueles, E., Omer, M.K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R. i Prieto, M.** (2011) Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT-Food Science and Technology* **44**(5), 1251-1260.
- Ritz, M., Pilet, M.F., Jugiau, F., Rama, F. i Federighi, M.** (2006) Inactivation of *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* using high-pressure treatments: destruction or sublethal stress? *Letters in Applied Microbiology* **42**(4), 357-362.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A. i Mackey, B.M.** (1998) The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **44**(1-2), 83-92.
- Ross, T.** (1996) Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* **81**, 501-508.
- Ross, T. i Dalgaard, P.** (2004) Secondary models. *A Modeling microbial responses in food*. Editat per R. McKellar i X. Lu. Boca Raton (Florida): CRC Press.
- Ross, T., McMeekin, T.A. i Baranyi, J.** (2000) Predictive microbiology and food safety. *A Encyclopedia of Food Microbiology*. Vol. 3, pp. 1699-1710. Editat per R.K. Robinson, C.A. Batt i D.P. Pradip. London: Academic Press.
- Rosso, L.** (1995) Modélisation et microbiologie prévisionnelle: Élaboration d'un nouvel outil pour l'Agro-alimentaire. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard, Lyon.
- Samelis, J., Kakouri, A. i Rementzis, J.** (2000) Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiology* **17**, 329-340.
- Sánchez-Molinero, F.** (2003) La problemática de *Listeria monocytogenes* en el jamón curado: posibilidades para la aplicación de lactato y el Opti.form Listeria Control Model. *A Proceeding 2º Congreso Mundial del Jamón*. Cáceres.
- Sánchez-Molinero, F. i Arnau, J.** (2008) Effect of the inoculation of a starter culture and vacuum packaging (during resting stage) on the appearance and some microbiological and physicochemical parameters of dry-cured ham. *Meat Science* **79**(1), 29-38.
- Sauders, B.D. i Wiedmann, M.** (2007) Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. *A Listeria, listeriosis and food safety*. pp. 21-53. Editat per E.T. Ryser i E.H. Marth. New York: CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Shearer, A.E., Neetoo, H.S. i Chen, H.** (2010) Effect of growth and recovery temperatures on pressure resistance of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **136**(3), 359-63.
- Sim, J., Hood, D., Finnie, L., Wilson, M., Graham, C., Brett, M. i Hudson, J.A.** (2002) Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. *Letters in applied microbiology* **35**(5), 409-13.

- Simpson, R. i Gilmour, A.** (1997a) The effect of high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* in phosphate-buffered saline and model food systems. *Journal of Applied Microbiology* **83**(2), 181- 188.
- Simpson, R. i Gilmour, A.** (1997b) The resistance of *Listeria monocytogenes* to high hydrostatic pressure in foods. *Food Microbiology* **14**, 567-573.
- Smelt, J.P.P.M.** (1998) Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science and Technology* **9**, 152-158.
- Sofos, J.N.** (2008) Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat science* **78**(1-2), 3-13.
- Stollewerk, K., Jofré, A., Comaposada, J., Arnau, J. i Garriga, M.** (2012) The effect of NaCl-free processing and high pressure on the fate of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* on sliced smoked dry-cured ham. *Meat Science* **90**, 472-477.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K. i Bigger, S.W.** (2003) Active packaging technologies with emphasis on antimicrobial packaging and its applications. *Journal of Food Science* **68**(2), 408-420.
- Tamplin, M., Baranyi, J. i Paoli, G.** (2004) Software programs to increase the utility of predictive microbiology information. *A Modeling microbial responses in food*. Editat per R. McKellar i X. Lu. Boca Raton, FL.: CRC Press.
- Tasara, T. i Stephan, R.** (2006) Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: a review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. *Journal of Food Protection* **69**(6), 1473-1484.
- Tay, A., Shellhammer, K.H., Yousef, A.E. i Chism, G.W.** (2003) Pressure death and tailing behaviour of *Listeria monocytogenes* strains having different barotolerances. *Journal of Food Protection* **2003**(66), 11.
- Toldrá, F.** (2004) *Dry-Cured Meat Products*. Trumbull (Connecticut): John Wiley & Sons.
- Toldrá, F.** (2007) Ham. *A Handbook of Food Products Manufacturing*. Vol. 2. pp. 233-249. Editat per Y.H. Hui. Hoboken (New Jersey): John Wiley & Sons.
- Toldrá, F., Mora, L. i Flores, M.** (2010) Cooked ham. *A Handbook of meat processing*. pp. 301-311. Editat per F. Toldrá. Ames (Iowa): John Wiley & Sons.
- Tonello, C.** (2012) *Procesado de alimentos por altas presiones*. Presentat a la jornada Noves tecnologies a les indústries agroalimentàries (IRTA-Monells, 29/11/2012). Disponible a: http://www.ruralcat.net/c/document_library/get_file?uuid=3c4ef8a5-9b3d-4db8-9b4c-f7a028e43d95&groupId=10136 [Consulta: 29 novembre 2012]
- Uyttendaele, M., De Troy, P. i Devereure, J.** (1999) Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. *International Journal of Food Microbiology* **53**, 75-80.
- Van Boekel, M.A.J.S.** (2008) Kinetic modeling of food quality: A critical review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **7**(1), 144-158.
- Vasilopoulos, C., De Maere, H., De Mey, E., Paelinck, H., De Vuyst, L. i Leroy, F.** (2010) Technology-induced selection towards the spoilage microbiota of artisan-type cooked ham packed under modified atmosphere. *Food Microbiology* **27**(1), 77-84.
- Ventanas, J., Ruiz, J. i Córdoba, J.J.** (2001) El jamón curado de cerdo ibérico: Descripción del proceso tradicional de elaboración. *A Enciclopedia de la carne y los productos cárnicos*. Vol. II, pp. 1221-1245. Editat per M. Martín Bejarano. Plasencia: Ediciones Martín & Macías.
- Vercammen, A., Vanoirbeek, K.G.A., Lurquin, I., Steen, L., Goemaere, O., Szczepaniak, S., Paelinck, H., Hendrickx, M.E.G. i Michiels, C.W.** (2011) Shelf-life extension of cooked ham model product by high hydrostatic pressure and natural preservatives. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **12**(4), 407-415.
- Verde, V.** (2012) Loncheados cárnicos: Cambio de estrategia. *Alimarket* **264**, 133-145.
- Vorst, K.L., Todd, E.C.D. i Ryser, E.T.** (2006) Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of turkey breast, bologna, and salami. *Journal of Food Protection* **69**, 619-626.
- Wagner, M. i McLauchlin, J.** (2008) Chapter 1: Biology. *A Handbook of Listeria monocytogenes*. pp. 3-25. Editat Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Taylor and Francis Group.

- Warriner, K. i Namvar, A.** (2009) What is the hysteria with *Listeria*? Trends in Food Science & Technology **20**(6-7), 245-254.
- Wemekamp-Kamphuis, H.H., Karatzas, A.K., Wouters, J.A. i Abee, T.** (2002) Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. Applied and Environmental Microbiology **68**(2), 456-463.
- Whiting, R.C. i Buchanan, R.L.** (1993) A classification of models for predictive microbiology. Food Microbiology **10**, 175-177.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Bierbaum, G., de Kruijff, B. i Sahl, H.-G.** (2001) Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. Journal of Biological Chemistry **276**(3), 1772-1779.
- Winter, C.H., Brockmann, S.O., Sonnentag, S.R., Schaupp, T., Prager, R., Hof, H., Becker, B., Stegmanns, T., Roloff, H.U., Vollrath, G., Kuhm, A.E., Mezger, B.B., Schmolz, G.K., Klittich, G.B., Pfaff, G. i Piechotowski, I.** (2009) Prolonged hospital and community-based listeriosis outbreak caused by ready-to-eat scalded sausages. The Journal of Hospital Infection **73**(2), 121-8.
- World Trade Organization (WTO)** (1995) Agreement on the application of sanitary and phytosanitary measures (SPS Agreement). Disponible a: http://www.wto.org/english/tratop_e/sps_e/spsagr_e.htm [Consulta: 17 agost 2013]
- Ye, M., Neetoo, H. i Chen, H.** (2008) Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. Food Microbiology **25**(2), 260-268.
- Zhu, M., Du, M., Cordray, J. i Ahn, D.U.** (2005) Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat meat products. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety **4**, 34-42.
- Zwietering, M., Wijtzes, T., Rombouts, F. i Riet, K.** (1993) A decision support system for prediction of microbial spoilage in foods. Journal of Industrial Microbiology **12**(3-5), 324-329.
- Zwietering, M.H., Cuppers, H.G.A.M., De Wit, J.C. i Van 'T Riet, K.** (1994) Evaluation of data transformations and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth. Applied and Environmental Microbiology **60**(1), 195-203.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M. i van't Riet, K.** (1990) Modeling of the bacterial growth curve. Applied and Environmental Microbiology **56**(6), 1875-1871.

2 OBJECTIUS

La tesi que es presenta s'ha centrat en l'estudi de l'efecte de diferents tecnologies de conservació dels aliments, tals com els tractaments per altes pressions i/o l'addició de bacteriocines, vers el comportament de *Listeria monocytogenes* durant la vida útil de dues tipologies diferents de productes carnis llestos per al consum o RTE, els productes curats (e.g. pernil curat) i els productes cuits (e.g. pernil cuit o mortadella).

Per tal de poder desenvolupar aquest objectiu global, es van plantejar els objectius parcials que es presenten a continuació:

1. Avaluació de l'efecte d'un tractament per altes pressions hidrostàtiques sol o combinat amb l'addició de nisina (aplicada directament o mitjançant envasat actiu) vers *L. monocytogenes*, durant la vida útil del pernil curat llestat.
2. Quantificació i modelització de la cinètica d'inactivació per altes pressions de *L. monocytogenes* en productes carnis RTE cuits. Desenvolupament d'un model predictiu d'inactivació per altes pressions hidrostàtiques.
3. Estudi, mitjançant la modelització matemàtica, de la cinètica de creixement de *L. monocytogenes* després d'un tractament per altes pressions hidrostàtiques i durant l'emmagatzematge en refrigeració de productes carnis RTE cuits.

Per a portar a terme els treballs que s'inclouen en aquesta memòria, s'han realitzat diversos assajos experimentals del tipus *challenge test*, tots ells mitjançant un enfoc orientat a producte i amb un disseny experimental acurat que permetés utilitzar la modelització matemàtica com a "eina innovadora" per al tractament dels resultats obtinguts.

El disseny dels diferents experiments, i les variables o factors d'estudi contemplats en cadascun d'ells, es resumeixen esquemàticament a la Secció 3 de Metodologia que segueix a continuació, i es descriuen detalladament en els articles científics publicats, que s'adjunten a la Secció 4 de Resultats: Publicacions.

3 METODOLOGIA

3.1 Disseny experimental i factors d'estudi

El disseny experimental dels experiments associats a cadascun dels articles que es presenten en aquesta tesi es troben detallats a la publicació corresponent. Tanmateix, per tal d'obtenir una visió global del disseny experimental utilitzat en els diferents estudis (articles) realitzats al llarg d'aquesta tesi i així mateix facilitar el seguiment de la Secció 5 de Discussió de resultats, s'ha elaborat la **Taula 16**, on es resumeixen de manera esquemàtica els trets més rellevants del disseny experimental i dels factors estudiats en cada cas.

Taula 16. Factors i valors o interval de valors utilitzats per realitzar els assajos continguts en cadascun dels articles que es presenten en aquesta tesi.

Factor		Article 1	Article 2	Article 3
Productes carnis RTE				
Curats^a				
Pernil ibèric	a _w	0,88 ± 0,00	-	-
	% greix	33,26 ± 2,57	-	-
Pernil de porc blanc	a _w	0,92 ± 0,01	-	-
	% greix	14,25 ± 0,67	-	-
Cuits^b				
Pernil cuit	a _w	-	0,98 ± 0,01	0,98 ± 0,00
	% greix	-	4,55 ± 0,41	4,43 ± 0,26
Mortadel·la	a _w	-	0,98 ± 0,00	0,98 ± 0,00
	% greix	-	17,08 ± 4,18	24,94 ± 4,57
Listeria monocytogenes CTC 1034				
(condicions del precultiu ^c i nivell d'inòcul inicial abans del tractament, CFU/g)				
	Creixement òptim (37 °C)	~10 ⁷	-	-
	Adaptada al fred (8 °C)	-	-	~10 ⁷ i ~10 ⁴
	Congelada (-80 °C)	-	~10 ⁷	~10 ⁷ i ~10 ⁴
Tractaments per altes pressions (efecte listericida)				
	Pressió (MPa)	600	Entre 300 i 800	400
	Temperatura (°C) ^d	15	15	15
	Temps (min)	5	Entre 0 i 15	5
Nisina				
	Aplicació directa (AU/cm ²)	200	-	-
	Component de films separadors de PVOH (AU/cm ²)	200	-	-
Emmagatzematge				
	Temperatura (°C)	8	-	Entre 4 i 12
	Temps (dies)	60	-	Entre 16 i 40

- No aplica.

^a Productes comercials adquirits en establiments d'alimentació.

^b Productes fabricats *ad hoc*.

^c Determinen l'estat fisiològic de *L. monocytogenes*.

^d Temperatura inicial del fluid de pressurització.

3.2 Determinacions analítiques i tractament de dades

A cadascun dels articles inclosos en la present tesi es defineix, detalladament, com i amb quines tècniques s'han realitzat les diferents determinacions analítiques i quin tractament de dades s'ha portat a terme. No obstant, i per tal de visualitzar de forma global aquestes determinacions i tractaments s'ha realitzat una taula-resum, **Taula 17**, on es troben esquematitzades per cadascuna de les publicacions les diferents determinacions fisicoquímiques i microbiològiques, i el fonament en el que es basen, així com els tractaments estadístics realitzats.

Taula 17. Anàlisis fisicoquímics i microbiològics i estadístics aplicats a cadascun dels articles que es presenten en aquesta tesi.

Anàlisis	Article 1	Article 2	Article 3	Fonament de la tècnica
Fisicoquímics				
pH	pH-metre PH25 i sonda de penetració 52-32 Crison			potenciometria
a_w	AquaLab™ Series 3			punt de rosada
Greix (%)	FOODScann™ (mètode oficial AOAC 2007.04) ³			infraroig proper (NIR)
Proteïna (%)				
Humitat (%)				
Sal (%)				
Nitrits i nitrats (mg/kg)	Norma ISO/DIS 2918 ⁴			espectrofotometria
Àcid làctic	-	HPLC amb detector IR (Transgenomic ICSeptCE-ORH-801)		cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC)
Microbiològics				
Recompte de <i>L. monocytogenes</i>	Medi selectiu <i>Chromogenic Listeria Agar</i> (CLA)			Recompte en placa
Investigació de presència/absència de <i>L. monocytogenes</i>	Enriquiment en medi nutritiu (TSBYE) i confirmació per PCR			Creixement en placa i mètode molecular
Modelització (ajust de models)				
Primaris	-	Log-lineal amb cua (<i>tail</i>)	Logístic	Regressió no lineal en dos passos o global
Secundaris	-	Polinomials	Arrel quadrada Hiperbòlic Temps de latència relativa (<i>RLT</i>)	
Estadístics				
Proves estadístiques	t-test ANOVA factorial LSD test	t-test dades aparellades F-test		Models generals lineals

- No aplica.

³Anderson, S. (2007) Determination of fat, moisture, and protein in meat and meat products by using the FOSS FoodScan™ Near Infrared Spectrophotometer with Foss artificial neural network calibration model and associated database: collaborative study. Journal of the AOAC International 90(4), 1073-1083.

⁴Anònim (1979) Orden de 31 de julio de 1979 por la que se establecen métodos oficiales de análisis de aceites y grasas, productos cárnicos, cereales y derivados, fertilizantes, productos fitosanitarios, productos lácteos, piensos, aguas y productos derivados de la uva. Vol. BOE núm. 207, pp. 20221-20346.

4 RESULTATS: PUBLICACIONS

4.1 Article 1: High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*

Hereu, A., Bover-Cid, S., Garriga, M. i Aymerich, T. (2012) International Journal of Food Microbiology 154(3), 107-112.

Índex de qualitat de la revista d'acord amb JCR 2012:

Índex d'impacte: 3,425

8/124 (1er quartil) a la categoria de Food Science & Technology.

Hereu, A., Bover-Cid, S., Garriga, M. i Aymerich, T. (2012). High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 154(3), 107-112

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.027>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511001073>

Received 14 June 2010

Received in revised form 15 December 2010

Accepted 21 February 2011

Available online 26 February 2011

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved

Abstract

This work aimed to evaluate the effect of nisin application (biopreservation) combined with high hydrostatic pressure processing (HHP) on the behavior of *Listeria monocytogenes* CTC1034 intentionally inoculated (at ca. 107 cells/g) onto the surface of ready-to-eat (RTE) sliced dry-cured ham. Two types of dry-cured ham, which had different water activities and fat contents were studied (aw of 0.92 and 14.25% fat and aw of 0.88 and 33.26% fat). Three batches were prepared for each type of product: (C) control, without nisin; (N) nisin directly applied (200 AU/cm²) and (F) nisin applied through active packaging, polyvinyl alcohol films with 200 AU/cm². Half of the samples were pressurized at 600 MPa for 5 min. Counts of *L. monocytogenes* were periodically monitored throughout 60 days of storage at 8 °C.

The physico-chemical characteristics of the products enabled the survival of *L. monocytogenes*, but it was significantly reduced by the presence of nisin. The effect of biopreservation was greater when applied directly to the surface and in the product with lower water activity in comparison with the active packaging and the high water activity products, respectively. The immediate inactivation of *L. monocytogenes* by HHP ranged from 1.82 to 3.85 Log units, depending on the type of dry-cured ham. The lower the water activity, the less was the inactivation induced by HHP, both immediately and during storage. The reduction of *L. monocytogenes* immediately after HHP and during storage was more evident in batches with nisin applied directly to the surface of the product. The pathogen was not detected in some samples from day 5 of storage in the product with higher water activity.

The effect of nisin applied through active packaging was lower than the direct application. The results of the present study indicated that HHP, as post-processing listericidal treatment, is more effective (both immediately and long term) than the use of nisin as an antimicrobial measure. However, the both hurdles combined (i.e. biopreservation and HHP) provided a wider margin of safety in the control of *L. monocytogenes* during the storage of RTE cured meat products.

Keywords

Listeria monocytogenes; High pressure processing; Nisin; Active packaging; Ready-to-eat dry-cured ham

4.2 Article 2: Modeling the high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products

Hereu, A., Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, T. i Bover-Cid, S. (2012) Innovative Food Science and Emerging Technologies 16, 305-315.

Índex de qualitat de la revista d'acord amb JCR 2012:

Índex d'impacte: 2,528

23/124 (1er quartil) a la categoria de Food Science & Technology.

Hereu, A., Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, T. i Bover-Cid, S. (2012). Modeling the high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 16, 305-315.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2012.07.005>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856412001002>

Received 26 March 2012

Accepted 18 July 2012

Editor Proof Receive 13 August 2012

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved

Abstract

High pressure (HP) inactivation curves of *Listeria monocytogenes* CTC1034 (ca. 107 CFU/g) on sliced RTE cooked meat products (ham and mortadella) were obtained at pressures from 300 to 800 MPa. A clear tail shape was observed at pressures above 450 MPa and the log-linear with tail primary model provided the best fit to the HP-inactivation kinetics. The relationships between the primary kinetic parameters (log k_{max} and log N_{res}) and pressure treatments were described by a polynomial secondary model. To estimate HP-inactivation of *L. monocytogenes* in log (N/N₀) over time, a one-step global fitting procedure was applied. The secondary model was integrated into the primary model and the combined equation was fitted to the entire data-set to readjust parameter values. Validation of the developed models both under dynamic conditions and using external independent data supported their suitability for predictive purposes, e.g., to set the process criteria required to meet food safety objectives.

Industrial relevance: Quantitative mathematical models for predicting inactivation of pathogens by HPP provide useful tools for a process optimization and real time control of a unit operation. The developed models can assist food industries to define the process criteria compatible with the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes* in RTE cooked meat products.

Keywords

Listeria monocytogenes; High hydrostatic pressure; Inactivation kinetics; Mathematical modeling; Cooked ham; Mortadella

4.3 Article 3: Analysing and modelling the growth behaviour of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products after a high pressure treatment at 400 MPa

Hereu, A., Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, T. i Bover-Cid, S. (2014) International Journal of Food Microbiology (revisió enviada el 9 d'abril de 2014).

Índex de qualitat de la revista d'acord amb JCR 2012:

Índex d'impacte: 3,425

8/124 (1er quartil) a la categoria de Food Science & Technology.

1 **Analysing and modelling the growth behaviour of *Listeria monocytogenes* on RTE**
2 **cooked meat products after a high pressure treatment at 400 MPa**

3 A. Hereu¹, P. Dalgaard², M. Garriga¹, T. Aymerich¹, S. Bover-Cid^{1*}

4

5 ¹IRTA, Food Safety Programme, Finca Camps i Armet s/n, E-17121, Spain.

6 ²Technical University of Denmark (DTU), National Food Institute, Soltofts Plads,
7 Building 221, DK-2800, Kgs. Lyngby, Denmark.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23 * Author for correspondence:

24 Dr. Sara Bover-Cid

25 IRTA, Food Safety Programme, Finca Camps i Armet s/n, E-17121, Spain

26 sara.bovercid@irta.cat

27 +34 972 630 052

28 **Abstract**

29 Various predictive models are available for high pressure inactivation of
30 *L. monocytogenes* in food, but currently available models do not consider the growth
31 kinetics of surviving cells during the subsequent storage of products. Therefore, we
32 characterised the growth of *L. monocytogenes* in sliced cooked meat products after a
33 pressurization treatment. Two inoculum levels (10^7 or 10^4 CFU/g) and two
34 physiological states before pressurization (freeze-stressed or cold-adapted) were
35 evaluated. Samples of cooked ham and mortadella were inoculated, high pressure
36 processed (400 MPa, 5 min) and subsequently stored at 4, 8 and 12°C. The Logistic
37 model with delay was used to estimate lag phase (λ) and maximum specific growth rate
38 (μ_{max}) values from the obtained growth curves. The effect of storage temperature on
39 μ_{max} and λ was modelled using the Ratkowsky square root model and the relative lag
40 time (*RLT*) concept.

41 Compared with cold-adapted cells the freeze-stressed cells were more pressure-resistant
42 and showed a much longer lag phase during growth after the pressure treatment.
43 Interestingly, for high-pressure inactivation and subsequent growth, the time to achieve
44 a concentration of *L. monocytogenes* 100-fold (2 log CFU/g) higher than the cell
45 concentration prior to the pressure treatment was similar for the two studied
46 physiological states of the inoculum. Two secondary models were necessary to describe
47 the different growth behaviour of *L. monocytogenes* on ready-to-eat cooked ham (lean
48 product) and mortadella (fatty product). This supported the need of a product-oriented
49 approach to assess growth after high pressure processing. The performance of the
50 developed predictive models for growth of *L. monocytogenes* in high-pressure
51 processed cooked ham and mortadella were evaluated by comparison with available
52 data from the literature and by using the Acceptable Simulation Zone approach. Overall,
53 91% of the relative errors fell into the Acceptable Simulation Zone.

54

55 **Key words**

56 High pressure processing, physiological state, survival, growth kinetics, mathematical
57 modelling

58 **1. Introduction**

59 The occurrence of listeriosis, caused by foodborne *Listeria monocytogenes*, in the
60 European Union has shown a fluctuating trend during the last five years, but with
61 particularly high notification rates in some countries including Finland and Spain where
62 the total number of cases increased by 97% and 90%, respectively, from 2005 to 2010
63 (EFSA, 2012). This foodborne disease shows a high fatality rate of around 20% and
64 with high risk groups being neonates, pregnant women and immunocompromised
65 individuals, especially elderly people. Epidemiological investigations have found a
66 relation between this foodborne illness and the consumption of RTE foods with high
67 numbers of *L. monocytogenes*. RTE meat products were reported as the first known
68 source of listeriosis in Europe (FSAI, 2005). Due to the public relevance of
69 *L. monocytogenes* in RTE foods, this foodborne pathogen is a priority of both regulatory
70 agencies, e.g. when setting microbiological criteria, and of the food industry, which is
71 responsible for producing safe products (Farber et al., 2011).

72 In RTE cooked meat products, such as cooked ham and mortadella, the thermal
73 treatment of the manufacturing process eliminates *L. monocytogenes*, but
74 recontamination can occur by cross-contamination during handling, slicing and
75 packaging (Patterson et al., 2010). The physico-chemical characteristics of some RTE
76 cooked meat products allow the growth of *L. monocytogenes* and it is a major safety
77 concern if the pathogen reaches high concentrations during their distribution including
78 extended refrigerated storage (Farber et al., 2011).

79 In order to eliminate *L. monocytogenes* or delay its growth in packed RTE cooked meat
80 products, producers can apply specific control measures. High hydrostatic pressure
81 (HHP) is a food preservation technology with interesting potential as a post-lethality
82 treatment for RTE products (FSIS, 2012). As a non-thermal process the pressure-
83 associated treatments minimize sensory changes, while causing microbial inactivation
84 and related shelf-life increase and safety improvement of the processed products. The
85 efficacy of HHP for inactivation of *L. monocytogenes* has been demonstrated by
86 numerous studies on inoculated products (Simonin et al., 2012; Stollewerk et al., 2014)
87 and by modelling of inactivation in laboratory broths or in selected foods, including
88 RTE cooked meat products (Bover-Cid et al., 2011a; Chen and Hoover, 2004; Doona et
89 al., 2012; Koseki and Yamamoto, 2007). However, HHP inactivation in combination
90 with subsequent growth kinetics of the surviving cells remain little studied. This is

91 unfortunate as the quantitative modelling of *L. monocytogenes* growth behaviour e.g. at
92 different storage temperatures, would enable the optimization of the processing
93 conditions to comply with food safety criteria. Concretely, Koseki et al. (2007)
94 developed a probabilistic model for a 2-log increase in concentration of
95 *L. monocytogenes* in sliced cooked ham stored at 10°C after HHP processing. Growth of
96 *L. monocytogenes* after HHP processing may depend on its physiological state and
97 possibly also on its concentration prior to the HHP treatment as well as on the food
98 matrix (Bover-Cid et al., 2011b; Hugas et al., 2002). Importantly, the effect of these
99 conditions on growth kinetics after HPP have not previously been quantified. The
100 objective of the present study was to quantitatively characterize and mathematically
101 model growth of *L. monocytogenes* in two types of RTE sliced meat products (i.e.
102 cooked ham and mortadella) during chilled (4°C to 12°C) storage and after a HHP
103 treatment. Additionally, the effect of two inoculum levels and two different
104 physiological states of *L. monocytogenes* before the HHP treatment was investigated.

105 **2. Materials and methods**

106 **2.1. Product manufacture and characterization**

107 Two different cooked meat products were studied: cooked ham (a lean product) and
108 mortadella (a fatty product). They were produced ad-hoc by a local manufacturer using
109 minced pork meat, with no fat added for cooked ham and with 20.5% fat added for
110 mortadella. The following ingredients and additives were used (g/kg): water, 120; salt,
111 19.3; sodium tripolyphosphate, 5.0; dextrose, 5.0; sodium eritorbate, 0.5 and 0.85 of
112 curing salt (sodium chloride containing 12% of sodium nitrite). Meat was minced in a
113 cutter to a particle size of 6 mm. Ingredients were homogenized in a mixer for 30 min,
114 stuffed into an impermeable plastic film, and cooked in an oven at 68°C for 5 h resulting
115 in a product core temperature of 65°C. Once cooled, the products were immediately
116 transported to the laboratory and stored at 1°C until use within one week.

117 The products were characterized physico-chemically in triplicate. The a_w was measured
118 with an AquaLab™ instrument (Series 3; Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA).
119 The pH was measured by direct measurement with a penetration probe (52-32; Crison
120 Instruments SA, Alella, Spain) connected to a portable pH-meter (PH 25; Crison
121 Instruments). Lactic acid concentration was determined by HPLC using an ion

122 exclusion column (Transgenomic ICSepICE-ORH-801, Chrom Tech Inc., MN, USA)
123 with a refractive index (RI) detector. Nitrites were determined by spectrofluorometry
124 according to the Spanish official methods (Anonymous, 1979). The fat, protein, water,
125 and sodium chloride content were determined according to the AOAC official method
126 2007.04 (Anderson, 2007) with a FoodScan™ device (FOSS Analytic, Hillerød,
127 Denmark). The *t*-test was used to compare the obtained results between the two types of
128 product.

129 **2.2. *L. monocytogenes* strain and inoculum preparation**

130 The *L. monocytogenes* CTC1034 strain was used in this work. It was originally isolated
131 from a meat product and later shown to have a high resistance to HHP treatments
132 (Bover-Cid et al., 2011a) and the fastest recovery when compared to ten different strains
133 examined in preliminary experiments (data not shown). A stock culture of the strain was
134 kept at -80°C in Brain Heart Infusion (BHI) broth (Beckton Dickinson, Sparks, Md.,
135 USA) with 2.5% NaCl (Merck, Darmstadt, Germany) and 20% glycerol.

136 One loopfull of the stock culture was grown in salted BHI (with 2.5% NaCl) at 37°C for
137 7 h. This fresh culture was used to prepare two different inoculum cultures in stationary
138 phase reaching two different physiological states:

- 139 i) one was grown in salted BHI under refrigeration at 8°C for 90 hours to
140 obtain a cold-adapted culture.
- 141 ii) the other was grown in salted BHI at 37°C overnight (18 h) and
142 subsequently freezeed (in 20% glycerol) at -80°C during less than one
143 week to obtain a freeze-stressed culture.

144 These two physiological states are relevant from two perspectives. The cold-adaptation
145 mimic the chilled conditions usually found in clean rooms for production of RTE
146 products (i.e. slicing and packaging). Freezing conditions expose cells to concentrated
147 solutes, which causes an osmotic stress similar to that caused by dry environments
148 occurring in the food industry (e.g. clean and dry food contact surfaces). Additionally,
149 some industrial processes to prepare sliced RTE products include a pre-freezing step to
150 facilitate the slicing process.

151

152 **2.3. Sample preparation**

153 Cooked ham and mortadella were aseptically sliced, placed into plastic bags and
154 inoculated with the pre-cultures described above at two different inoculum levels, *ca.*
155 10^7 or 10^4 CFU/g obtained by diluting appropriately in saline solution (0.85% NaCl
156 (Merck) and 0.1% Bacto Peptone (Beckton Dickinson)). The inoculation procedure was
157 followed according to Mejlholm and Dalgaard (2007). In brief each type of sliced
158 product was inoculated with 1% (vol/wt) of a *L. monocytogenes* pre-culture as four
159 portions of 0.25% (vol/wt). After each addition, the products were manually tumbled to
160 distribute *L. monocytogenes* on the slices. After inoculation, 25 – 28 g portions of each
161 product were vacuum packaged (EV-15-2-CD; Tecnotrip, Terrassa, Spain) in PET/PE
162 bags (oxygen permeability $<50 \text{ cm}^3/\text{m}^2/24\text{h}$ and low water vapor permeability <15
163 $\text{mg}/\text{m}^2/24\text{h}$; Sacoliva S.L., Barcelona, Spain).

164 **2.4. High hydrostatic pressure treatment and storage**

165 Samples were pressurized at 400 MPa for 5 minutes using commercial high pressure
166 processing equipment (Wave6000; Hiperbaric, Burgos, Spain) at an initial fluid
167 temperature of 15°C. The come-up rate was 220 MPa/min and the pressure release
168 almost instantaneous ($< 6 \text{ s}$). The HHP conditions applied were selected on the basis of
169 a previous work (Hereu et al., 2012) to avoid the complete inactivation of
170 *L. monocytogenes*, thus enabling quantification of the pathogen in most of the analysed
171 samples. The inactivation results and the influence of the physiological state and
172 inoculum level of *L. monocytogenes* and the type of product were statistically assessed
173 through the ANOVA test.

174 A representative part of the samples inoculated with the lower inoculum were not
175 pressure treated and used as a control. Pressurized and non-pressurized samples were
176 stored at 4, 8 and 12°C for not less than 40, 20 and 16 days, respectively. In this way, a
177 total of 36 growth curves were obtained including 24 for pressurized treatments (two
178 inoculum levels, two physiological states, two products and three storage temperatures)
179 and 12 for non-pressurized treatments (one inoculum level, two physiological states,
180 two products and three storage temperatures). For each combination of conditions, the
181 growth of *L. monocytogenes* was monitored in triplicate or duplicate as described
182 below.

183 2.5. Monitoring *L. monocytogenes*

184 Samples from all treatments were periodically analyzed with a total of 9 to 23 sampling
185 times distributed all along the refrigerated storage period. This resulted in 530
186 samplings for cooked ham and 621 samplings for mortadella. Each sample was
187 homogenized 1/10 in a Masticator Classic (IUL S.A., Barcelona, Spain) and 10-fold
188 serially diluted in physiological saline (0.85% NaCl and 0.1% Bacto Peptone).
189 *L. monocytogenes* was enumerated on chromogenic listeria agar (CLA; Oxoid Ltd.,
190 Basingstoke, Hampshire, UK), incubated at 37°C during 48 h. To achieve a
191 quantification limit of 4 CFU/g, 2.5 ml of the 1/10 diluted homogenate was spread on
192 CLA plates with a diameter of 14 cm. For samples with expected concentration of
193 *L. monocytogenes* below this quantification limit, the presence/absence of the pathogen
194 was investigated by enrichment of 25 g-samples in 225 ml tryptic soy broth (Beckton
195 Dickinson) supplemented with 0.6% yeast extract (TSBYE) and incubated 48 h at 37°C.
196 After enrichment, the presence of *L. monocytogenes* was detected by plating on CLA
197 and then colonies were confirmed by PCR (Aymerich et al., 2005). For modelling
198 purposes, and in order to obtain quantitative results the method of Thomas (1942),
199 based on the most probable number (MPN), was applied considering the enrichment
200 results in triplicate. In this way, absence in 25 g in three replicates was computed as
201 0.01 CFU/g while presence in 25 g for the three replicates corresponded to 1.10 CFU/g.

202 2.6. Data analysis and growth model development

203 To estimate the kinetic growth parameters for each growth curve the primary Logistic
204 growth model with delay (eq. 1) was fitted to the obtained log-transformed data using
205 the Solver Add-in in the MS-Excel software (Microsoft Corp., Redmond, WA., USA).

206

$$207 \quad \text{Log}(N_t) = \text{Log}(N_0) \quad , \quad t \leq \lambda$$

$$208 \quad \text{Log}(N_t) = \text{Log} \left(\frac{N_{max}}{1 + \left(\frac{N_{max}}{N_0} - 1 \right) \cdot \exp(-\mu_{max} \cdot (t - \lambda))} \right) \quad , \quad t > \lambda \quad \text{eq. 1}$$

209 where N_t is the bacterial concentration (CFU/g) at time t , N_{max} is the maximum bacterial
210 concentration (CFU/g), μ_{max} is the maximum specific growth rate (h^{-1}) and λ is the lag
211 time (h).

212 An F -test was used to compare growth curves and determine if the estimated lag time
213 for each growth curve was statistically significant (Brown and Rothery, 1993; Dalgaard,

214 1995). The effect of the factors related to *L. monocytogenes* (i.e. physiological state and
 215 inoculum level), the product (i.e. cooked ham and mortadella) and the high-pressure
 216 treatment on the primary kinetic parameters was further examined using the pair-wise *t*-
 217 test. The effect of the storage temperature on the primary growth parameters (μ_{max} and
 218 λ) was quantified and modelled. The Ratkowsky square root model (eq. 2) (Ross and
 219 Dalgaard, 2004) was used to fit the growth rate (μ_{max} , h⁻¹) values determined at different
 220 storage temperature:

$$221 \quad \sqrt{\mu_{max}} = b \cdot (T - T_{min}) \quad \text{eq. 2}$$

222 where *b* is a constant, *T* is the temperature, and *T_{min}* a theoretical minimum temperature
 223 for growth.

224 Two different approaches were explored to model the effect of temperature on lag time
 225 (λ , h). The relative lag time (*RLT*) concept, with *RLT*, defined as the ratio of the lag time
 226 to the generation time (GT) was used to develop a secondary lag time model (eq. 3,
 227 (Ross and Dalgaard, 2004). The effect of the products, the storage temperature and the
 228 physiological state of *L. monocytogenes* on *RLT* was evaluated by ANOVA as
 229 suggested by Delignette-Muller (1998).

230

$$231 \quad \lambda = RLT \cdot GT = \frac{RLT \cdot \ln(2)}{\mu_{max}} = \frac{RLT \cdot \ln(2)}{(b \cdot (T - T_{min}))^2} \quad \text{eq. 3}$$

232

233 where the effect of storage temperature on $RLT = k_1 + k_2/T^2$ was suggested from the
 234 results obtained, see section 3.3).

235 In addition, the extended hyperbola model (eq. 4), was evaluated by using a natural
 236 logarithm transformation of the λ data (Zwietering et al., 1994):

$$237 \quad \ln \lambda = \ln \left(\frac{p}{T - q} \right) \quad \text{eq. 4}$$

238 where *p* is the rate of change of lag time as a function of temperature, *T* is the storage
 239 temperature and *q* is the temperature at which lag time is infinite.

240 After using the classical predictive microbiology two-step modelling approach, the one-
 241 step or global regression procedure was applied (Jewell, 2012; Martino and Marks,
 242 2007). A combined global model (eq. 5), integrating the selected secondary models for λ
 243 and μ_{max} into the primary model (eq.1), was fitted to the entire set of data points (530 for
 244 cooked ham and 621 for mortadella) in one regression.

$$245 \quad \text{Log}(N_t) = \text{Log}(N_0) \quad , \quad t \leq \lambda$$

246
$$\text{Log}(N_t) = \text{Log} \frac{N_{max}}{1 + \left(\frac{N_{max}}{N_0} - 1 \right) \cdot \exp \left(- (b \cdot (T - T_{min}))^2 \cdot \left(t - \frac{(k_1 + k_2 / T^2) \cdot \ln(2)}{(b \cdot (T - T_{min}))^2} \right) \right) } , t > \lambda \text{ eq. 5}$$

247

248 The *F*-test was used to assess the need of different models depending on the product
 249 type and physiological state of *L. monocytogenes* (Zwietering et al. 1990).

250 **2.7. Evaluation of the growth model**

251 The statistical performance of the mathematical models was assessed in terms of root
 252 mean square error (RMSE), the adjusted determination coefficient (R^2_{adj}) and by using
 253 graphs of observed and fitted values. In addition, growth recorded for *L. monocytogenes*
 254 in RTE meat products pressurized at 400 MPa from independent experiments (Jofré et
 255 al., 2007; Marcos et al., 2008; Myers et al., 2013; Bover-Cid et al., in preparation) were
 256 compared with simulations obtained by the models developed in the present study. To
 257 compare the observed and simulated growth (log CFU/g) during chilled storage, the
 258 Acceptable Simulation Zone (ASZ) was used, with ASZ defined as ± 0.5 log CFU/g.
 259 Simulations were considered acceptable when at least 70% of the observed log CFU/g
 260 values were inside the corresponding acceptable zone (Møller et al., 2013).

261 **3. Results**

262 **3.1. Product characterization**

263 The studied cooked ham had the following characteristics, average (\pm standard
 264 deviation): pH of 6.1 (± 0.2), a_w of 0.980 (± 0.004), sodium chloride content of 2.8%
 265 (± 0.13), lactic acid concentration of 7000 mg/kg (± 1913), sodium nitrite below the
 266 detection limit (< 5 mg/kg), 73.6% (± 0.3) of moisture, 18.2% (± 1.1) of protein and
 267 4.4% (± 0.3) of lipid content. Mortadella had pH of 6.3 (± 0.1), a_w of 0.976 (± 0.002),
 268 sodium chloride content of 2.5% (± 0.2), lactic acid concentration of 4300 mg/kg (± 356),
 269 sodium nitrite below the detection limit (< 5 mg/kg), 57.5% (± 3.4) of moisture, 14.0%
 270 (± 0.9) of protein and 24.9% (± 4.6) of lipid content. Statistically significant ($p < 0.05$)
 271 differences between the two meat products were recorded for moisture, protein and
 272 especially for the lipid content.

273 **3.2. *L. monocytogenes* growth kinetics**

274 *L. monocytogenes* was able to growth on the studied RTE cooked meat products when
275 stored at 4°C, 8°C or 12°C. The λ (h) and μ_{max} (h^{-1}) values estimated from these data are
276 shown in Table 1.

277 For samples without high-pressure treatment, the physiological state of the inoculated
278 *L. monocytogenes* (i.e. adapted at 8°C or frozen at -80°C) had no influence on the
279 growth kinetics of the pathogen during the subsequent refrigerated storage (Table 1).
280 Irrespective of the physiological state, no lag time was observed, except for freeze-
281 stressed *L. monocytogenes* on mortadella stored at 4°C, and the growth rates were
282 similar for both products on average being $0.032\pm 0.005 h^{-1}$, $0.070\pm 0.003 h^{-1}$ and
283 $0.117\pm 0.003 h^{-1}$ at 4°C, 8°C, and 12°C, respectively.

284 The HHP treatment caused a significant reduction of the initial *L. monocytogenes* loads,
285 being mainly dependant on the physiological state of the pathogen, as determined by the
286 ANOVA test ($p < 0.05$). As shown in Table 2, the HHP-inactivation of cold-adapted
287 cells was higher than that observed for freeze-stressed cells. Accordingly, the
288 concentration of *L. monocytogenes* at time zero of the growth curves and the
289 corresponding estimated values for Log N_0 in the experiments with cold-adapted cells
290 were on average 3.2 Log units (ranging from 1.7 up to 4.4) lower than the values
291 estimated for freeze-stressed cells (Table 1). Furthermore, the concentrations of
292 *L. monocytogenes* after HHP treatment showed a higher relative standard deviation
293 (RSD of 55% on average) for freeze stressed cells in comparison with the cold-adapted
294 cells (average RSD of 22%). The effect of the HHP treatment did not depend on the
295 inoculum level but it seemed slightly more pronounced for cooked ham compared to
296 mortadella ($p > 0.05$, as determined by ANOVA).

297 The physiological state of *L. monocytogenes* notably affected the lag phase during the
298 refrigerated storage after the HHP treatment. For freeze-stressed *L. monocytogenes*, a
299 significant lag phase was observed. Lag times seemed slightly shorter in cooked ham
300 than in mortadella (Table 1), though the differences were not always statistically
301 significant. For *L. monocytogenes* previously adapted at 8°C, the lag phase was
302 generally observed in products stored at 4°C, possibly reflecting that this growth
303 temperature was lower than the temperature of 8°C used for adaptation of the cells.

304 Opposed to the situation for HHP inactivation and lag time, the physiological state of
305 *L. monocytogenes* showed no significant influence on the subsequent growth rate
306 irrespectively of the type of product and the inoculum level (Table 1).

307 **3.3. Modelling the effect of storage temperature**

308 Figure 1 plots the estimated values and the fit of the corresponding secondary models
309 for μ_{max} (eq. 2, Figure 1a) and λ (eq. 3, Figure 1b). For μ_{max} , data from experiments
310 obtained using freeze-stressed *L. monocytogenes* inoculated at *ca.* 10^7 CFU/g were
311 withdrawn, as the bacterial load after HHP was above *ca.* 10^5 CFU/g. This resulted in a
312 limited margin for exponential growth and therefore unreliable μ_{max} estimates.

313 The effect of temperature on the lag time was assessed by applying the *RLT* concept and
314 included all data sets even if no significant lag time was detected in the primary model
315 fitting. According to the ANOVA test, the storage temperature affected the observed
316 *RLT* values calculated as $(\lambda \cdot \mu_{max}) / \text{Ln}(2)$. *RLT* was higher at 4°C than at 8°C and 12°C,
317 indicating the need of including temperature as an independent variable for the *RLT*
318 concept model (eq 3). Furthermore, the observed *RLT* values were strongly dependent
319 on the physiological state of *L. monocytogenes*, being higher for cells previously frozen
320 at -80°C than those adapted to 8°C (Figure 1c), indicating the need for different *RLT*
321 estimates in the model.

322 The estimated parameters for the above described μ_{max} and λ models obtained through
323 the two-step modelling approach are shown in Table 3 together with the associated
324 goodness of fit indexes.

325 The extended hyperbola model (eq. 4) was exclusively fitted to values of $\text{Ln } \lambda$ obtained
326 from experiments with freeze-stressed *L. monocytogenes*, for which the lag time was
327 always significant. The estimated model parameters obtained through the two-step
328 modelling approach are gathered in Table 4.

329 The one-step global regression approach was used to estimate model parameters by
330 combining the square root model for growth rate with lag time models, using both the
331 *RLT* concept (Table 3) and the extended hyperbola model (Table 4). The global model
332 using the *RLT* concept resulted in a better fit than the one with the extended hyperbola
333 model, and an *F*-test indicated that the complexity of the model using the *RLT* (i.e. with
334 more parameters, Table 3) is better than the simplest model (Table 4). Moreover, an *F*-
335 test also confirmed that product-specific models were necessary to better describe the
336 behaviour of *L. monocytogenes* on refrigerated cooked ham and mortadella after HHP

337 treatment (Table 3). Figures 2 and 3 plots the observed *L. monocytogenes* counts in
338 cooked ham and mortadella, respectively, treated by HHP (400 MPa for 5 min) *versus*
339 fitted values obtained using the global model (eq. 5, Table 3).

340 **3.4. Model evaluation**

341 The performance of the developed models for freeze-stressed and cold-adapted cells of
342 *L. monocytogenes* strain CTC 1034 (eq. 5, Table 3) were evaluated by using the
343 Acceptable Simulation Zone (ASZ) approach and the results are shown in Table 5. Both
344 models provided reasonable simulation of lag phases and growth rates for another
345 *L. monocytogenes* isolate (CTC1587) growing in cooked ham or mortadella stored at
346 8°C, after being pressurised at 400MPa for 5 min. Observations and simulations showed
347 a clear lag phase for freeze-stressed cells and the apparent absence of a lag phase for the
348 cold-adapted cells (Figure 4). Simulations were slightly less accurate for other studies
349 using a mixture of *L. monocytogenes* isolates, pre-cultured overnight at 30 - 37°C prior
350 to HHP treatment at 400 MPa and subsequent storage of cooked ham at 4.4 – 6°C (Jofré
351 et al., 2007; Marcos et al., 2008; Myers et al., 2013) (Figure 5). The pathogen showed
352 lag time and growth rates similar to that predicted by the developed model for freeze-
353 stressed cells (Figure 5 a and b), and from 90 to 100% of relative errors fell within the
354 ASZ (Table 5). Compared to the predictions, a longer lag and slower growth rate
355 (Figure 5 c) was observed by Jofré et al. (2007), for which less than 70% of the relative
356 errors fell within the ASZ (Table 5). However it is hard to attribute this disagreement to
357 the product or to the *L. monocytogenes* strains, as they were equivalent to the work
358 published by Marcos et al. (2008) for which more than 90% of the relative errors were
359 within the ASZ.

360

361 **4. Discussion**

362 The product characteristics of the studied cooked ham and mortadella were typical for
363 commercial RTE cooked meat products with low and high fat content, respectively
364 (Glass et al., 2007; Hereu et al., 2012; López et al., 2001; Novelli et al., 1998).
365 Consequently, the results obtained in the present study may be relevant for a wide range
366 of similar products. This is important as product characteristics of cooked ham and
367 mortadella influenced growth of *L. monocytogenes* during refrigerated storage after

368 HHP processing and therefore two significantly different mathematical models were
369 required to appropriately describe growth in the two products (Table 3). μ_{max} was little
370 influenced by the type of product whereas λ was significantly shorter for the lean
371 cooked ham than for the fatty mortadella. From literature, it is difficult to determine the
372 impact of fat in meat products on the growth kinetics of *L. monocytogenes* during
373 refrigerated storage. Although not fully comparable, Dickson (1989) showed a longer
374 lag period of *L. monocytogenes* on fatty beef tissue compared to lean beef tissue when
375 stored at 5°C under high moisture and aerobic conditions, which is in agreement with
376 our results. On the contrary, Grau and Vanderlinde (1993) described a shorter lag of
377 *L. monocytogenes* grown on beef fat tissue in comparison with that observed on lean
378 beef tissue. These authors also found growth rates in fatty tissue to be higher than in
379 lean tissue and this could explain the shorter lag phase according to the relation between
380 μ_{max} and λ observed in the present study (eq. 3). However, the *Listeria* model developed
381 by the Danish Meat Research Institute, [DMRI, <http://dmripredict.dk>] predicts the
382 growth rate of the pathogen in emulsified products with > 10% fat to be slightly faster
383 than in entire muscle products with \leq 10% fat. This was not confirmed by the results of
384 the present study.

385 According to Jewell (2012), the one-step fitting of a global model integrating a primary
386 and a secondary kinetic models is better at estimating parameters (e.g. μ_{max} and λ) and
387 describing bacterial concentrations, allowing the construction of more robust models on
388 smaller data sets. The present study confirmed a superior fitting of bacterial
389 concentrations by the one-step global approach (Table 3, Figures 2 and 3). At the same
390 time we found the two-step procedure useful in the early stages of the model
391 development to explore data, identify the relevant factors and select the nature of
392 models to fit to the experimental data. Additionally, the two-step approach generated the
393 initial values for the subsequent global regression to obtain the final model. Estimates of
394 both *RLT* and T_{min} differed between the two-step and one-step regression approach as
395 well as between the use of the *RLT* and hyperbola model for lag (Tables 3 and 4). T_{min} -
396 values of \sim 0°C to -5°C are typical for *L. monocytogenes* when growing in muscle foods
397 (Augustin and Carlier, 2000; Devlieghere et al., 2001; Mejlholm et al., 2010). Using the
398 *RLT* concept, the estimated T_{min} -values of -1.8°C to -4.8°C for the one-step approach
399 and -5.3°C to -5.5°C for the two-step approach were similar to previous studies,
400 whereas those estimated with the extended hyperbola lag model (Table 4) were

401 unrealistic. Moreover, the fit of the models using the extended hyperbola lag model
402 were inferior, and these models were not studied further.

403 Overall, the inoculum level did not influence the estimated kinetic parameters (μ_{max} and
404 λ) in the present study (Table 1). In agreement with this, growth of *L. monocytogenes* on
405 vacuum-packaged lean beef tissue at 5°C was similar for low (*ca.* $2.5 \cdot 10^2$ CFU/cm²) and
406 higher (*ca.* $3 \cdot 10^4$ CFU/cm²) inoculum levels (Dickson, 1989). These findings support
407 the use of relatively high inoculum level to study for example the effect of HHP on the
408 subsequent growth of *L. monocytogenes* during storage of products. In some
409 experiments of the present study, the concentrations of *L. monocytogenes* after the HHP
410 treatment (N_0) were close to the limit of quantification; this could contribute to the high
411 variability observed for *L. monocytogenes* adapted at 8°C, inoculated at 10^4 CFU/g and
412 stored at 4°C (Figures 2 and 3). In fact, an increasing variability of the lag phase
413 duration can be expected when lowering the cell concentration, lowering the storage
414 temperature and especially after the application of environmental stresses (Devlieghere
415 et al., 2006), such as the HHP treatment.

416 The impact of the physiological state of *L. monocytogenes* on the pressure-related
417 behaviour was relevant to both immediate inactivation and to the subsequent growth
418 during product storage. Freeze-stressed cells were less inactivated suggesting a
419 significant protection against the lethal effect of HHP in comparison with cells adapted
420 at 8°C. These findings were observed in previous experiments (Bover-Cid et al., 2011b)
421 though the physiological mechanisms providing the protective effect against HHP have
422 not been elucidated. The cold shock proteins (CSPs) induced at low temperatures are
423 known to protect microorganism from freezing stress (Wouters et al., 1999) and have
424 also been related to an increased survival during HHP treatments (Wemekamp-
425 Kamphuis et al., 2002). However, this mechanism cannot explain the different HHP
426 inactivation observed between cold-adapted and freeze-stressed cells. Nevertheless,
427 frozen cells are exposed to concentrated solutes and can respond in the same way as to
428 an osmotic stress exposure (Wesche et al., 2009), which is known to generate protection
429 against pressure (Molina-Höppner et al., 2004). Therefore, a stress-induced cross-
430 protection mechanism can be hypothesized to explain the lower HHP-inactivation of
431 freeze-stressed cells in comparison to those adapted at 8°C. This result indicates that
432 when assessing the effectiveness of HHP processing as a standalone process, the
433 physiological state of the pathogen just before the treatment is highly relevant for

434 determining the concentration of the pathogen after the pressurization and thus at the
435 beginning of the storage.

436 Focusing on the growth outcomes, neither the HHP nor the physiological state of
437 *L. monocytogenes* CTC1034 affected the growth rate of the pathogen strain during the
438 subsequent refrigerated storage of cooked meat products. It seems that the processing
439 conditions applied in the present work did not modify the genetic growth potential of
440 the *L. monocytogenes* strain. Karatzas et al. (2002) described a piezotolerant isolate of
441 *L. monocytogenes* ScottA showing a lower growth rate among other characteristics,
442 which were attributed to a specific mutation.

443 The physiological state of the *L. monocytogenes* culture submitted to a freezing
444 temperature before the pressurization caused a significant lag phase (λ), not only during
445 the storage at 8°C as previously reported (Bover-Cid et al., 2011b) but for the
446 temperature range from 4°C to 12°C where the effect was characterised by using the
447 *RLT*-concept (Table 3). From the present study, it is not possible to elucidate the
448 physiological mechanisms underlying these findings but the applied modelling approach
449 allowed an empirical quantification. *RLT* is known to reflect the physiological state of
450 bacteria when submitted to a new environment and can be interpreted as the amount of
451 work the cell has to do to adapt and grow at μ_{max} in that new environment (Ross and
452 Dalgaard, 2004). Low *RLT* values have been reported for cells previously grown at low
453 incubation temperatures near the subsequent storage temperature (Delignette-Muller,
454 1998), as it was observed for *L. monocytogenes* adapted at 8°C in the present study. On
455 the other hand, the *RLT* values for freeze-stressed *L. monocytogenes* on HHP treated
456 cooked meat products were much higher than the usually reported *RLT* values for
457 *L. monocytogenes* in the range of 3-8 (Ross, 1999; Augustin and Carlier, 2000;
458 Devlieghere et al. 2001). Apparently, the physiological changes providing protection to
459 freeze-stressed *L. monocytogenes* against pressure needed more time to be reverted, and
460 thus increasing the “work to be done” before the cells were ready to begin the
461 exponential growth.

462 The different growth behavior between freeze-stressed and cold-adapted
463 *L. monocytogenes* (Figure 4 and Figure 6) could also be related to the occurrence of
464 different sub-populations after the HHP treatment. Most cold-adapted cells would be
465 killed by HHP, but a small fraction of survivors would be non-injured and able to
466 initiate growth without latency. For freeze-stressed cells, a major fraction would not be
467 inactivated but injured, so that they were unable to grow in the refrigerated product.

468 However, plate count would enable enumeration of these injured cells resulting in the
469 steady cell concentration during the period identified as a lag phase. Again, a small
470 fraction of non-injured survivors, able to grow, exists but could not be detected and
471 quantified until they outgrew the injured and non-growing sub-population. Further
472 studies would be needed to clarify this hypothesis, for instance, by monitoring the
473 occurrence of sub-lethally injured cells (Busch and Donnelly, 1992).

474 In food processing, *L. monocytogenes* cells that could contaminate cooked meat
475 products are likely to have various physiological states and thus the prediction of their
476 response may seem complicated. However, the present study indicates that the
477 combined effect of HHP inactivation and subsequent growth of *L. monocytogenes* in
478 cooked meat products during chilled storage could be simulated irrespectively of the
479 initial physiological stage of the pathogen. As an example, from the food safety
480 standpoint, it can be useful to assess the time that *L. monocytogenes* takes to increase 2-
481 log units from its concentration (N_c) before the HHP treatment is applied. Figure 6
482 illustrates the behaviour of *L. monocytogenes* inoculated at $N_c=10^4$ CFU/g on cooked
483 ham pressurized at 400 MPa for 5 min and stored at 8°C, simulated with the developed
484 models (Table 3). The predicted time to reach the critical concentration is similar for
485 freeze-stressed and cold-adapted cells, being *ca.* 11.2-11.5 days. Therefore, even if the
486 physiological state of the inocula is an important variable that should be defined in the
487 presentation of any model focused on the prediction of lag times or death rates (Ross,
488 1999), data obtained in the present work indicate that knowledge of the physiological
489 state of *L. monocytogenes* would not be required to estimate the time taken to reach a
490 concentration 2-log higher than the contamination level before the HHP treatment.

491 The present study developed new models to predict growth *L. monocytogenes* in high
492 pressure processed cooked ham and mortadella (Table 3). HHP inactivation models for
493 freeze-stressed *L. monocytogenes* in cooked meat products are available (Hereu et al.,
494 2012) and can be used in combination with the new models for freeze-stressed cells to
495 predict potential growth of *L. monocytogenes* to critical concentrations during chilled
496 storage and distribution of the high pressure processed meat products.

497 The evaluation study confirmed that the new models developed in the present study
498 provided acceptable simulations of growth of *L. monocytogenes*, though being slightly
499 conservative (i.e. fail-safe). This was to some extent expected as the present study used
500 a rapidly growing meat product isolate of *L. monocytogenes* (CTC1034). The new
501 models provided lag time predictions corresponding to *RLT* values of 1.0-5.3 for cold

502 adapted cells and 5.9-19.1 for freeze-stressed cells (Table 3). These RLT values differ
503 markedly from those of 3-8 derived by available *L. monocytogenes* growth models
504 (Devlieghere et al., 2001; Pathogen Modeling Program [PMP,
505 <http://pmp.arserrc.gov/PMPOne.aspx>]; Mejlholm et al., 2010). This makes the
506 models developed in the present study more appropriate to use in combination with the
507 available HHP inactivation model for freeze-stressed cells and specific types of meat
508 products (Figure 4 and 5).

509 Extensive product validation studies previously showed detailed growth models
510 including the effect of storage conditions (temperature and CO₂) and product
511 characteristics (NaCl/a_w, pH, organic acids, smoke components and residual nitrite) to
512 accurately predict μ_{max} -values for *L. monocytogenes* in meat products including cooked
513 ham (Mejlholm et al., 2010). Further studies are needed to evaluate if these predictive
514 models accurately can predict growth responses of cold adapted *L. monocytogenes* cells
515 after high pressure treatment in meat products. As shown in the present study,
516 temperature dependant RLT-models may be required (Table 3). However, an interesting
517 perspective is to obtain flexible and accurate models for the combined effect of high
518 pressure treatment and subsequent growth depending on product, processing and storage
519 conditions.

520

521 **5. Acknowledgements**

522 The work was financially supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación
523 (RTA2007-00032 and CSD2007-00016). Anna Hereu thanks the Instituto Nacional de
524 Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) for the doctoral fellowship.
525 The authors would like thank Ms. Sandra Casellas for her valuable technical support.

526

527 **6. References**

528 Anderson, S., 2007. Determination of fat, moisture, and protein in meat and meat products by
529 using the FOSS FoodScan™ Near Infrared Spectrophotometer with Foss artificial neural
530 network calibration model and associated database: collaborative study. Journal of the
531 AOAC International 90, 1073-1083.

532 Anonymous, 1979. Orden de 31 de julio de 1979 por la que se establecen métodos oficiales de
533 análisis de aceites y grasas, productos cárnicos, cereales y derivados, fertilizantes, productos
534 fitosanitarios, productos lácteos, piensos, aguas y productos derivados de la uva. Boletín
535 Oficial del Estado 207, 20221-20346.

536 Augustin, J., Carlier, V., 2000. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for
537 *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 56, 29-51.

538 Aymerich, T., Jofré, A., Garriga, M., Hugas, M., 2005. Inhibition of *Listeria monocytogenes*
539 and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked
540 ham. Journal of Food Protection 68, 173-177.

541 Bover-Cid, S., Belletti, N., Garriga, M., Aymerich, T., 2011a. Model for *Listeria*
542 *monocytogenes* inactivation on dry-cured ham by high hydrostatic pressure processing. Food
543 Microbiology 28, 804-809.

544 Bover-Cid, S., Hereu, A., Garriga, M., Aymerich, M.T., 2011b. Pre-culture conditions as a key
545 factor of the behaviour of *Listeria monocytogenes* on high pressure processed RTE cooked
546 meat products, TUBITAK-MAM 4th International Congress on Food and Nutrition and
547 SAFE Consortium 3rd International Congress on Food Safety, Istanbul, Turkey, p. 65.

548 Brown, D., Rothery, P., 1993. Models in biology: mathematics, statistics, and computing. John
549 Wiley and Sons Ltd., Chichester (UK).

550 Busch, S; Donnelly, C. 1992. Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of
551 heat-injured *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. Applied and Environmental
552 Microbiology 58, 14-20.

553 Chen, H., Hoover, D.G., 2004. Use of Weibull model to describe and predict pressure
554 inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. Innovative Food Science &
555 Emerging Technologies 5, 269-276.

556 Dalgaard, P., 1995. Modelling of microbial activity and prediction of shelf-life for packed fresh
557 fish. International Journal of Food Microbiology 26, 305-317.

558 Delignette-Muller, M.L., 1998. Relation between the generation time and the lag time of
559 bacterial growth kinetics. International Journal of Food Microbiology 43, 97-104.

560 Devlieghere, F., Francois, K., De Meulenaer, B., Baert, K., 2006. Modelling food safety. In:
561 Luning, P.P.A., Devlieghere, F., Verh , R. (Eds.), Safety in the agri-food chain. Wageningen
562 Academic Pub, pp. 397-437.

563 Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Vandewaetere, B., Van Impe, J., Debevere, J.,
564 2001. Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat
565 products: a predictive model. Food Microbiology 18, 53-66.

566 Dickson, J.S., 1989. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on beef tissue surfaces as
567 affected by simulated processing conditions. Journal of Food Safety 10, 165-174.

568 Doona, C.J., Feeherry, F.E., Ross, E.W., Kustin, K., 2012. Inactivation kinetics of *Listeria*
569 *monocytogenes* by high-pressure processing: pressure and temperature variation. Journal of
570 Food Science 77, M458-M465.

571 European Food Safety Authority (EFSA), 2012. The European Union summary report on trends
572 and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in
573 2010. The EFSA Journal 10 (3), 2597-3039.

574 Farber, J.M., Kozak, G.K., Duquette, S., 2011. Changing regulation: Canada's new thinking on
575 *Listeria*. Food Control 22, 1506-1509.

576 Food Safety and Inspection Service (FSIS), 2012. Compliance guidelines: controlling *Listeria*
577 *monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products. Available
578 at: http://www.fsis.usda.gov/shared/PDF/Controlling_LM_RTE_guideline_0912.pdf
579 [accessed Desember 2013].

580 Food Safety Authority of Ireland (FSAI), 2005. The control and management of *Listeria*
581 *monocytogenes* contamination of food. FSAI, Dublin, p. 94.

582 Glass, K.A., McDonnell, L.M., Rassel, R.D., Zierke, K.L., 2007. Controlling *Listeria*
583 *monocytogenes* on sliced ham and turkey products using benzoate, propionate and sorbate.
584 Journal of Food Protection 70, 2306-2317.

585 Grau, F.H., Vanderlinde, P.B., 1993. Aerobic growth of *Listeria monocytogenes* on beef lean
586 and fatty tissue: Equations describing the effects of temprerature and pH. Journal of Food
587 Protection 56, 96-101.

588 Hereu, A., Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, T., Bover-Cid, S., 2012. Modeling the high
589 pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products.
590 Innovative Food Science & Emerging Technologies 16, 305-315.

591 Hugas, M., Garriga, M., Monfort, J.M., 2002. New mild technologies in meat processing: high
592 pressure as a model technology. Meat Science 62, 359-371.

593 Jewell, K., 2012. Comparison of 1-step and 2-step methods of fitting microbiological models.
594 International Journal of Food Microbiology 160, 145-161.

595 Jofré, A., Garriga, M., Aymerich, T., 2007. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham
596 through active packaging with natural antimicrobials and high-pressure processing. Journal
597 of Food Protection 70, 2498-2502.

598 Karatzas, A.G., Bennik, M.H.J., 2002. Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A
599 isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure. Applied and Environmental
600 Microbiology 68, 3183-3189.

601 Koseki, S., Mizuno, Y., Yamamoto, K., 2007. Predictive modelling of the recovery of *Listeria*
602 *monocytogenes* on sliced cooked ham after high pressure processing. International Journal of
603 Food Microbiology 119, 300-307.

604 Koseki, S., Yamamoto, K., 2007. Modelling the bacterial survival/death interface induced by
605 high pressure processing. *International Journal of Food Microbiology* 116, 136-143.

606 López, N., Martínez, M., Pascual, A., Gisber, M., Aparicio, J., Giner, N., Monleón, C., 2001.
607 Tecnología de elaboración del jamón cocido. In: Macias, M. (Ed.), *Enciclopedia de la carne*
608 *y de los productos cárnicos*, pp. 1352-1376.

609 Marcos, B., Aymerich, T., Monfort, J.M., Garriga, M., 2008. High-pressure processing and
610 antimicrobial biodegradable packaging to control *Listeria monocytogenes* during storage of
611 cooked ham. *Food Microbiology* 25, 177-182.

612 Martino, K.J., Marks, B.P., 2007. Comparing uncertainty resulting from two-step and global
613 regression procedures applied to microbial growth models. *Journal of Food Protection* 70,
614 2811-2818.

615 Mejlholm, O., Dalgaard, P., 2007. Modeling and predicting the growth boundary of *Listeria*
616 *monocytogenes* in lightly preserved seafood. *Journal of Food Protection* 70, 70-84.

617 Mejlholm, O., Gunvig, A., Borggaard, C., Blom-Hanssen, J., Mellefont, L., Ross, T., Leroi, F.,
618 Else, T., Visser, D., Dalgaard, P., 2010. Predicting growth rates and growth boundary of
619 *Listeria monocytogenes* -- An international validation study with focus on processed and
620 ready-to-eat meat and seafood. *International Journal of Food Microbiology* 141, 137-150.

621 Molina-Höppner, A., Doster, W., Vogel, R.F., Ganzle, M.G., 2004. Protective effect of sucrose
622 and sodium chloride for *Lactococcus lactis* during sublethal and lethal high-pressure
623 treatments. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2013-2020.

624 Møller, C.O.A., Ilg, Y., Aabo, S., Christensen, B.B., Dalgaard, P., Hansen, T.B., 2013. Effect of
625 natural microbiota on growth of *Salmonella* spp. in fresh pork -- A predictive microbiology
626 approach. *Food Microbiology* 34, 284-295.

627 Myers, K., Cannon, J., Montoya, D., Dickson, J., Lonergan, S., Sebranek, J., 2013. Effects of
628 high hydrostatic pressure and varying concentrations of sodium nitrite from traditional and
629 vegetable-based sources on the growth of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat (RTE)
630 sliced ham. *Meat Science* 94, 69-76.

631 Novelli, E., Zanardi, E., Ghiretti, G.P., Campanini, G., Dazzi, G., Madarena, G., Chizzolini, R.,
632 1998. Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame Milano and mortadella.
633 *Meat Science* 48, 29-40.

634 Patterson, M.F., McKay, A.M., Connolly, M., Linton, M., 2010. Effect of high pressure on the
635 microbiological quality of cooked chicken during storage at normal and abuse refrigeration
636 temperatures. *Food Microbiology* 27, 266-273.

637 Ross, T., 1999. *Predictive food microbiology models for the meat industry*. Meat and Livestock
638 Australia, North Sydney, Australia.

639 Ross, T., Dalgaard, P., 2004. Secondary models. In: McKellar, R., Lu, X. (Eds.), *Modeling*
640 *microbial responses in food*. CRC Press, Boca Raton, FL., pp. 63-150.

641 Simonin, H., Duranton, F., de Lamballerie, M., 2012. New insights into the high-pressure
642 processing of meat and meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food*
643 *Safety* 11, 285-306.

644 Stollewerk, K., Jofré, A., Comaposada, J., Arnau, J., Garriga, M., 2014. NaCl-free processing,
645 acidification, smoking and high pressure: effects on growth of *Listeria monocytogenes* and
646 *Salmonella enterica* in QDS processed® dry-cured ham. *Food Control* 35, 56-64

647 Thomas Jr, H.A., 1942. Bacterial densities from fermentation tube tests. *Journal of American*
648 *Water Works Association* 34, 572-576.

649 Wemekamp-Kamphuis, H.H., Karatzas, A.K., Wouters, J.A., Abee, T., 2002. Enhanced levels
650 of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature
651 and high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 456-463.

652 Wesche, A.M., Gurtler, J.B., Marks, B.P., Ryser, E.T., 2009. Stress, sublethal injury,
653 resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 72,
654 1121-1138(1118).

655 Wouters, J.A., Jeynov, B., Rombouts, F.M., de Vos, W.M., Kuipers, O.P., Abee, T., 1999.
656 Analysis of the role of 7 kDa cold-shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 in
657 cryoprotection. *Microbiology* 145 (Pt 11), 3185-3194.

658 Zwietering, M.H., Cuppers, H.G.A.M., De Wit, J.C., Van 'T Riet, K., 1994. Evaluation of data
659 transformations and validation of a model for the effect of temperature on bacterial growth.
660 *Applied and Environmental Microbiology* 60, 195-203.

661 Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., van't Riet, K., 1990. Modeling of the
662 bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1875-1871.

663 **FIGURE LEGENDS**

664

665 **Figure 1.** Effect of storage temperature on square root transformed growth rate (μ_{max} ,
666 a), lag time (λ , b) and relative lag time (RLT, c) values observed for *L. monocytogenes*
667 growing on sliced cooked ham and mortadella treated with HHP (400 MPa, 5 min,
668 15°C). For lag time (b) and relative lag time (c), data and model fit depended on the
669 product and physiological state of *L. monocytogenes*, i.e. freeze-stressed (-80°C) and
670 cold-adapted (8°C). Lines indicate the secondary model fit using (a) the Ratkowsky
671 square root model (eq. 2) and (b) the expanded and temperature dependant relative lag
672 time (RLT) model (eq. 3). The estimated parameters of the models obtained through the
673 two-step regression approach are shown in Table 3.

674

675 **Figure 2.** Sliced cooked ham: Growth of freeze-stressed (-80°C) (a, b) and cold-adapted
676 (8°C) (c, d) *L. monocytogenes* cells inoculated at *ca.* 10^7 CFU/g (a, c) or *ca.* 10^4 CFU/g
677 (b, d). Samples were HHP treated (400 MPa, 5 min, 15°C) and stored at 4°C (○), 8°C
678 (◆) and 12°C (□). Lines indicate the fit obtained by using the global model (eq. 5,
679 Table 3).

680

681 **Figure 3.** Sliced mortadella: Growth of freeze-stressed (-80°C) (a, b) and cold-adapted
682 (8°C) (c, d) *L. monocytogenes* inoculated at *ca.* 10^7 CFU/g (a, c) or *ca.* 10^4 CFU/g (b, d).
683 Samples were HHP treated (400 MPa, 5 min, 15°C) and stored at 4°C (○), 8°C (◆) and
684 12°C (□). Lines indicate the fit obtained by using the global model (eq. 5, Table 3).

685

686 **Figure 4.** Observed and predicted growth of *L. monocytogenes* (CTC 1587). Cells were
687 freeze-stressed (at -80°C, ●) or cold-adapted (at 8°C, ○) before inoculation of cooked
688 ham or mortadella, pressurized at 400 MPa for 5 min and stored at 8°C (Bover-Cid et al.
689 in preparation). Predicted growth for freeze-stressed cells (solid lines) and cold-adapted
690 cells (dashed lines) were obtained using eq. 5 and parameter values in Table 3 (global
691 regression), $\text{Log } N_0$ being the observed *L. monocytogenes* counts after the HHP
692 treatment.

693

694

695 **Figure 5.** Observed growth (×) of *L. monocytogenes* (cocktail of strains previously
696 grown overnight at 30-37°C) inoculated onto cooked ham, pressurized and stored under
697 refrigeration as reported by (a) Marcos et al. (2008), (b) Myers et al. (2013) and (c)
698 Jofré et al. (2007). Lines indicate the predicted growth for freeze-stressed cells (solid
699 lines) and cold-adapted cells (dashed lines) according to the models (global regression)
700 shown in Table 3, Log N_0 being the observed *L. monocytogenes* counts after the HHP
701 treatment.

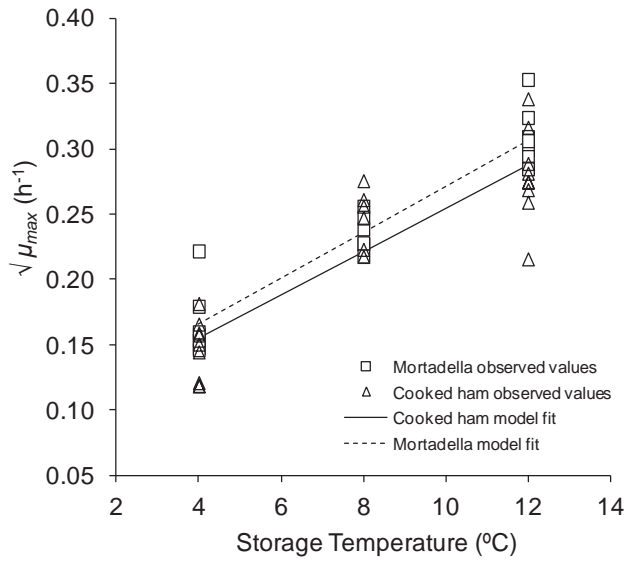
702

703

704 **Figure 6.** Predicted growth of *L. monocytogenes* after inoculation on cooked ham ($N_c =$
705 10^4 CFU/g, before the HHP treatment), pressurized (400 MPa for 5 min) and stored at
706 8°C. Solid and dashed lines correspond to freeze-stressed (-80°C) and cold-adapted
707 (8°C) pre-cultures, respectively. Predictions were obtained using eq. 5 with model
708 parameters as shown in Table 3 under one-step (Global) regression.

Figure 1.

a



b

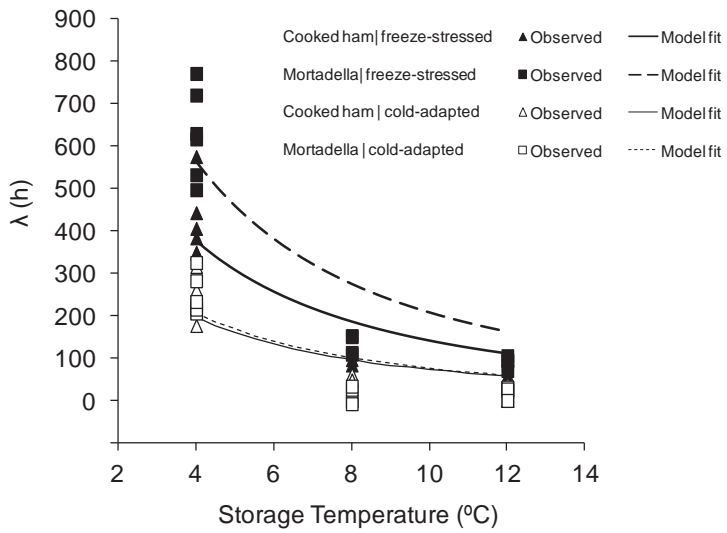


Figure 1 continues next page

Figure 1. (continuation)

c

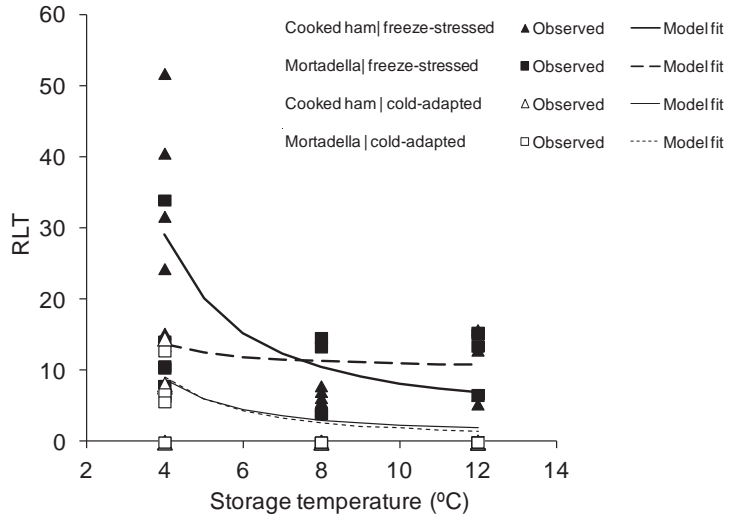


Figure 2.

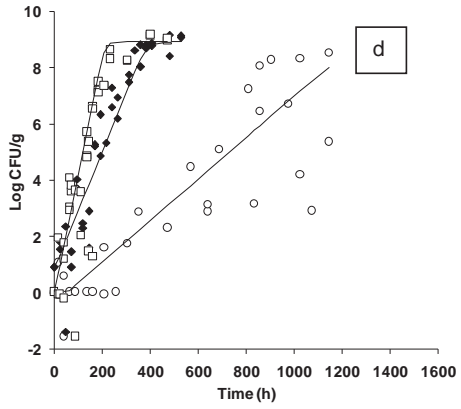
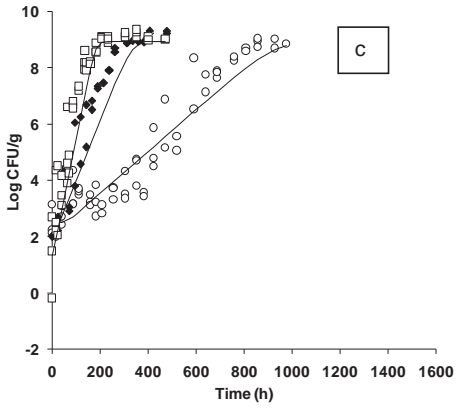
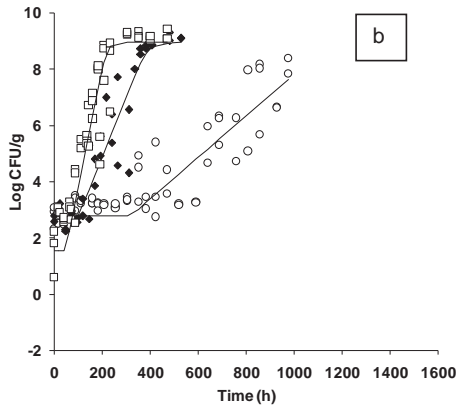
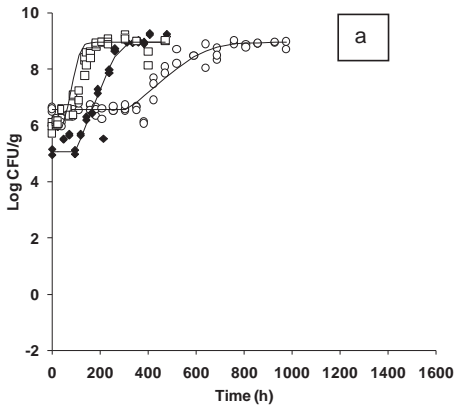


Figure 3.

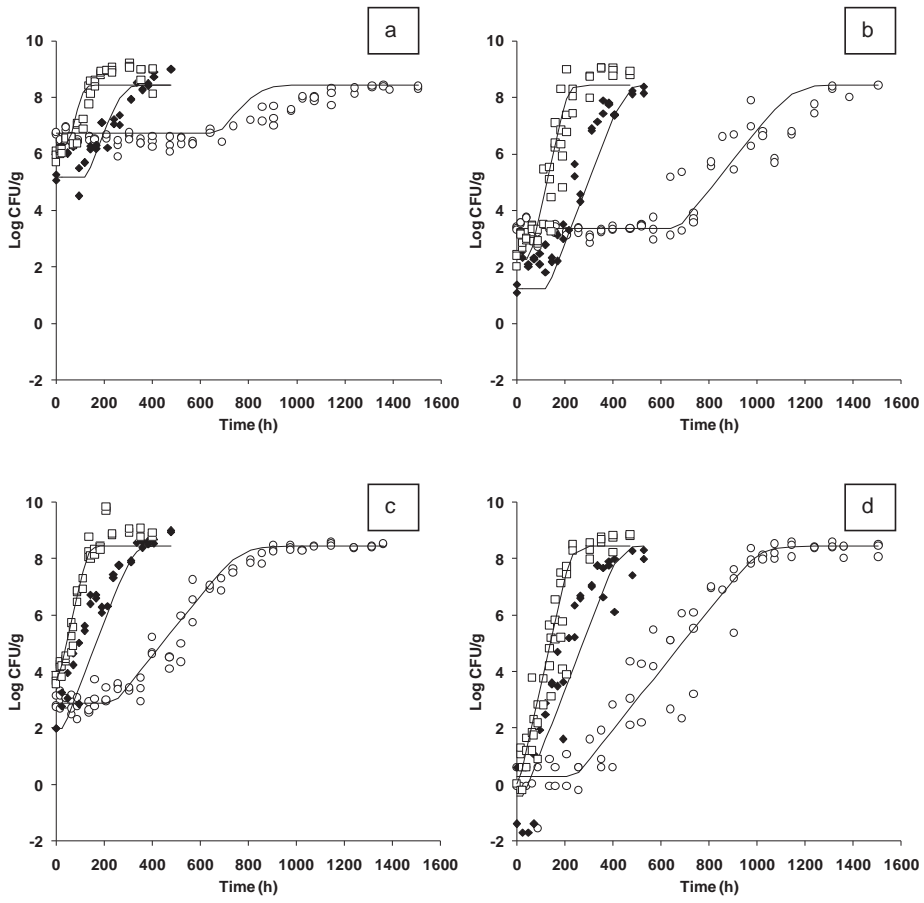


Figure 4.

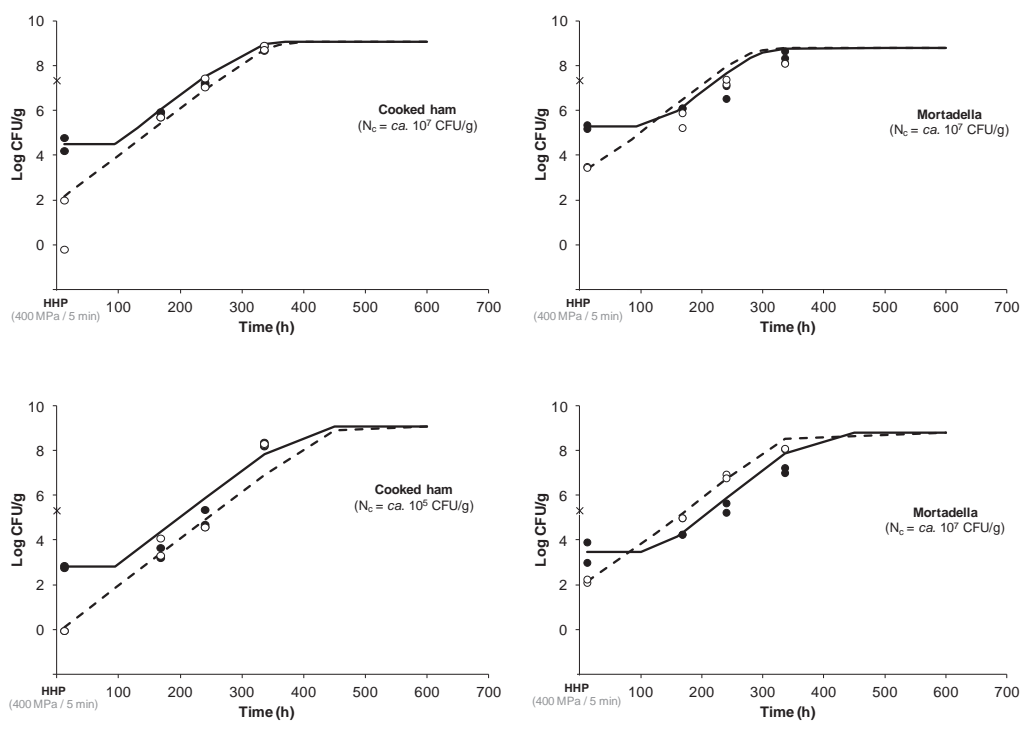


Figure 5.

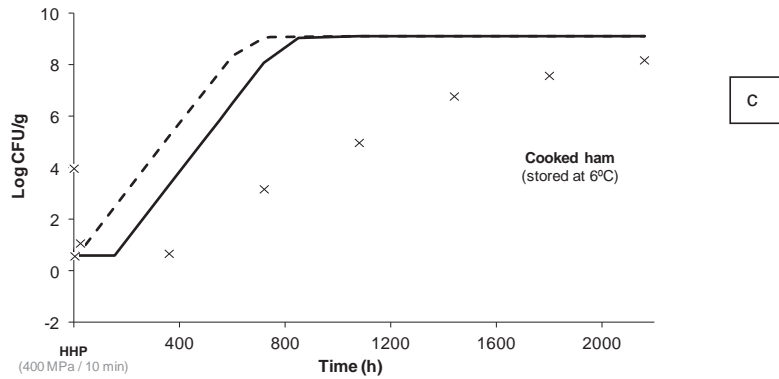
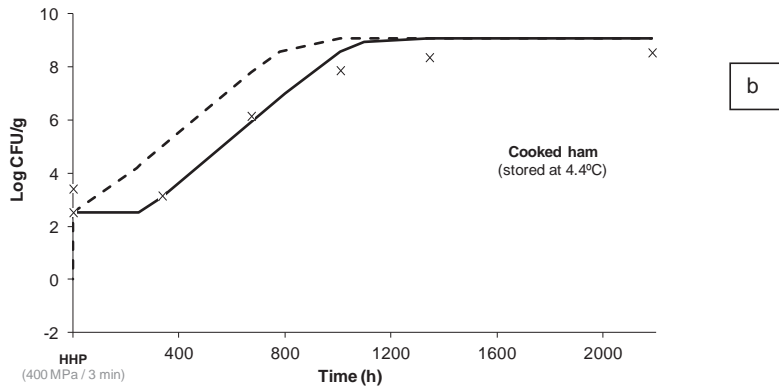
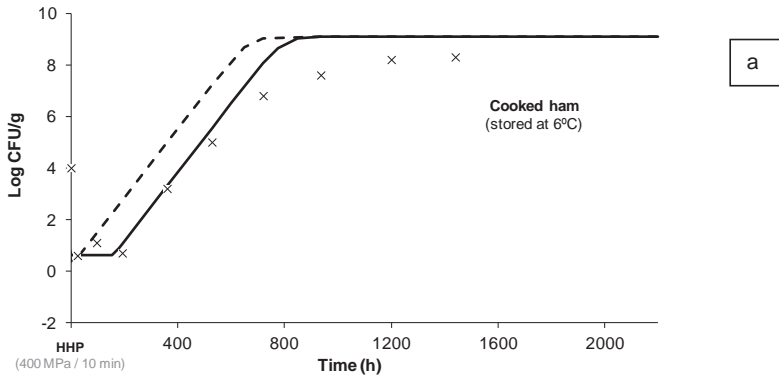


Figure 6.

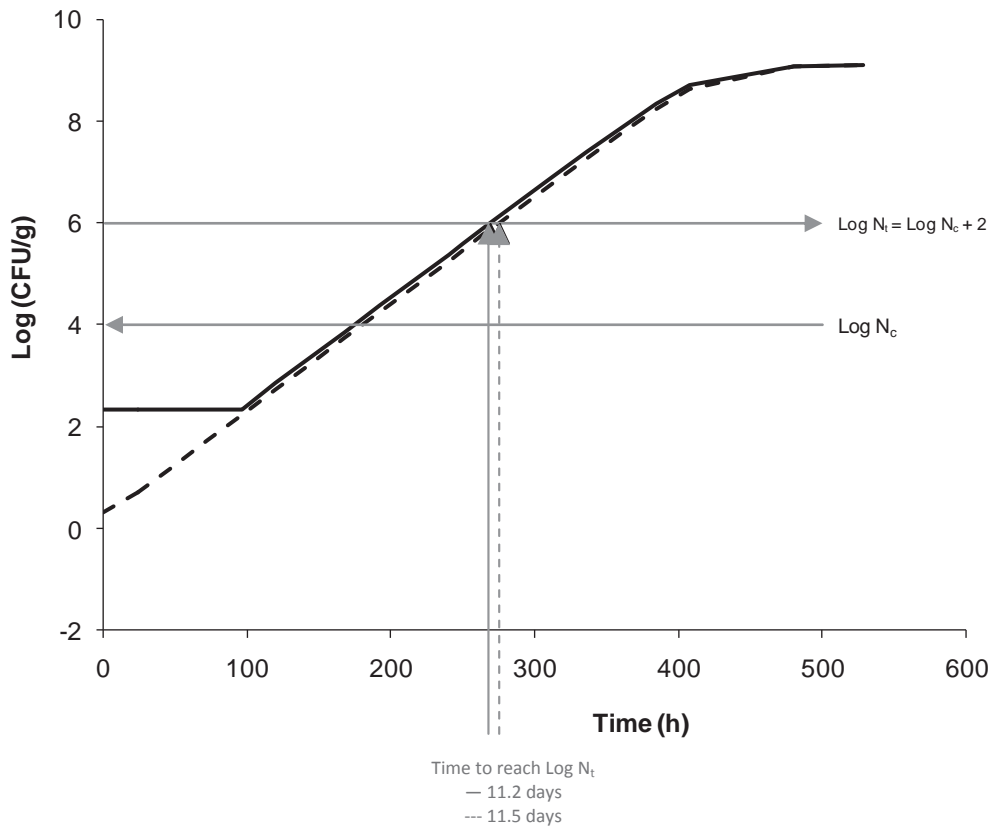


Table 1. Estimated growth parameters resulting from fitting the Logistic model with delay (eq. 1) to the *L. monocytogenes* counts on RTE cooked meat products non-pressurized and pressurized (at 400 MPa/5min/15°C) obtained for the different combination of conditions.

Product	Physiological state	Inoculum level (CFU/g)	Storage T (°C)	λ (h)	Growth parameters ^a				Goodness of fit ^b			
					$\log N_0$ (Log CFU/g)	μ_{max} (h ⁻¹)	$\log N_{max}$ (Log CFU/g)	n	RSS	RMSE	R ² _{adj}	
Non-pressurized												
Cooked ham												
	freeze-stressed	~10 ⁴	4	0.0	4.4	0.036	8.78	29	2.08	0.29	0.97	
	cold-adapted	~10 ⁴	4	0.0	3.76	0.031	8.73	32	2.88	0.32	0.97	
	freeze-stressed	~10 ⁴	8	0.0	4.47	0.069	8.36	15	0.19	0.13	0.99	
	cold-adapted	~10 ⁴	8	0.0	4.72	0.068	8.28	15	0.24	0.15	0.99	
	freeze-stressed	~10 ⁴	12	0.0	4.22	0.113	9.07	34	0.68	0.15	0.99	
	cold-adapted	~10 ⁴	12	1.6(ns) ^c	4.37	0.116	9.09	34	1.04	0.19	0.99	
Mortadella												
	freeze-stressed	~10 ⁴	4	60.6	3.70	0.026	8.05	24	2.35	0.34	0.95	
	cold-adapted	~10 ⁴	4	99.3(ns)	4.25	0.035	8.22	24	3.33	0.41	0.94	
	freeze-stressed	~10 ⁴	8	0.0	4.37	0.069	7.29	15	0.12	0.11	0.99	
	cold-adapted	~10 ⁴	8	0.0	4.36	0.074	7.25	15	0.35	0.18	0.97	
	freeze-stressed	~10 ⁴	12	0.0	4.08	0.117	8.99	34	1.19	0.20	0.99	
	cold-adapted	~10 ⁴	12	1.6(ns)	4.29	0.120	8.99	34	0.83	0.17	0.99	
Pressurized												
Cooked ham												
	freeze-stressed	~10 ⁷	4	383	6.48	0.042	8.73	59	3.68	0.26	0.94	
	freeze-stressed	~10 ⁴	4	330	3.06	0.016	> 10	59	34.46	0.79	0.77	
	cold-adapted	~10 ⁷	4	240	3.08	0.025	8.90	56	17.98	0.59	0.94	
	cold-adapted	~10 ⁴	4	156 (ms) ^{cd}	0.03	0.021	6.36	30	56.83	1.48	0.77	
	freeze-stressed	~10 ⁷	8	110	5.45	0.043	9.12	34	5.72	0.44	0.93	
	freeze-stressed	~10 ⁴	8	91	2.74	0.050	9.10	35	14.87	0.69	0.93	
	cold-adapted	~10 ⁷	8	0.0	2.06	0.061	9.03	34	9.56	0.56	0.95	
	cold-adapted	~10 ⁴	8	48 (ns)	1.09	0.062	8.79	36	26.41	0.91	0.92	

Table 1 continuation

freeze-stressed	$\sim 10^7$	12	72.6	6.26	0.068	8.93	47	3.17	0.27	0.95
freeze-stressed	$\sim 10^4$	12	56.1	2.62	0.091	9.15	49	8.94	0.45	0.97
cold-adapted	$\sim 10^7$	12	0.0	1.85	0.109	8.94	48	21.23	0.69	0.93
cold-adapted	$\sim 10^4$	12	0.0	-0.16	0.081	8.84	37	75.90	1.49	0.78
Mortadella										
freeze-stressed	$\sim 10^7$	4	608	6.51	0.008	8.44	75	2.76	0.20	0.93
freeze-stressed	$\sim 10^4$	4	540	3.32	0.015	8.32	72	19.07	0.53	0.90
cold-adapted	$\sim 10^7$	4	278	2.99	0.024	8.39	76	11.11	0.39	0.97
cold-adapted	$\sim 10^4$	4	229	0.21	0.024	8.38	68	42.21	0.81	0.94
freeze-stressed	$\sim 10^7$	8	111	5.74	0.025	9.10	34	4.94	0.41	0.90
freeze-stressed	$\sim 10^4$	8	151	2.12	0.064	7.94	36	7.71	0.49	0.96
cold-adapted	$\sim 10^7$	8	0.0	2.58	0.048	8.54	34	9.92	0.57	0.93
cold-adapted	$\sim 10^4$	8	26.5 (ns)	-0.83	0.071	7.57	34	29.05	1.00	0.91
freeze-stressed	$\sim 10^7$	12	72	6.32	0.065	8.89	49	1.87	0.20	0.97
freeze-stressed	$\sim 10^4$	12	82	3.98	0.085	8.97	43	6.80	0.42	0.96
cold-adapted	$\sim 10^7$	12	27 (ns)	2.93	0.081	8.81	51	26.02	0.74	0.91
cold-adapted	$\sim 10^4$	12	24 (ns)	0.44	0.081	8.60	49	39.17	0.93	0.91

^a: λ : lag time; $\text{Log } N_0$: initial counts after the HP treatment; μ_{max} : maximum specific growth rate; $\text{Log } N_{max}$: maximum bacterial concentration.

^b: n: number of data included for fitting; RSS: residual sum of squares; R^2_{adj} : adjusted coefficient of determination. Values obtained from the fit to the global data sets from duplicate or triplicate experiments of each combination of conditions.

^c: (ns): lag time statistically non-significant ($p > 0.05$) according to F -tests.

^d: For this combination of conditions, λ was non-significant for one replicate.

Table 2. Results^a of inactivation of *L. monocytogenes* after the high pressure treatment (400MPa for 5 min) obtained for the different combination of conditions assessed (including different RTE cooked meat products, physiological state and inoculum level of the pathogen).

Product	Physiological state	Inoculum level (CFU/g)	Log N ₀ /N	
			Mean	SD
Cooked ham	freeze-stressed	~10 ⁷	1.41	0.65
		~10 ⁴	2.02	0.75
	cold-adapted	~10 ⁷	5.47	0.94
		~10 ⁴	3.89	0.68
Mortadella	freeze-stressed	~10 ⁷	1.01	0.78
		~10 ⁴	1.81	1.01
	cold-adapted	~10 ⁷	4.21	0.82
		~10 ⁴	4.01	0.43

^a: Mean and standard deviation (SD) obtained from three independent replicates.

Table 3. Growth parameters for pressurized *L. monocytogenes* and goodness of fit indexes obtained through the two-steps (eq. 2 and 3) and global (one-step, eq. 5) regression integrating the Ratkowsky square root model (for growth rate) and the relative lag time (*RLT*) concept into the Logistic model with delay.

	Growth rate model parameters		<i>RLT</i> model parameters		Log N_{max}	Goodness of fit		
	b	T_{min}	kI	$k2$		RSS	RMSE	R^2_{adj}
Two-step regression								
Cooked ham	0.018	-5.45	freeze-stressed → 9.41	89.54	9.09	692	1.148	0.81
			cold-adapted → 3.99	60.74				
Mortadella	0.017	-5.25	freeze-stressed → 6.39	209.02	8.81	447	0.85	0.89
			cold-adapted → 2.22	78.37				
Global (one-step) regression^d								
Cooked ham	0.023	-1.80	freeze-stressed → 6.30	23.85	9.09	442	0.919	0.88
			cold-adapted → 0.00	22.36				
Mortadella	0.018	-4.80	freeze-stressed → 4.46	297.88	8.81	357	0.761	0.91
			cold-adapted → 0.00	125.29				

Table 4. Growth parameters for pressurized *L. monocytogenes* and goodness of fit indexes obtained through the two-step (eq. 2 and eq. 4) and global (one-step) regression approaches integrating the Ratkowsky square root growth rate (eq. 2) model and the extended hyperbola model for lag time (eq. 4) into the Logistic model with delay (eq.1).

	Growth rate model parameters		Lag model parameters		Log N_{max}	Goodness of fit		
	b	T_{min}	p	q		RSS	RMSE	R^2_{adj}
Two-step regression								
Cooked ham	0.018	-5.45	594	2.54	9.09	599	1.067	0.84
Mortadella	0.017	-5.25	753	2.77	8.81	977	1.258	0.76
Global (one-step) regression								
Cooked ham	0.020	-2.68	515	1.77	9.09	517	0.992	0.86
Mortadella	0.013	-9.47	524	2.78	8.81	553	0.946	0.86

Table 5. Performance of the developed models (Table 3, global regression approach) used to describe the growth of *L. monocytogenes* in RTE cooked meat products during chilled storage after a high pressure processing at 400 MPa.

Data source strain/s; pre-inoculum conditions ^a ; N _c (CFU/g) ^b ; product; other relevant information	Storage temperature (°C)	Model used for the simulation		Percentage (total number) of observed Log-counts falling within the acceptable simulation zone (ASZ) ^c		
		Physiological state	Product	Within ASZ	Fail safe	Fail dangerous
Own results^d (Bover-Cid et al. in preparation)						
CTC1587; -80°C; ~10 ⁷ ; cooked ham	8	-80	Cooked ham	100 (8)	0	0
CTC1587; -80°C; ~10 ⁴ ; cooked ham	8	-80	Cooked ham	100 (8)	0	0
CTC1587; -80°C; ~10 ⁷ ; mortadella	8	-80	Mortadella	100 (8)	0	0
CTC1587; -80°C; ~10 ⁴ ; mortadella	8	-80	Mortadella	100 (8)	0	0
CTC1587; 8°C; ~10 ⁷ ; cooked ham	8	8	Cooked ham	87.5 (7)	12.5 (1)	0
CTC1587; 8°C; ~10 ⁴ ; cooked ham	8	8	Cooked ham	75.0 (6)	25.0 (2)	0
CTC1587; 8°C; ~10 ⁷ ; mortadella	8	8	Mortadella	100 (8)	0	0
CTC1587; 8°C; ~10 ⁴ ; mortadella	8	8	Mortadella	100 (8)	0	0
				95.3 (61)	4.7 (3)	0
Marcos et al. (2008)						
CTC1010/CTC1011/CTC1034; 30°C; ~10 ⁴ ; cooked ham ^e	6	-80	Cooked ham	90.0 (9)	0	10 (1)
Jofré et al. (2007)						
CTC1010/CTC1011/CTC1034; 30°C; ~10 ⁴ ; cooked ham ^e	6	-80	Cooked ham	62.5 (5)	25.0 (2)	12.5 (1)
Myers et al. (2013)						
ATCC7644/NCTC10890/ATCC19112/ATCC19114/ATC C19115; 35°C; ~10 ⁵ ; cooked ham (no added NO ₂) ^e	4.4	-80	Cooked ham	100 (6)	0	0
Idem (100 ppm NO ₂ added through NaNO ₂)	4.4	-80	Cooked ham	100 (6)	0	0
Idem (200 ppm NO ₂ added through NaNO ₂)	4.4	-80	Cooked ham	100 (6)	0	0
Idem (50 ppm NO ₂ added through VegStable 506)	4.4	-80	Cooked ham	100 (6)	0	0
Idem (100 ppm NO ₂ added through VegStable 506)	4.4	-80	Cooked ham	100 (6)	0	0
Idem (Nitrate addition through VegStable 502)	4.4	-80	Cooked ham	100 (6)	0	0
				92.6 (50)	3.7 (2)	3.7 (2)

^a: Conditions used to prepare the *L. monocytogenes* inoculum culture: -80°C (freeze-stressed), 8°C (cold-adapted); 30°C to 35°C (optimal growth)

^b: Inoculum level before HHP treatment.

^c: ASZ was defined as the simulated Log CFU/g value ± 0.5 Log-units (Møller et al. 2013).

^d: Observed raw data and simulated growth shown in Figure 5

^e: Observed raw data and simulated growth shown in Figure 6.

5 DISCUSSIÓ DE RESULTATS

En aquest apartat es discuteixen de forma global els resultats obtinguts en els diferents articles que conformen la tesi. Per tal de facilitar-ne el seguiment, els resultats es discuteixen en tres blocs diferenciats en relació a:

1. El comportament de *L. monocytogenes* durant l'emmagatzematge en refrigeració dels productes carnis RTE objecte d'estudi que no han rebut l'aplicació de cap tecnologia de conservació post-processat (*i.e.* lots sense tractar o control),
2. L'efecte listericida immediat provocat per les tecnologies de conservació post-processat aplicades (*i.e.* bioconservació i/o altes pressions) als productes carnis RTE,
3. El comportament de *L. monocytogenes* al llarg de l'emmagatzematge en refrigeració dels productes carnis RTE tractats amb les diferents tecnologies de conservació estudiades.

5.1 Comportament de *L. monocytogenes* en productes carnis RTE

El comportament de *L. monocytogenes* en els productes RTE és un aspecte clau per determinar-ne el risc, la seva categorització segons el Reglament Europeu 2073/2005 (European Commission, 2005) i, en conseqüència, els criteris microbiològics d'aplicació en cada cas.

A la **Figura 15** es mostra l'evolució dels recomptes de *L. monocytogenes* durant l'emmagatzematge a 8 °C dels diferents tipus de productes carnis RTE (tallats a llenques i envasats al buit) que no han rebut l'aplicació de cap de les tecnologies de conservació estudiades (altes pressions i bioconservació).

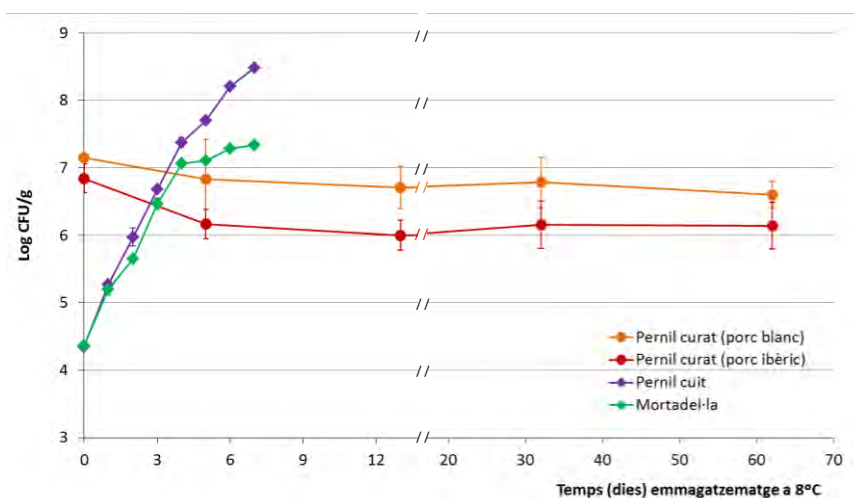


Figura 15. Comportament de *L. monocytogenes* inoculada en diferents productes carnis RTE que no han rebut l'aplicació de les tecnologies de conservació estudiades en aquesta tesi. Les dades corresponen als resultats dels lots control dels assajos publicats a l'Article 1 (productes curats) i a l'Article 3 (productes cuits).

Pel que fa als **productes carnis curats**, l'estudi publicat a l'Article 1 aporta dades científiques que permetrien considerar el pernil curat dins la categoria dels "aliments RTE que no poden afavorir el desenvolupament de *L. monocytogenes*" (Reglament Europeu 2073/2005), fins i tot quan presenta valors d' $a_w=0,92$ (com seria el cas del pernil curat de porc blanc estudiat). Per tant, el criteri microbiològic d'aplicació en el pernil curat permetria la presència de *L. monocytogenes*, amb un màxim de 100 CFU/g, fins al final de la vida útil del producte.

En el cas del pernil curat ibèric ($a_w=0,88$; pH = 5,84), les característiques fisicoquímiques del producte no només tindrien efectes bacteriostàtics, sinó que fins i tot tindrien una acció bactericida amb reduccions de l'ordre d'1 unitat logarítmica. La reducció en els nivells del patogen es va produir bàsicament durant la primera setmana d'emmagatzematge a 8°C. En altres estudis publicats sobre el comportament de *L. monocytogenes* en pernil curat (ibèric i serrano amb a_w de 0,90 i 0,88, respectivament) l'efecte bactericida s'observa també en els primers dies d'emmagatzematge (Morales *et al.*, 2006). En altres productes carnis curats, com el llom ibèric ($a_w=0,91$; pH=5,67) i el xoriço ($a_w=0,83$; pH=5,36) conservats a 4°C, l'efecte és més progressiu i s'aconsegueixen reduccions de poc més d'una unitat logarítmica durant 2 mesos d'emmagatzematge (Bover-Cid *et al.*, 2011a).

Segons la Comissió Internacional d'Especificacions Microbiològiques dels Aliments (ICMSF, 2002), s'estima que la recontaminació per *L. monocytogenes* durant els processos de manipulació post-processat (e.g. durant la preparació de productes RTE carnis a llenques i l'envasat) podria ser de l'ordre de 10 CFU/g (i.e. 1 log CFU/g) en el pitjor dels casos. Aquest nivell és compatible amb el criteri microbiològic de seguretat alimentària de 100 CFU/g del Reglament Europeu 2073/2005. Així, en el cas dels productes curats que no permeten el creixement del patogen, una recontaminació post-producció per *L. monocytogenes* no suposaria un risc d'incompliment dels criteris microbiològics actualment vigents. Aquest fet concordaria amb les dades quantitatives disponibles sobre *L. monocytogenes* en productes RTE del mercat (apartat 1.2 de la Secció d'Introducció) i sobre alertes i informes oficials d'àmbit europeu (RASFF, 2010; EFSA, 2011). En general, entre els productes RTE que no compleixen amb el criteri microbiològic no hi han casos de productes carnis curats.

Tanmateix, en una hipotètica contaminació del producte durant els processos de preparació en llenques i envasat del producte RTE, la reducció de *L. monocytogenes* provocada per les característiques fisicoquímiques dels productes curats no seria suficient per garantir l'eliminació del patogen fins a nivells compatibles amb la tolerància zero (i.e. absència/25g, equivalent a <0,04 CFU/g o -1,39 log CFU/g). Per tant, per l'elaboració de productes carnis curats destinats a mercats que no toleren la presència de *L. monocytogenes* (ja sigui per exigències legals, com als Estats Units i Japó o per exigències específiques de cadenes de distribució), caldrien mesures de control addicionals com l'aplicació de les tecnologies de conservació emergents objecte d'estudi d'aquesta tesi.

En els **productes carnis cuits** RTE com el pernil cuit i la mortadella, els resultats publicats a l'Article 3 constaten que són productes de risc ja que afavoreixen el creixement del patogen. La velocitat específica de creixement observada va ser similar en ambdós tipus de productes estudiats. Així, els productes carnis cuits, com els estudiats en aquesta tesi, s'haurien de considerar dins la categoria dels "aliments RTE que poden afavorir el desenvolupament de *L. monocytogenes*" (Reglament Europeu 2073/2005). En aquest tipus de productes es permet la presència del patogen si el productor pot demostrar científicament davant l'autoritat competent que no s'excediran els 100 CFU/g abans del final de la vida útil establerta. En cas contrari, s'han de regir pel criteri de seguretat alimentària que marca absència de *L. monocytogenes* en 25 grams de producte a la sortida de fàbrica.

A la **Taula 18** es mostra, a títol d'exemple, el temps que trigaria *L. monocytogenes* a assolir el límit màxim legalment permès (100 CFU/g), és a dir la vida útil segura del producte, durant la conservació dels productes carnis cuits RTE a diferents temperatures. Les estimacions s'han calculat per diferents nivells hipotètics de contaminació, a partir de la velocitat de creixement observada de *L. monocytogenes* inoculada en productes carnis RTE sense tractar per HP (lots control) en els assajos d'inoculació (*challenge tests*) inclosos en l'Article 3.

Taula 18. Estimació del temps necessari per assolir 100 CFU/g de *L. monocytogenes*, en funció de la temperatura de refrigeració i la concentració inicial del patogen, segons els resultats obtinguts sobre el creixement del patogen en productes carnis cuits RTE envasats al buit (Article 3).

Temperatura de conservació (°C)	Velocitat de creixement observada (h ⁻¹) ^a	Temps per assolir 100 CFU/g ^b (i.e. vida útil segura en dies)		
		N ₀ =10 CFU/g ^c	N ₀ =1 CFU/g	N ₀ =1 CFU/55g ^d
4	0,032	1,30	2,60	4,87
8	0,070	0,60	1,19	2,23
12	0,117	0,36	0,71	1,33

^a: Obtinguda a partir dels resultats dels lots control (sense pressuritzar) dels *challenge test* realitzats a l'Article 3.

^b: Assumint que no hi ha fase de latència (estimació conservadora) tal com es recomana en el document guia del Community Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* i l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (CRL/AFSSA, 2008).

^c: Nivell de recontaminació inicial conservador, i.e. en el pitjor dels casos segons la ICMSF (2002).

^d: Nivell de recontaminació inicial (mitjana de la concentració) compatible amb el compliment del criteri microbiològic (m= Abs/25g; n=5; c=0).

Segons aquests resultats, en el cas de contaminació per *L. monocytogenes*, la vida útil segura dels productes carnis RTE cuits seria molt curta, fins i tot mantinguts a la temperatura de conservació de 4 °C recomanada per la distribució dels productes microbiològicament peribles.

Els resultats de la **Taula 19** mostren la vida útil segura calculada a partir de la predicció de la velocitat de creixement del patogen obtinguda mitjançant diverses eines i models predictius específics per *L. monocytogenes* alguns dels quals es troben llistats a la **Taula 15** de l'apartat 1.5 de la Secció d'Introducció. Les prediccions són variables segons l'eina utilitzada, essent el PMP i el model de Devlieghere *et al.* (2001) (elaborat específicament per pernil cuit) els que proporcionen unes estimacions més semblants als valors obtinguts experimentalment (**Taula 18**).

Taula 19. Predicció de la velocitat de creixement de *L. monocytogenes* mitjançant diverses eines i models predictius de creixement del patogen, i càlcul del temps necessari per assolir 100 CFU/g en funció de la temperatura de conservació.

Temperatura de conservació (°C)	Velocitat de creixement predita (h ⁻¹) ^a					Temps per assolir 100 CFU/g (i.e. vida útil segura en dies) N ₀ =10 CFU/g ^b				
	ComBase	PMP	SSSP	Devlieghere	DMRI	ComBase	PMP	SSSP	Devlieghere	DMRI
4	0,013	0,025	0,016	0,022	0,005	3,21	1,67	2,60	1,89	8,68
8	0,028	0,047	0,039	0,056	0,014	1,49	0,89	1,07	0,74	3,00
12	0,057	0,083	0,073	0,103	0,027	0,73	0,50	0,57	0,40	1,53

^a: Obtinguda amb models i simuladors (Combase: <http://www.combase.cc/index.php/en/>, PMP: <http://pmp.arserrc.gov/PMPOnline.aspx>, SSSP: <http://sssp.dtuqua.dk/>, Devlieghere *et al.* (2001) i DMRI: <http://3.test.dezone.dk/>) introduint dades mitjanes de composició dels productes carnis cuits RTE pernil cuit i mortadel·la (pH= 6,21; a_w= 0,98, sal= 2,65%, greix <10% en pernil cuit i >10% en mortadel·la, humitat= 65,55%, nitrit afegit al producte= 25,5 ppm i àcid làctic al producte final=5.650 ppm) utilitzats a l'Article 3.

^b: Considerant un nivell inicial de recontaminació de l'ordre de 10 CFU/g (ICMSF, 2002) i assumint que no hi ha fase de latència (estimació conservadora) tal com es recomana en el document guia Community Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* i l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (CRL/AFSSA, 2008).

Davant d'aquestes dades (experimentals i provinents dels models predictius), es fa palès l'interès de l'ús de les tecnologies de conservació post-processat emergents, com els tractaments per HP i/o l'aplicació de nisina, en productes carnis cuits RTE amb l'objectiu de reduir els nivells de *L. monocytogenes* i/o retardar-ne el seu creixement durant l'emmagatzematge en refrigeració, per, en definitiva, allargar la vida útil segura d'aquests productes.

5.2 Efecte listericida immediat dels tractaments per altes pressions aplicats a productes carnis RTE

L'aplicació de tractaments per altes pressions en productes carnis RTE com a tecnologia de conservació vers *L. monocytogenes* provoca una reducció immediata en els nivells d'aquest patògen respecte als nivells d'inoculació inicials. La magnitud d'aquest efecte es veu altament condicionada en funció de diversos paràmetres relacionats amb el microorganisme i el seu estat fisiològic, i el producte (e.g. a_w , greix, presència de nisina) tal com es descriu als apartats 5.2.1 i 5.2.2 de la present Secció de Discussió de resultats, respectivament.

5.2.1 Influència de l'estat fisiològic de *L. monocytogenes*

En el conjunt de treballs publicats que s'inclouen en la present tesi, s'han utilitzat inòculs de la soca de *Listeria monocytogenes* CTC 1034 en fase estacionària, amb 3 estats fisiològics diferents (vegeu **Taula 16** de la Secció 3 de Metodologia):

- *L. monocytogenes* crescuda a temperatura òptima de creixement (37 °C), és a dir, no estressada (Article 1).
- *L. monocytogenes* crescuda a 37 °C (fins assolir la fase estacionària) i posteriorment congelada a -80 °C, per generar un estrès per congelació (e.g. disminució dràstica de l' a_w entre altres) (Articles 2 i 3).
- *L. monocytogenes* crescuda a 8 °C (fins assolir la fase estacionària) i, per tant, adaptada a condicions de refrigeració (Article 3).

La **Figura 16** mostra les reduccions logarítmiques obtingudes en diferents productes carnis RTE en funció de l'estat fisiològic de *L. monocytogenes* previ a la inoculació del producte i al tractament per HP.

Els resultats obtinguts en els **productes curats RTE** (i.e. llenques de pernil curat de porc blanc i de porc ibèric envasades al buit, Article 1) inoculats amb cèl·lules cresdues en condicions òptimes (37 °C), mostren que el tractament per HP a 600 MPa va provocar una inactivació major en el pernil curat de porc blanc (a_w alta= 0,92) d'aproximadament 4 logs, en comparació amb l'observada en el pernil curat ibèric (a_w baixa=0,88) que va ser de gairebé 2 logs.

Estudis posteriors realitzats pel mateix grup de treball (Bover-Cid *et al.*, 2011b) amb els mateixos tipus de pernil curat, van mostrar que tant el producte com l'estat fisiològic de *L. monocytogenes* van tenir un impacte significatiu en el grau d'inactivació assolit. En general, la inactivació va ser superior en les mostres amb una a_w alta (0,92) que en les mostres amb una a_w baixa (0,88) (amb una

diferència d'aproximadament 1 log). La inactivació es va accentuar (gairebé 1 unitat logarítmica addicional) en les mostres inoculades amb cèl·lules adaptades al fred (8 °C), en comparació amb les mostres inoculades amb inòculs crescuts en condicions òptimes (37 °C) i congelats (-80 °C).

Pel que fa als resultats observats en els **productes cuits RTE** estudiats (*i.e.* llenques de perrnil cuit i mortadella envasades al buit), a l'Article 2 es van inocular amb cèl·lules de *L. monocytogenes* congelades (-80 °C) i posteriorment es van pressuritzar a 600 MPa. En aquest cas, l'efecte de la pressió va provocar inactivacions de més de 7 logs, fins a nivells per sota del límit de quantificació, en ambdós productes, independentment de l'estat fisiològic del patògen. Quan aquests mateixos productes es van tractar per HP a 400 MPa (Article 3) els resultats van mostrar que, independentment del nivell d'inòcul utilitzat, les cèl·lules prèviament congelades a -80 °C van patir una reducció dels recomptes d'entre 1 i 2 logs, sensiblement menor a la de les cèl·lules adaptades al fred (8 °C) on les reduccions van ser d'entre 4 i 5 unitats logarítmiques.

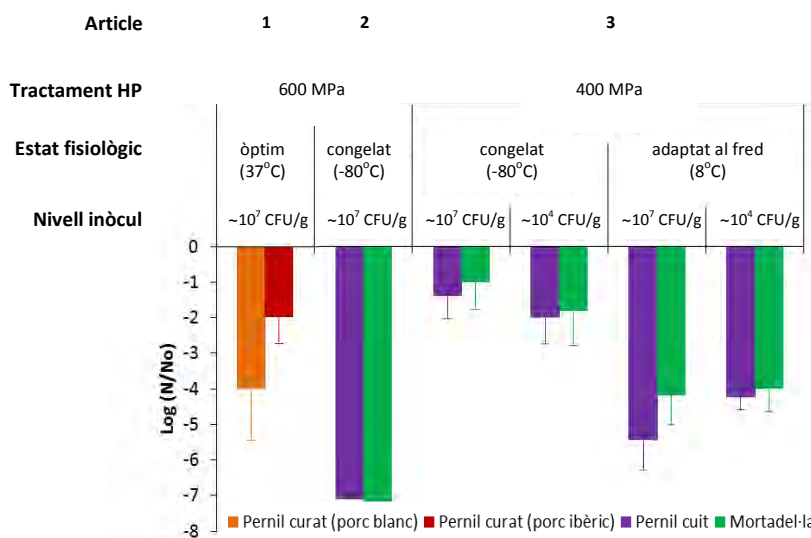


Figura 16. Reduccions logarítmiques, Log (N/N₀), observades en els recomptes de *L. monocytogenes* (inoculada en diferents productes carnis RTE, segons el seu estat fisiològic i el nivell d'inòcul utilitzat) després de l'aplicació del tractament per HP.

Els resultats obtinguts en productes cuits, en funció de l'estat fisiològic de l'inòcul utilitzat de *L. monocytogenes*, concorden amb estudis fets amb posterioritat no inclosos en la present tesi (Bover-Cid *et al.*, 2011c), en què es van comparar les reduccions assolides aplicant les mateixes condicions de processat per HP (400 MPa, 5 min, 15 °C) i comparant paral·lelament els 3 estats fisiològics: condicions òptimes, 37 °C; congelats, -80 °C i adaptats al fred, 8 °C. En aquests estudis s'evidenciaven uns nivells d'inactivació molt superiors en les cèl·lules adaptades al fred (8 °C) d'entre 4 i 5 unitats logarítmiques de reducció en comparació amb les cèl·lules crescudes en condicions òptimes (37 °C) i congelades (-80 °C), les quals van presentar unes concentracions finals del patògen posteriors al tractament per HP d'entre 1 i 2 log CFU/g.

La diferència de resultats observada empíricament entre els inòculs congelats (-80°C) i els adaptats al fred (8°C), suggereixen que les cèl·lules mantingudes en congelació podrien haver generat un mecanisme de protecció vers l'efecte de les altes pressions en comparació amb les cèl·lules adaptades a 8°C . Aquest fet podria ser degut a que les cèl·lules que han estat congelades s'exposen a una major concentració de soluts derivada de la dràstica disminució del valor d' a_w durant el procés de congelació, fet que s'associa a la generació d'una protecció vers l'acció de la pressió (Molina-Höppner *et al.*, 2004), de la mateixa manera que succeeix quan les cèl·lules estan exposades a un estrès osmòtic (Wesche *et al.*, 2009). La incorporació de soluts (*i.e.* glicerol) als cultius per tal de protegir les cèl·lules d'extremes condicions de temperatura podria haver contribuït a la protecció que adquireixen les cèl·lules congelades (-80°C). El glicerol en aquests casos, i degut a la seva naturalesa liposoluble, difon fàcilment per la membrana cel·lular, fent que aquesta es torni més fluida i per tant, més resistent a l'acció de les altes pressions hidrostàtiques.

Tanmateix caldria tenir en compte la possible hipòtesi de que fos l'adaptació al fred (*i.e.* inòcul crescut a 8°C) la que sensibilitzés les cèl·lules front als efectes de les HP. Aquesta no concordaria amb el concepte d'adaptació homeoviscosa pel qual les cèl·lules microbianes, en refrigeració, autoregulen la composició de la membrana cel·lular, assolint un augment de la fluïdesa per evitar l'enduriment que provoquen les baixes temperatures (Sinensky, 1974). L'increment de la fluïdesa de membrana alhora s'associa generalment a una major resistència a la pressió (Smelt *et al.*, 1994). Aquesta teoria de l'adaptació homeoviscosa, però, no té en compte la fase de creixement en la que es troba el microorganisme. Els treballs de Casadei *et al.* (2002) i McClements *et al.* (2001) són dels pocs estudis que inclouen aquest paràmetre en els seus assajos i observen, el primer en *E. coli* en brou i el segon en *L. monocytogenes* en llet, que la temperatura de creixement del cultiu afecta a la resistència de la cèl·lula a la pressió segons si són cèl·lules en fase exponencial o en fase estacionària. Així, McClements *et al.* (2001) observa una major resistència a la pressió en cèl·lules de *L. monocytogenes* en fase estacionària crescudes a 30°C que crescudes a 8°C i a l'inrevés en cèl·lules en fase exponencial. Aquests resultats doncs, tot i que obtinguts amb un producte líquid com la llet, reforçarien els obtinguts a l'Article 3 de la present tesi on es va observar una major inactivació en les cèl·lules adaptades al fred (crescudes a 8°C) en estat estacionari.

5.2.2 Influència de les característiques del producte

Efecte de la a_w

L'efecte dels valors d' a_w en els aliments és decisiva en l'efecte dels tractaments d'HP. Valors d' a_w baixos, com els que es solen trobar en productes carnis curats (pernil curat; Article 1), en comparació amb els de productes carnis cuits (pernil cuit i mortadella; Articles 2 i 3), protegeixen significativament *L. monocytogenes* de l'acció de les altes pressions. A la **Figura 17** es representa la distribució de valors d'inactivació obtinguts en els diferents assajos realitzats a 600 MPa. S'evidencia una relació lineal entre el grau d'inactivació, en termes de reduccions logarítmiques ($\text{Log}(N/N_0)$), i els valors d' a_w dels productes tractats.

Aquests resultats concorden amb estudis realitzats per altres autors, tant en productes carnis com en altres tipus de matrius, amb els que es constata la relació directament proporcional entre l' a_w i el grau d'inactivació assolit mitjançant tractaments per HP. En productes carnis curats tractats a 600 MPa, Morales *et al.* (2006) van observar una reducció immediata del patògen respecte l'inòcul

inicial (ca. 10^7 CFU/g) de 1,8 logs en pernil curat serrano ($a_w = 0,88$) i de 2,2 logs en pernil curat ibèric ($a_w = 0,90$). En productes carnis cuits, amb un valor d' a_w més alt ($\geq 0,98$) i tractats a 500 MPa, Koseki *et al.* (2007) van observar uns valors de reducció de *L. monocytogenes* d'almenys 5 logs, passant de 10^5 CFU/g (inòcul inicial) a nivells inferiors al límit de detecció (10 CFU/g) després del tractament de pressurització. En medis líquids amb valors d' a_w molt alts, com suc de taronja, llet o medi de cultiu (Ritz *et al.*, 2000; Erkmen i Dogan, 2004; Chen, 2007), les inactivacions observades després de tractaments de 600 MPa (1-10 min) van ser de l'ordre de més de 7 unitats logarítmiques. En l'extrem oposat, en mostres liofilitzades (amb valors d' a_w extremadament baixos) de cultius de *L. monocytogenes* no es va observar reducció dels recomptes després de tractaments d'HP a 600 MPa durant 5 min (Hayman *et al.*, 2008).

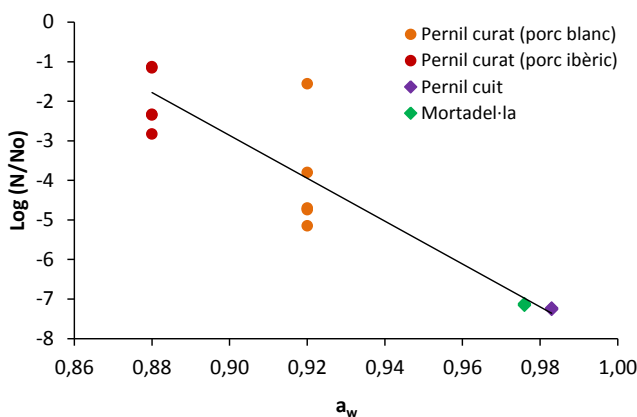


Figura 17. Representació gràfica de les reduccions logarítmiques, $\text{Log}(N/N_0)$, observades per *L. monocytogenes* inoculada en productes carnis RTE tractats per HP (600 MPa durant 5 min) en funció de la seva activitat d'aigua (a_w). Resultats dels Articles 1 i 2.

Així mateix i mitjançant l'enfoc de la modelització matemàtica Belletti *et al.* (2012) van poder quantificar l'efecte protector de l' a_w confirmant les observacions del present treball. Concretament, segons el model polinòmic generat, la relació entre l' a_w i el grau d'inactivació de *L. monocytogenes* en productes curats RTE, es descriu mitjançant un factor lineal directament proporcional.

Efecte del contingut en greix

El contingut en greix dels productes carnis RTE tractats per HP sembla tenir un efecte significatiu en la inactivació de *L. monocytogenes* vers l'efecte de les HP. La **Figura 18** mostra la distribució de valors d'inactivació en funció del contingut en greix del producte tractat, observant-se una tendència inversament proporcional entre aquests dos factors. Els productes amb diferent contingut en greix utilitzats i pressuritzats estudiats van ser: pernil curat de porc blanc i ibèric (Article 1) i pernil cuit i mortadel·la (Article 2), tractats tots ells a 600 MPa.

Cal tenir en compte, que els valors que representen els resultats d'inactivació obtinguts a l'Article 2 en productes cuits RTE (pernil cuit i mortadel·la) corresponen pràcticament als nivells d'inòcul inicial utilitzats, ja que els recomptes després del tractament per HP (600 MPa, 5 min) van estar per sota del límit de quantificació (presència/25g). Aquests resultats no permeten evidenciar una possible diferència entre la inactivació del producte cuit magre (pernil cuit) i el més greixós (mortadel·la). Tanmateix, l'efecte del contingut en greix dels productes carnis cuits es va poder observar en el conjunt dels resultats publicats en el mateix Article 2 on els productes es van sotmetre a diferents pressions per tal de poder modelitzar l'efecte d'aquesta. Les reduccions logarítmiques observades a diferents intensitats de pressió (300 a 800 MPa) i temps (<1 a 15 min) van ser diferents en els dos productes (*i.e.* superiors en pernil cuit que en mortadel·la), fent així necessari l'ús de dos models matemàtics diferents (un per cada producte) per descriure la cinètica d'inactivació produïda per tractaments d'HP. En la mateixa línia, en l'Article 3, la inactivació immediata observada en els tractaments a 400 MPa va ser lleugerament superior en pernil cuit que en mortadel·la.

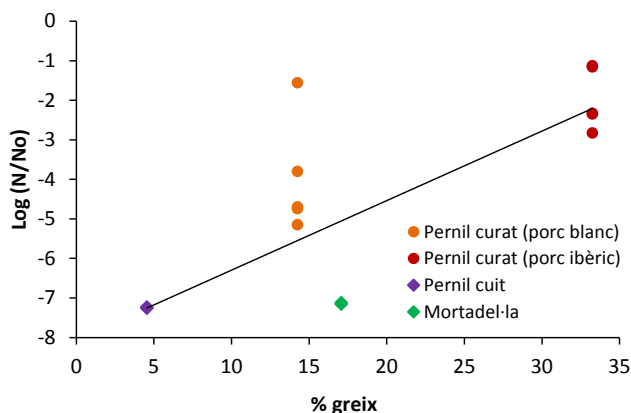


Figura 18. Representació gràfica de les reduccions logarítmiques observades en productes carnis RTE tractats per HP (600 MPa durant 5 min) en funció del seu contingut en greix (%). Resultats dels Articles 1 i 2.

Els resultats obtinguts suggereixen que un major contingut en greix protegiria les cèl·lules de *L. monocytogenes* vers l'efecte de les HP, amb la qual cosa s'assoleixen uns nivells d'inactivació majors en productes més magres. En comparació amb el factor a_w , la correlació entre el contingut en greix del producte i les reduccions assolides no és tan clara. De fet, el nivell d'inactivació en la mortadel·la va ser major que l'observat en el pernil de porc blanc tot i el menor contingut en greix d'aquest últim (**Figura 18**). Aquest fet es pot atribuir a que l'efecte protector de la baixa a_w del pernil curat de porc blanc influiria més que el major contingut en greix de la mortadel·la.

L'efecte del greix en la inactivació microbiana per HP ha estat relativament poc estudiat, i les dades disponibles no són del tot concloents. Els resultats obtinguts en la present tesi concorden amb estudis realitzats per Simpson i Gilmour (1997) i Gervilla *et al.* (2000), en què descriuen un efecte protector del greix a partir de l'estudi de la inactivació en una solució amb un alt component lipídic i en llet respectivament. L'explicació per la qual el greix podria exercir aquest efecte protector i el seu

mecanisme d'acció no està del tot clar. Alguns autors defensen que aquesta protecció es deu al fet que el greix absorbeix part del xoc de la pressió exercida (Gervilla *et al.*, 2000), en canvi altres defensen una modificació de la membrana cel·lular mitjançant l'intercanvi de triglicèrids, fent que aquesta sigui més resistent a la pressió (Farkas i Hoover, 2000; Rendueles *et al.*, 2011).

Belletti *et al.* (2012) van observar que l'efecte del greix en la inactivació de *L. monocytogenes* en productes carnis tractats per HP depenia en part del nivell de pressió aplicada. Segons el model matemàtic resultant d'aquesta investigació, un contingut en greix superior al 30% potenciarà l'efectivitat de tractaments de pressurització per sobre de 650 MPa (nivells superiors als aplicats en el present treball de tesi). Aquest fet podria ser degut a la possibilitat de que el greix potencii la inactivació microbiana mitjançant un efecte tèrmic addicional relacionat amb l'escalfament adiabàtic o per compressió (major en greix que en fases aquoses) que augmentaria paral·lelament amb l'augment del nivell de pressió dels tractaments, tal i com defensen Rasanayagam *et al.* (2003). En canvi, per productes amb un contingut de greix menor al 30%, com els inclosos en aquesta tesi, i tractats amb pressions de menys de 650 MPa, el greix tindria un efecte protector en concordança amb els assajos del present treball.

Efecte de l'aplicació de nisina

L'aplicació de nisina en productes carnis curats RTE s'ha estudiat a l'Article 1 tant de forma aïllada com en combinació amb HP. L'aplicació d'aquesta bacteriocina exerceix un efecte listericida (immediat), que es pot veure potenciat en combinació amb tractaments per HP addicionals.

La magnitud de la inactivació aconseguida amb nisina, depèn tant de la forma d'aplicació com de les característiques del producte. En els estudis que es presenten, la nisina s'ha aplicat a raó de 200 AU/cm², de dues formes diferents: directament sobre la superfície de les llenques dels pernills curats o formant part dels films de PVOH separadors de llenques.

A la **Figura 19** es resumeixen els resultats obtinguts en relació a l'efecte letal de la nisina vers *L. monocytogenes* en diferents tipus de pernil curat. En general, l'acció listericida de la nisina aplicada de forma directa va ser més efectiva que mitjançant envasat actiu. En les mostres no pressuritzades, la nisina directa va generar una reducció immediata del patogen d'aproximadament 1 log en el pernil curat de porc blanc ($a_w = 0,92$) i lleugerament superior, de fins a 1,5 logs, en el pernil curat ibèric ($a_w = 0,88$). En canvi, en les mostres on la nisina va ser incorporada mitjançant films de PVOH, l'efecte listericida no va excedir gairebé mai el 0,5 log d'inactivació de *L. monocytogenes*, en cap dels dos tipus de pernil curat.

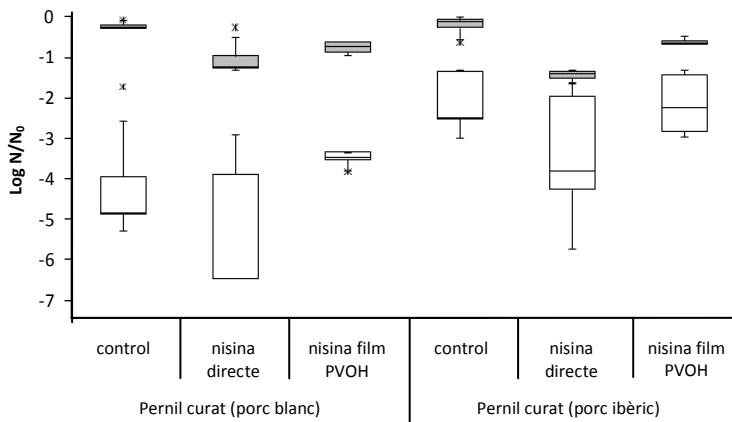


Figura 19. Representació gràfica tipus diagrama de caixes* (box plot) de les reduccions logarítmiques de *L. monocytogenes* aconseguides en dos tipus diferents de pernil curat, tractats per HP (600 MPa, 5 min, 15 °C) (caixes blanques) o sense tractar (caixes grises), en combinació o no amb nisina (200 AU/cm²) aplicada directament sobre la superfície de la llenca o mitjançant films de PVOH.*Les barres d'error indiquen els valors mínims i màxims (n=5, per mostres pressuritzades i n=4 per mostres no pressuritzades), les línies horitzontals els valors de les medianes i les caixes els valors entre el primer i el tercer quartil. Els asteriscs indiquen els valors atípics.

Pel que fa als resultats de les mostres pressuritzades (600 MPa durant 5 min) en general es va donar una major reducció en el pernil curat de porc blanc ($a_w = 0,92$) que en el pernil curat ibèric ($a_w = 0,88$), evidenciant l'efecte protector de la baixa a_w enfront la pressió. Amb l'aplicació directa de nisina en combinació amb HP es van assolir unes reduccions logarítmiques importants, que en alguns casos van arribar a nivells per sota del límit de quantificació (reduccions d'almenys 6,35 logs en el pernil curat de porc blanc). En canvi quan l'aplicació de nisina es va fer mitjançant films de PVOH, les reduccions logarítmiques aconseguides van ser molt similars a les experimentades en les mostres tractades únicament amb HP. Aquest fet es pot deure a que per tal que la nisina inclosa en el film pugui exercir un efecte sobre *L. monocytogenes* en el producte, la bacteriocina ha de migrar cap al producte. Aquesta migració és gradual i, per tant, necessita d'un temps que, tot i que sol ser variable, implica normalment l'emmagatzematge posterior del producte (Quintavalla i Vicini, 2002).

Tal i com es mostra a la **Taula 20**, en el pernil curat de porc blanc amb a_w alta tractat per HP i amb nisina aplicada directament, la mitjana de les reduccions observades (-5,60 logs) va ser major que la suma teòrica de la mitjana obtinguda amb els 2 tractaments per separat (-4,65 logs), indicant un possible efecte sinèrgic (Garriga i Aymerich, 2009). Aquest tipus d'efecte pràcticament no es va observar en el pernil curat de porc ibèric amb una a_w més baixa, possiblement degut a la protecció vers les HP derivada de la baixa a_w .

Taula 20. Promig de les reduccions logarítmiques de *L. monocytogenes* observades segons el tractament aplicat en els diferents tipus de pernil curat RTE.

Tractament	Pernil curat (porc blanc)	Pernil curat (ibèric)
	($a_w=0,92$)	($a_w=0,88$)
Nisina directe (200 AU/ cm ²) ^a	-0,80	-1,23
HP (600 MPa, 5 min)	-3,85	-1,82
Nisina directe + HP	-5,60	-3,20

^a: AU: Unitats arbitràries d'activitat inhibidòria *in vitro* mesurades enfront d'un còctel de soques de *L. monocytogenes* (CTC 1010, CTC 1011 i CTC 1034).

L'ús de la nisina aplicada directament sobre la superfície en combinació amb tractaments per HP també ha estat objecte d'altres estudis en productes carnis cuits, amb una a_w més alta als estudiats en aquesta tesi. En aquest sentit, Jofré *et al.* (2008b) van observar una reducció en els recomptes de *L. monocytogenes* en pernil cuit tractat amb nisina en superfície (800 AU/g) i HP (600 MPa durant 5 min a 10 °C) d'almenys 3,5 logs (valor equivalent a la concentració inoculada inicial). Després del tractament per HP i durant tot l'emmagatzematge, els recomptes de *L. monocytogenes* es van mantenir per sota del límit de quantificació. Pel que fa a l'aplicació de nisina mitjançant envasat actiu, Jofré *et al.* (2007) van estudiar l'efecte de l'ús de la nisina (200 AU/cm²) aplicada amb films de polipropilè en combinació amb tractaments d'HP (400 MPa durant 10 min a 17 °C) també en pernil cuit inoculat amb *L. monocytogenes* a raó de 10⁴ CFU/g, observant una reducció dels recomptes fins a nivells de 3 MPN/g.

Així doncs en productes carnis cuits, la combinació de la bioconservació (mitjançant l'aplicació directa o films) amb els tractaments per HP té efectes bactericides similars que en productes curats.

5.2.3 Aplicació dels resultats en la gestió del risc de *L. monocytogenes* en productes carnis RTE

Tal com s'ha comentat a l'apartat 5.1 sobre el comportament de *L. monocytogenes* en productes carnis, l'ús de les tecnologies de conservació emergents té un interès concret segons el tipus de producte i les exigències (criteris microbiològics) del mercat al qual van adreçats. Convé conèixer quins són els nivells del patogen permesos en cada cas i establir el tractament o la combinació de tractaments a aplicar al producte per tal d'assolir l'Objectiu de Seguretat Alimentària (*Food Safety Objective*, FSO) que correspongui (Ordóñez Pereda *et al.*, 2004).

En el cas d'una hipotètica contaminació de **productes carnis curats RTE** (*i.e.* pernil curat), les característiques fisicoquímiques típiques d'aquest tipus de productes no serien suficients per garantir l'eliminació de *L. monocytogenes* fins a nivells compatibles amb la tolerància zero (*i.e.* absència en 25g, equivalent a <0,04 CFU/g o a un FSO = -1,39) que exigeix l'administració nord-americana (FSIS, 2003) (vegeu apartat 1.3.2 de la Secció d'Introducció). En aquestes circumstàncies, Hoz *et al.* (2008) van estimar que el Criteri de Funcionament (*Performance Criteria*, PC) que s'hauria d'assolir amb els tractaments d'higienització post-processat hauria de ser de 2,39 reduccions decimals (D) o logarítmiques. Aquest valor s'obté mitjançant l'aplicació de la fórmula conceptual proposada per la ICMSF (2002) descrita a l'apartat 1.3.1 de la Secció d'Introducció:

$$\begin{aligned}
 H_0 - \sum R + \sum I &\leq FSO \\
 \sum R &\geq FSO - H_0 - \sum I \\
 \sum R &\geq -1,39 - 1 - 0 \\
 PC = \sum R &\geq -2,39
 \end{aligned}$$

considerant uns nivells de contaminació inicial (H_0) de 10 cèl·lules/g (1 log CFU/g), com a escenari conservador, *i.e.* el pitjor dels casos, que es podria donar en processos de manipulació post-processat (ICMSF, 2002); i un increment en la concentració ($\sum I$) de 0, donat que els productes carnis curats no permeten el creixement de *L. monocytogenes*.

Amb els resultats de l'Article 1, resumits a la **Figura 20**, s'evidencia que mitjançant la pressurització (600 MPa, 5 min) del pernil curat de porc blanc (a_w alta) es va assolir un PC = -2,39 amb un relatiu marge de seguretat, independentment de l'aplicació o no de nisina. Tanmateix, l'aplicació de nisina permetria disminuir la intensitat dels tractaments per assolir o superar el mateix criteri de funcionament (Hereu *et al.*, 2011). En el pernil curat ibèric (a_w baixa) en canvi, només s'assoliria l'FSO indicat en el cas de tractar el pernil a 600 MPa durant 5 min en combinació amb l'addició de nisina (200 AU/cm²). Actualment però, l'ús de la nisina no està permès en el pernil curat a llenques, de manera que en els productes de baixa a_w , l'estratègia comercial passaria per l'aplicació de tractaments per HP més efectius (*i.e.* pressions més altes i/o més temps de tractament). Segons el model predictiu desenvolupat per Belletti *et al.* (2012) en un producte carni curat de baixa a_w , per obtenir reduccions promig de l'ordre de 2,39 logs caldria aplicar tractaments de 600 MPa com a mínim durant 6 min.

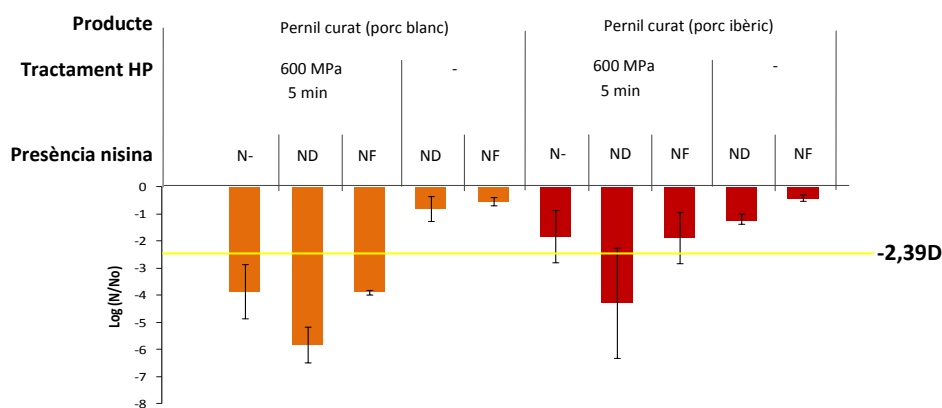


Figura 20. Grau d'inactivació de *L. monocytogenes* en pernil curat tractat per HP a 600 MPa durant 5 min (Article 1) en relació al criteri de funcionament (PC = -2,39D) compatible amb la tolerància zero (FSO = -1,39 log CFU/g) aplicable als productes carnis curats RTE (Hoz *et al.*, 2008). N-: sense nisina; ND: amb presència de nisina aplicada directament (200 AU/cm²); NF: amb presència de nisina aplicada mitjançant envasat actiu (films de PVOH amb 200 AU/cm²).

En l'àmbit europeu, el Reglament Europeu 2073/2005 (European Commission, 2005) adopta l'FSO de 100 CFU/g, és a dir 2 log CFU/g (ICMSF, 2002). Per tant, en productes com el pernil curat no caldrà l'aplicació de cap tractament higienitzant ($\sum R = PC = 0$) perquè la contaminació durant els processos de manipulació post-processat ($H_0 = 1$) no incrementaria durant l'emmagatzematge ($\sum I = 0$) i els nivells del patògen es mantindrien per sota de l'FSO = 2 establert.

Pels **productes carnis cuits RTE** que afavoreixen el creixement de *L. monocytogenes*, en l'opinió de l'AESAN en relació a l'aplicació de les HP en carn i el productes carnis (Ordóñez Pereda *et al.*, 2004), s'estima que per complir amb un FSO = 2 logs CFU/g, el criteri de funcionament (PC) a assolir amb els tractaments per HP seria de 4 reduccions decimals. Els raonaments de l'AESAN es basen també en l'aplicació de la citada fórmula de la ICMSF (2002), però en aquest cas considerant que durant la vida útil del producte els nivells de *L. monocytogenes* podrien incrementar fins a 5 logs ($\sum I = 5$):

$$\begin{aligned}
 H_0 - \sum R + \sum I &\leq FSO \\
 \sum R &\geq FSO - H_0 - \sum I \\
 \sum R &\geq 2 - 1 - 5 \\
 PC = \sum R &\geq -4
 \end{aligned}$$

En aquesta tesi, els resultats d'inactivació per HP de *L. monocytogenes* en pernil cuit i mortadella obtinguts en l'Article 3 es representen a la **Figura 21**. L'estat fisiològic de l'inòcul utilitzat va ser determinant en els resultats obtinguts i de fet, la recomanació de la AESAN (PC = -4D) només es va assolir en les mostres inoculades amb *L. monocytogenes* adaptada al fred (8 °C), però no en les que prèviament havien estat congelades a -80 °C.

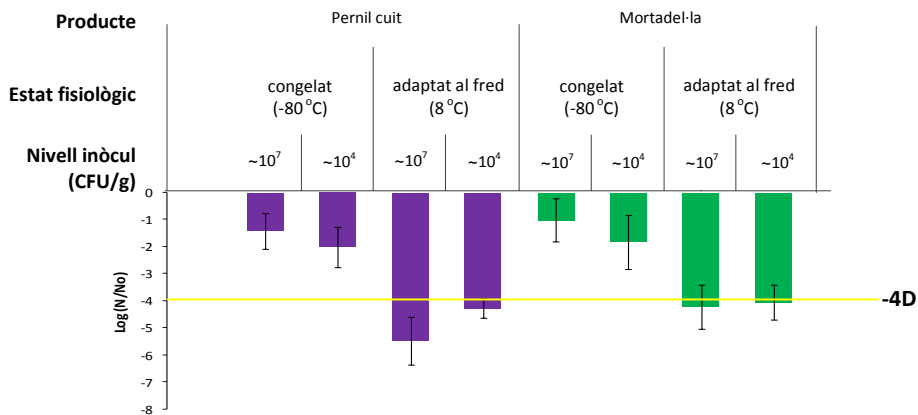


Figura 21. Grau d'inactivació assolit en les mostres de pernil cuit i mortadella tractades per HP a 400 MPa durant 5 min (Article 3), en relació al criteri de funcionament (PC = -4D) aplicable als productes carnis cuits RTE, recomanat per la AESAN per complir amb l'FSO de 100 cèl·lules/g (Ordóñez Pereda *et al.*, 2004).

Un escenari conservador, des del punt de vista de la seguretat alimentària, seria el cas de les situacions en les que *L. monocytogenes* hagi desenvolupat mecanismes de resistència a l'alta pressió, com en el cas de les cèl·lules sotmeses a estressos osmòtics o de congelació. En aquests casos, caldria aplicar tractaments d'HP més intensos i/o més llargs per aconseguir inactivacions de l'ordre de 4 reduccions logarítmiques. Precisament, els assajos realitzats per a la modelització de l'efecte de les HP en la inactivació de *L. monocytogenes* (Article 2), es van realitzar amb cèl·lules prèviament congelades (-80 °C). El model matemàtic obtingut possibilita la construcció de diagrames d'isoreducció que permeten identificar la combinació de condicions de pressió i temps de tractament que causen una determinada reducció logarítmica.

Així, segons el diagrama d'isoreducció derivat del model predictiu obtingut (**Figura 22**), per aconseguir un PC = -4D de *L. monocytogenes* en productes carnis cuits, caldrien tractaments de l'ordre de 500 MPa durant 3,3 min (en el cas de productes magres com el pernil cuit) i durant 5 min (en productes carnis més greixosos com la mortadel·la).

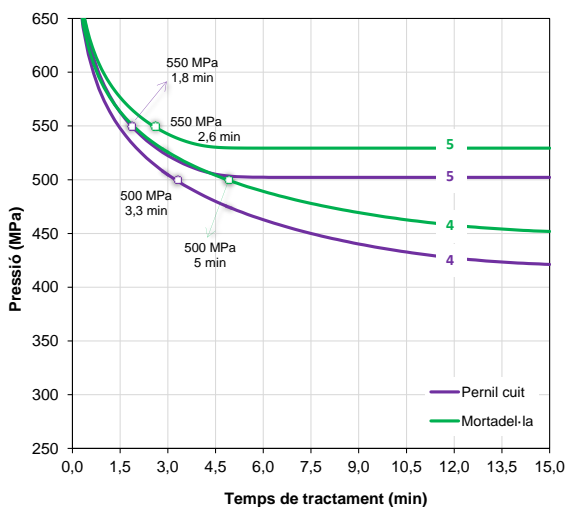


Figura 22. Diagrama d'isoreducció (per assolir PC= -4D i -5D) resultant dels models predictius desenvolupats a l'Article 2 sobre la inactivació per HP de *L. monocytogenes* en pernil cuit i mortadel·la.

En el cas de la FDA, i sota l'empareda de la normativa de tolerància zero, pels tractaments antilisteria que es vulguin aplicar en productes RTE refrigerats en general, es recomana un PC = 6 reduccions decimals (D) (equivalents a les exigències dels tractaments de pasteurització tèrmica) (USFDA, 2008). Tanmateix, l'actualització de la guia per a elaboradors de productes RTE carnis i d'aus de la FSIS (2014), estableix que els tractaments listericides post-letalitat aplicables específicament als productes RTE carnis provoquin una reducció de 5D en els nivells de *L. monocytogenes*. Segons el model matemàtic desenvolupat (Article 2), aquest nivell d'inactivació es podria assolir en promig aplicant tractaments de 550 MPa durant 1,8 min en pernil cuit i durant 2,6 min en mortadel·la (**Figura 22**).

Pressions de l'ordre de 600 MPa requeririen de temps de tractament molt menors per aconseguir el mateix estàndard de seguretat o criteri de funcionament. De fet, l'aplicació dels models obtinguts (Article 2) en les condicions dinàmiques de pressió i temps, indiquen que per tractaments a partir de ca. 700 MPa la inactivació de *L. monocytogenes* es dona bàsicament durant la fase d'increment de pressió dels tractaments d'HP (coneguda com *come-up time*).

5.3 Comportament de *L. monocytogenes* en productes carnis RTE sotmesos a tractaments per altes pressions i/o amb aplicació de nisina, durant l'emmagatzematge en refrigeració

El comportament de *L. monocytogenes* durant l'emmagatzematge en refrigeració dels productes tractats per HP va ser molt diferent segons el tipus de producte. A la **Figura 23** es mostra a mode d'exemple, el comportament diferencial observat malgrat es consideren assajos en què s'han utilitzat *L. monocytogenes* amb diferents estats fisiològics inoculats en productes carnis RTE tractats a diferents nivells de pressió.

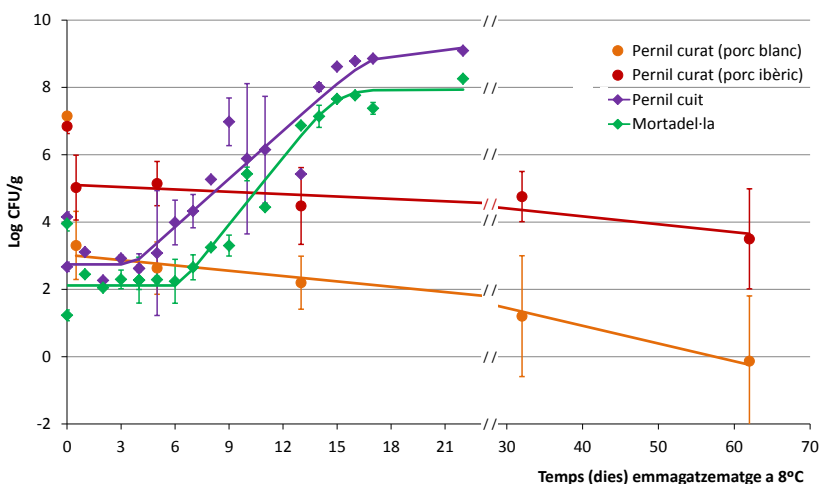


Figura 23. Comportament de *L. monocytogenes* inoculada en productes carnis RTE tractats per HP durant l'emmagatzematge en refrigeració (8°C). Les mostres dels pernils curats es van inocular amb *L. monocytogenes* crescuda en condicions òptimes (37°C) i es van pressuritzar a 600 MPa durant 5 min (Article 1). Les mostres de pernil cuit i mortadel·la es van inocular amb *L. monocytogenes* prèviament congelada (-80°C), i es van tractar a 400 MPa durant 5 min (Article 3). Els punts indiquen la mitjana dels valors observats i les barres d'error la desviació estàndard. Les línies corresponen a un ajust lineal pels productes curats i a un ajust al model logístic de creixement pels productes cuits.

Després dels tractaments per HP en els productes curats RTE (Article 1), *L. monocytogenes* va mantenir els nivells relativament constants, experimentant una lleugera reducció dels recomptes al llarg de l'emmagatzematge.

En els productes cuits (Article 3) la velocitat de creixement de les cèl·lules que van sobreviure al tractament per HP va ser similar a l'observada en les mostres no pressuritzades (apartat 5.1). Tanmateix en alguns casos es va observar una latència o fase d'adaptació prèvia al creixement com la que es representa a la **Figura 23**, i que no es va observar en els corresponents lots sense pressuritzar (vegeu **Figura 15**).

Aquesta diferència en els comportaments es deu a diversos factors (*e.g.* composició dels productes, inclosa la presència de nisina en productes curats i estat fisiològic del patogen inoculat). L'estudi de l'impacte que aquests factors tenen en el comportament de *L. monocytogenes* durant l'emmagatzematge dels productes carnis, s'ha estudiat mitjançant assajos d'inoculació (*challenge tests*) en el cas dels productes carnis curats (Article 1) i mitjançant la modelització matemàtica en els cas dels productes carnis cuits (Article 3). Els resultats obtinguts es discuteixen als apartats següents.

5.3.1 Comportament de *L. monocytogenes* en productes carnis curats RTE tractats per HP

Efecte de la a_w

Durant l'emmagatzematge a 8 °C el comportament de *L. monocytogenes* va mostrar-se diferent en funció del tipus de pernil curat, tal i com es pot observar a la **Figura 24**. En el pernil de porc blanc pressuritzat ($a_w = 0,92$), el patogen va experimentar una tendència al decreixement significativa de 3,5 logs addicionals després de la reducció immediata provocada pel tractament d'HP. En canvi, en el pernil curat ibèric ($a_w = 0,88$), després de la inactivació immediata, els recomptes es van mantenir relativament constants o amb una lleugera tendència a la disminució.

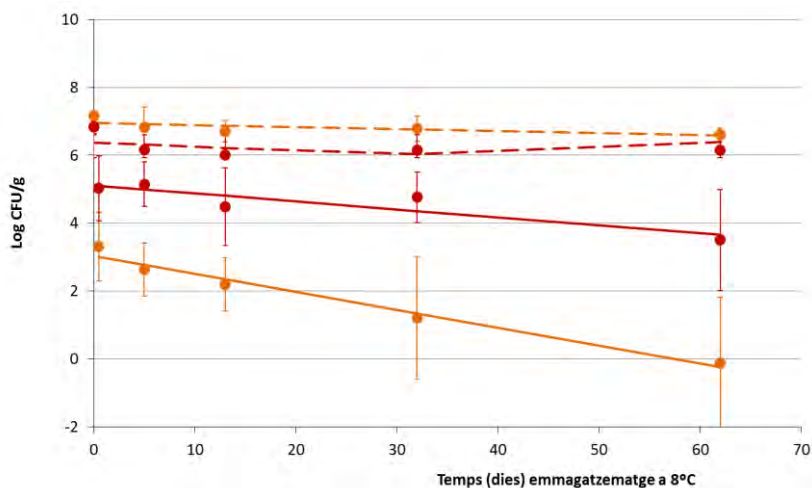


Figura 24. Efecte del tractament per HP (600 MPa durant 5 min) en el recompte de *L. monocytogenes* durant l'emmagatzematge en refrigeració a 8 °C del pernil curat de porc blanc (taronja) i en pernil curat de porc ibèric (vermell). Els ajustos lineals es mostren com les línies contínues pels lots pressuritzats i les discontinües pels lots sense pressuritzar. Els punts indiquen la mitjana dels valors observats i les barres d'error la desviació estàndard. Resultats de l'Article 1.

Aquests resultats mostren que els productes amb una a_w més baixa (*i.e.* pernil curat ibèric estudiat) *a priori* menys favorables des del punt de vista de l'ecologia microbiana, permeten una millor supervivència de *L. monocytogenes*, que els productes amb una a_w superior (*i.e.* pernil curat de porc blanc). Aquest fenomen aparentment sorprenent, s'explica en part, pel fet que la a_w baixa protegeix *L. monocytogenes* dels danys provocats per les HP (Patterson, 2005) i com a conseqüència, permetria mantenir una supervivència constant durant l'emmagatzematge.

En el pernil curat de porc blanc, el valor d' $a_w = 0,92$ es troba en el valor llindar de creixement de *L. monocytogenes*. En aquestes condicions el microorganisme seria capaç de posar en marxa mecanismes de reparació cel·lular per tal de reparar els danys provocats pels tractaments d'HP i intentar créixer. No obstant, i degut a la presència d'altres obstacles o *hurdles* propis del producte, aquest fet provocaria un estrès fisiològic per esgotament metabòlic que finalment causaria la seva mort, la qual cosa explica la reducció observada dels nivells del patògen durant l'emmagatzematge. Aquest fenomen es va observar també en estudis realitzats per Hajmeer *et al.* (2006) en els que durant l'assecat del xoriç (pH inicial = 5), *L. monocytogenes* no va ser capaç de créixer, i fins i tot va morir en condicions de creixement teòricament permissives (a_w entre 0,93 i 0,97 i temperatures d'entre 25 °C i 31 °C).

En canvi, en el pernil curat ibèric, el valor d' $a_w = 0,88$ s'allunya del límit de creixement de *L. monocytogenes*, fent que els mecanismes de reparació no s'activin. En aquestes condicions l'estrès fisiològic serà menor, i per tant, la viabilitat del patògen ja no es veurà tan compromesa.

Aquesta hipòtesi és la que Leistner (2000) proposa per explicar l'estabilitat microbiològica dels aliments elaborats seguint el concepte de tecnologia d'obstacles o barreres (*hurdle technology*). En general, els microorganismes quan es troben en condicions que no permeten el seu creixement més, i ho fan més de pressa, si les condicions ambientals són pròximes a les dels límits de creixement, a temperatura elevada (més pròxima a l'òptima de creixement), si hi ha antimicrobians o si les cèl·lules es troben danyades subletalment. Sota els efectes de la tecnologia de barreres, els microorganismes proven tots els recursos fisiològics homeostàtics disponibles per intentar superar l'ambient hostil. En fer-ho s'esgoten energèticament i acaben morint.

Efecte de l'aplicació de nisina

Pel que fa a l'aplicació de nisina en el comportament de *L. monocytogenes*, el tipus d'aplicació va influenciar de manera important en els nivells de supervivència observada en els diferents productes estudiats (**Figura 25**).

L'efecte de l'**aplicació de nisina de manera directa** sobre la superfície de les llenques de pernil curat no es va veure especialment potenciada per l'acció de les HP (600 MPa durant 5 min) tal i com es pot veure a la **Figura 25A**. Així, durant l'emmagatzematge es van observar comportaments de *L. monocytogenes* paral·lels en els lots no pressuritzats i els pressuritzats. Tanmateix, l'efecte letal inicial provocat pel tractament d' HP en combinació amb la nisina va suposar una disminució del recomptes de *L. monocytogenes* fins a nivells per sota del límit de detecció (absència/25g) al final de l'emmagatzematge en ambdós tipus de pernil curat. L'assoliment d'aquests nivells d'absència del

patogen en el producte es va observar més ràpidament en el pernil curat de porc blanc amb una a_w més elevada (0,92), que ja al dia 5 d'emmagatzematge algunes mostres presentaven aquest nivell.

Aquesta tendència també es va observar en l'estudi realitzat per Jofré *et al.* (2008a) amb llenques de pernil curat amb una $a_w = 0,92$ inoculat amb 3,5 log CFU/g de *L. monocytogenes* i nisina aplicada directament (1280 AU/g) sobre la superfície de les llenques. En aquestes, amb el tractament per HP (600 MPa, 5 min, 15 °C) es va aconseguir l'absència del patogen en 10 g de pernil, durant els 2 mesos d'emmagatzematge en refrigeració a 4 °C.

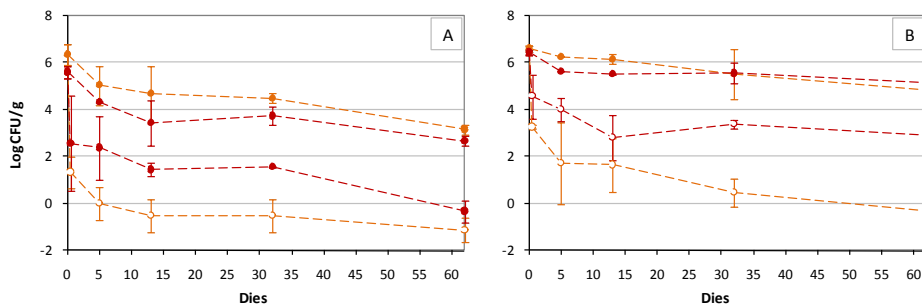


Figura 25. Efecte del tractament per HP (600 MPa, 5 min) i nisina, aplicada a raó de 200 AU/cm² directament sobre la superfície de les llenques (A) o mitjançant envasat actiu de films de PVOH (B), en els recomptes de *L. monocytogenes* durant l'emmagatzematge a 8 °C del pernil curat de porc blanc (taronja) i en pernil curat ibèric (vermell). Les línies contínues corresponen als lots control sense pressuritzar i les discontinües als lots pressuritzats. Resultats de l'Article 1.

L'ús de l'envasat actiu mitjançant **films de PVOH amb nisina** inclosa, en combinació amb tractaments per HP va provocar una pauta en el comportament del patogen diferent segons el tipus de pernil (Figura 25B).

En el pernil de porc blanc (a_w alta), es va observar una reducció de poc més de 1,5 logs durant els 5 primers dies d'emmagatzematge. Durant la resta de l'emmagatzematge, els recomptes van anar disminuint fins a trobar-se per sota del límit de detecció al final de l'emmagatzematge, nivell similar al que es va detectar quan la nisina s'aplicava directament. En el pernil curat ibèric (a_w baixa) en canvi, els recomptes del patogen van experimentar una reducció d'aproximadament 2 logs durant les dues primeres setmanes, nivell que es va mantenir més o menys constant fins al final de l'emmagatzematge.

Així, la disminució dels recomptes en els lots amb presència de nisina (mitjançant qualsevol de les dues aplicacions estudiades) va ser significativa en comparació amb els lots control (pressuritzats i no pressuritzats) respectius, en ambdós tipus de pernil curat. Tot i així, la reducció va ser més tardana i amb valors menors quan la nisina es va aplicar mitjançant envasat actiu, que quan es va aplicar directament. Aquests resultats s'explicarien pel fet que el procés de migració de la nisina, que es troba inclosa en el film, necessita de més temps per a poder actuar.

Els resultats que es presenten en aquest treball evidencien la importància de conèixer la influència que cada un dels obstacles o barreres, de forma aïllada però sobretot en combinació, tenen en la

supervivència del patogen, per tal de poder dissenyar i optimitzar processos de conservació ajustats a les característiques del producte en qüestió.

L'aplicació de nisina en qualsevol de les aplicacions estudiades, constitueix una estratègia antimicrobiana efectiva per millorar la seguretat del pernil curat RTE dins les alternatives de post-processat proposades per la Food Safety and Inspection Service (FSIS) (2014).

Els tractaments per HP com a tractaments de post-letalitat són més efectius en termes d'inactivació immediata i de reducció de la supervivència de patogen durant l'emmagatzematge, que l'aplicació de nisina. Tanmateix, l'aplicació d'obstacles combinats permetria ampliar el marge de seguretat per controlar *L. monocytogenes* durant l'emmagatzematge del pernil curat.

5.3.2 Comportament de *L. monocytogenes* en productes cuits RTE tractats per HP

Els estudis que es presenten en aquesta tesi evidencien la capacitat de *L. monocytogenes* per créixer en productes carnis cuits RTE tractats per HP (400 MPa durant 5 min) emmagatzemats a temperatures d'entre 4 i 12 °C (Article 3).

Amb els resultats obtinguts i mitjançant l'enfoc de la modelització, s'ha pogut quantificar el comportament d'aquest patogen en diferents nivells d'inòcul inicial, tipus de producte i estat fisiològic del patogen, entendre la influència que exerceixen els diferents factors en aquest comportament, i en conseqüència valorar la necessitat de tenir-los en compte de manera específica (com a factors o variables independents) en la modelització de les dades (Pérez-Rodríguez i Valero, 2013).

L'ajust de les dades observades en els diferents *challenge tests* a models matemàtics específics per la fase de latència (λ) i la velocitat específica de creixement (μ_{max}) i la posterior comparació estadística, han permès determinar que el comportament de *L. monocytogenes* es veu en part afectat pel tipus de producte, però principalment per la temperatura d'emmagatzematge i per l'estat fisiològic de *L. monocytogenes* previ als tractaments per HP. Aquests factors són els que s'han tingut en compte en la modelització de les dades obtingudes (Article 3) i els resultats es discuteixen en els apartats següents.

Influència del nivell d'inòcul inicial

En els *challenge tests* portats a terme a l'Article 3, després del tractament per HP, no es van observar diferències significatives en els paràmetres cinètics de creixement (λ i μ_{max}) de *L. monocytogenes* en funció de la concentració inoculada abans del tractament per HP. Per tant es pot assumir que aquest factor no provoca un efecte significatiu en la cinètica de creixement del patogen durant la conservació dels productes carnis cuits pressuritzats (400 MPa durant 5 min).

Tanmateix, aquest factor sí que va influir en la variabilitat i la dispersió dels recomptes de *L. monocytogenes* observats durant l'emmagatzematge dels productes tractats per HP, que va ser major en els lots inoculats amb un baix nivell d'inòcul inicial (ca. 10^4 CFU/g). Aquest fet es podria associar tant a:

- la variabilitat en el grau d'inactivació provocada per les HP (Tholozan *et al.*, 2000), i per tant a la variabilitat en el nivell del patogen que, havent sobreviscut al tractament, inicia la cinètica de creixement ($\text{Log } N_0$) o,
- la variabilitat del temps que triguen les cèl·lules resistents a les HP a iniciar el creixement (*i.e.* fase de latència, λ) que es coneix que incrementa en disminuir el nivell d'inòcul per sota de 100 CFU/g (Augustin *et al.*, 2000).

Influència del tipus de producte

La principal diferència entre els dos tipus de productes RTE carnis cuits utilitzats en els *challenge tests* va ser el contingut de greix. Aquest factor no va provocar diferències estadísticament significatives en els valors de μ_{max} entre productes, ni tampoc entre lots pressuritzats i no pressuritzats. Així doncs, es va utilitzar una única equació amb paràmetres comuns per ambdós productes per descriure aquest paràmetre de creixement.

Per altra banda, la λ es va veure influenciada pel tipus de producte, ja que en general aquest paràmetre va ser lleugerament més llarg en les mostres pressuritzades de mortadel·la (producte més greixós) que en les mostres pressuritzades de pernil cuit (producte més magre). Les diferències observades van requerir l'ajust de models específics per a cadascun dels productes estudiats (vegeu Article 3).

Tanmateix, la influència del greix en el comportament de *L. monocytogenes* durant l'emmagatzematge en refrigeració dels productes carnis no queda del tot clara a la bibliografia disponible (Dickson, 1989; Grau i Vanderlinde, 1993) tal i com es discuteix a l'Article 3, per la qual cosa caldrien estudis posteriors per a poder elucidar el paper d'aquest component.

Influència de l'estat fisiològic de *L. monocytogenes*

L'estat fisiològic de *L. monocytogenes* previ al tractament per HP (*i.e.* adaptat a 8 °C o congelat a -80 °C) s'ha vist com un factor determinant en el creixement d'aquest patogen en productes carnis RTE cuits tractats per HP, bàsicament degut a la seva influència en l'existència o no de fase de latència (λ). En canvi, no es van observar diferències significatives entre la velocitat de creixement (μ_{max}) del patogen adaptat a 8 °C i del congelat a -80 °C abans del tractament per HP.

La λ es va observar en tots els assajos realitzats amb productes inoculats amb *L. monocytogenes* prèviament congelada (-80 °C), essent més prolongada a temperatures d'emmagatzematge inferiors i lleugerament més curta en el pernil cuit que en la mortadel·la. Per altra banda, les mostres inoculades amb *L. monocytogenes* adaptades al fred (8 °C) van mostrar una λ significativa únicament en els assajos a temperatura de refrigeració de 4 °C, possiblement pel fet que la temperatura d'emmagatzematge va ser inferior a la temperatura de creixement utilitzada en la preparació de l'inòcul (8 °C).

Els models secundaris de λ més generalment utilitzats per a descriure aquest paràmetre cinètic en funció de la temperatura d'emmagatzematge no s'adequaven als resultats obtinguts. Per aquest motiu, es va optar per emprar l'anomenat concepte de temps de latència relativa (RLT) incorporant el factor temperatura d'emmagatzematge (T), mitjançant 2 sub-paràmetres (k_1 i k_2) (vegeu Article 3).

La modelització global de la totalitat de les dades es va realitzar mitjançant la integració de les equacions dels models secundaris de μ_{max} i λ a l'equació del model logístic amb retard (vegeu estimació de paràmetres a l'Article 3). Amb aquest enfoc i mitjançant el model matemàtic obtingut es pot quantificar i descriure el comportament del patogen durant l'emmagatzematge en refrigeració dels productes carnis cuits (pernil dolç i mortadel·la) segons si *L. monocytogenes* es va adaptar al fred o va ser congelada prèviament al tractament d'HP. Tal i com mostra la **Figura 26**, el comportament de *L. monocytogenes* és notablement diferenciat segons l'estat fisiològic previ al tractament per HP del patogen.

L'evident λ que s'observa en les cèl·lules sotmeses prèviament a congelació (-80 °C) podria relacionar-se amb el concepte de "work to be done", que es defineix com el treball necessari per adaptar-se a un determinat ambient o condicions, o bé ajustar el seu estat fisiològic (incloent mecanismes de reparació o de reestabliment de l'estat fisiològic òptim) per a poder iniciar el creixement exponencial (Ross, 1999). El fet que aquest esforç només es doni en les cèl·lules de *L. monocytogenes* congelades podria explicar-se per la necessitat d'aquestes de revertir els mecanismes de protecció generats durant el procés de congelació i/o tractament per HP (vegeu apartat 5.2.1).

Per altra banda, la diferència en el comportament observat per *L. monocytogenes* en funció del seu estat fisiològic podria explicar-se també per una hipotètica presència simultània de dues subpoblacions de cèl·lules després del tractament per HP. Les adaptades al fred (8 °C) haurien mort majoritàriament per l'acció de les HP, excepte una petita part que hauria resistit intacta sense danys subletals (*i.e.* segons la teoria del "tot o res") i apunt per créixer sense latència. En canvi, les cèl·lules congelades (-80 °C) haurien sobreviscut en major proporció, tot i que haurien pogut patir danys o canvis que els impediria el creixement en els productes refrigerats. Aquestes cèl·lules danyades serien les que s'evidencien en els recomptes en placa (ja que en condicions òptimes de laboratori podrien créixer i formar colònies), el nivell de les quals emascararia la presència (minoritària) i creixement (sense latència) de les no danyades, que no es detectarien ni es podrien quantificar fins que sobrepassessin el nivell de les danyades sense capacitat de créixer.

Tanmateix, aquestes són explicacions hipotètiques per les quals actualment no disposem d'evidències científiques i experimentals. Per a confirmar la seva veracitat, caldrien estudis addicionals, per exemple per tal de reconèixer la presència i estudiar el comportament de cèl·lules danyades subletalment.

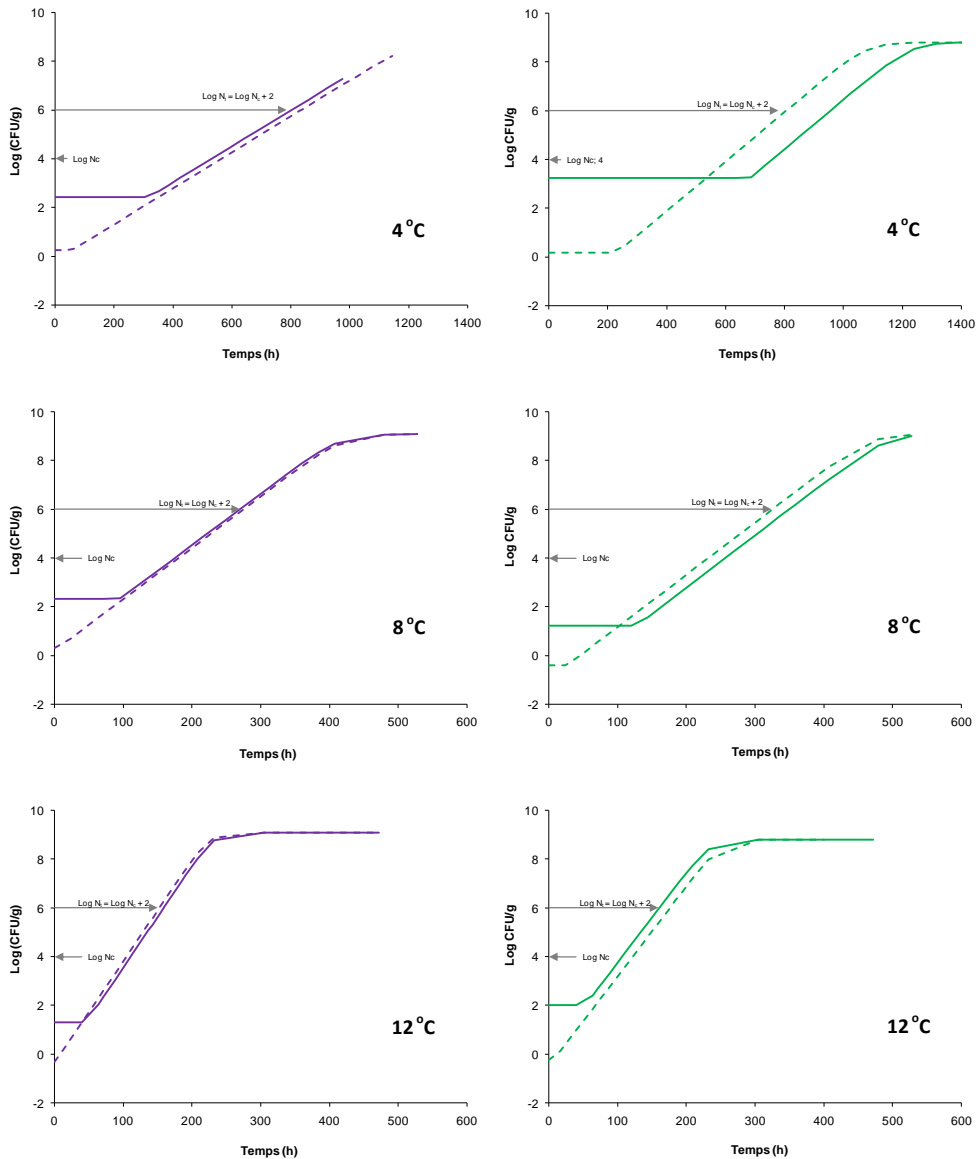


Figura 26. Simulació del creixement de *L. monocytogenes* durant l'emmagatzematge en refrigeració del pernil cuit (lila) i en mortadella (verd) segons el model matemàtic desenvolupat a l'Article 3. La línia contínua correspon al creixement del patògen prèviament congelat a -80°C i la discontinua a l'adaptat a 8°C abans del tractament d'HP. N_c correspon al nivell de contaminació del patògen ($\sim 10^4$ CFU/g) abans del tractament d'HP (400 MPa durant 5 min), i el nivell inicial de patògen (*i.e.* N_0) de la corba de creixement correspon al nivell observat a cadascun dels assajos realitzats després del tractament per HP.

Des del punt de vista de la seguretat alimentària en relació amb *L. monocytogenes* en aliments RTE, sovint s'utilitza el paràmetre “*time to 2 log increase*” que es defineix com el temps necessari per augmentar en 2 unitats logarítmiques (*i.e.* 100 vegades) la concentració inicial (*i.e.* prèvia al tractament per HP) del patogen (Ross, 2010; Seafood Spoilage and Safety Predictor v.3 (sssp.dtuqua.dk)). Es tracta d'un paràmetre que no depèn d'un valor de concentració inicial concret, que permet fer una estimació indirecta de la vida útil segura. En concret estimaria, per exemple, el temps necessari per assolir el límit crític marcat per la legislació (100 CFU/g) a partir de la contaminació inicial de l'ordre d'1 CFU/g, valors raonablement previsibles segons la informació bibliogràfica disponible (Gombas, 2003; Little, 2009; Ross, 2010). A la **Taula 21** es mostra el temps necessari per incrementar en 2 logs el nivell d'inòcul inicial (previ al tractament d'HP) determinat per ambdós productes estudiats mitjançant els models matemàtics obtinguts per a cada producte a l'Article 3.

Taula 21. Estimació del temps necessari per incrementar 100 vegades els nivells de *L. monocytogenes* en pernil cuit i mortadel·la tractats per HP (400 MPa durant 5 min) en funció de la temperatura de refrigeració i de l'estat fisiològic del patogen (congelat a -80 °C o adaptat al fred, 8 °C), segons les prediccions dels models matemàtics obtinguts a l'Article 3.

Temperatura de conservació (°C)	Temps per incrementar 2 logs la concentració inicial ^o (<i>i.e.</i> vida útil segura en dies)			
	Pernil cuit		Mortadel·la	
	-80 °C	8 °C	-80 °C	8 °C
4	28,21	34,79	39,79	33,54
8	11,46	11,23	15,58	13,94
12	6,62	6,37	6,70	7,33

^o: Prèvia al tractament d'HP (N₀= 1 CFU/g)

Aquests resultats doncs, mostren que el temps necessari per augmentar la concentració en 2 logs respecte la concentració inicial prèvia a un tractament per HP de 400 MPa és molt similar en ambdós productes, independentment de l'estat fisiològic. La influència de l'estat fisiològic de *L. monocytogenes* té conseqüències contraposades en la inactivació per HP i en el posterior potencial de creixement en refrigeració, de manera que quan es valoren globalment els dos aspectes mitjançant el paràmetre *2 log increase* les diferències degudes a l'estat fisiològic són poc rellevants.

De fet, en l'àmbit del processat dels productes carnis llestos pel consum, *L. monocytogenes* podria presentar diferents estats fisiològics complicant la predicció dels seu comportament. Tanmateix, els resultats obtinguts en la present tesi indiquen que el coneixement de l'estat fisiològic del patogen podria no ser necessari per tal d'estimar el temps per assolir nivells 100 vegades superiors als nivells de contaminació previs al tractament d'HP.

Per altra banda, l'estimació del paràmetre temps per incrementar 2 logs la concentració inicial permet quantificar la millora de la seguretat, en termes de vida útil segura assolida pels tractaments d'HP a 400 MPa durant 5 min (**Taula 21**) en comparació amb la vida útil segura dels mateixos productes sense tractar (**Taula 18**). En aquest cas, el temps per incrementar 2 logs la concentració inicial quan el producte s'emmagatzema en refrigeració s'allarga a l'entorn d'un 10 vegades en

comparació amb els resultats obtinguts dels productes sense pressuritzar, fent palès l'interès d'aquesta tecnologia pel que fa a l'increment de la vida útil segura del producte.

5.4 Bibliografia

- Augustin, J.C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L. i Carlier, V.** (2000) Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(4), 1706-1710.
- Belletti, N., Garriga, M., Aymerich, T. i Bover-Cid, S.** (2012) Quantifying the effect of a_w and fat on the behavior of *Listeria monocytogenes* in pressurized dry-cured ham. A 2nd *workshop on Food Safety: Technologies and Innovations Applied to Food Industry (SICURA)*, p. 305. València.
- Bover-Cid, S., Guàrdia, M.D., Claret, A., Aymerich, M.T. i Arnau, J.** (2011a) Impact of high pressure processing on the quality and safety of ready-to-eat Iberian chorizo and dry-cured loin. A *57th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST). Global challenges to production, processing and consumption of meat*, p. 310. Gent, Belgium.
- Bover-Cid, S., Hereu, A., Garriga, M. i Aymerich, M.T.** (2011b) Pre-culture conditions and food characteristics influence the high pressure resistance of *Listeria monocytogenes* on RTE cured meat products. A *SfAM Summer Conference 2011. Food Safety* Dublin, Ireland.
- Bover-Cid, S., Hereu, A., Garriga, M. i Aymerich, M.T.** (2011c) Pre-culture conditions as a key factor of the behaviour of *Listeria monocytogenes* on high pressure processed RTE cooked meat products. A *TUBITAK-MAM 4th International Congress on Food and Nutrition and SAFE Consortium 3rd International Congress on Food Safety*, p. 65. Istanbul, Turkey.
- Casadei, M.A., Mañas, P., Niven, G., Needs, E. i Mackey, B.M.** (2002) Role of membrane fluidity in pressure resistance of *Escherichia coli* NCTC 8164. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(12), 5965-5972.
- Chen, H.** (2007) Use of linear, Weibull, and log-logistic functions to model pressure inactivation of seven foodborne pathogens in milk *Food Microbiology* **24**(3), 197-204.
- Community Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* / Agence française de sécurité sanitaire des aliments (CRL/AFSSA)** (2008) Technical guidance document on shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Disponible a: http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/shelflife_listeria_monocytogenes_en.pdf [Consulta: 13 novembre 2013]
- Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Versyck, K.J., Vandewaetere, B., Van Impe, J. i Debevere, J.** (2001) Growth of *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packed cooked meat products: a predictive model. *Food Microbiology* **18**(1), 53-66.
- Dickson, J.S.** (1989) Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on beef tissue surfaces as affected by simulated processing conditions. *Journal of Food Safety* **10**(3), 165-174.
- Erkmen, O. i Dogan, C.** (2004) Effects of ultra high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* and natural flora in broth, milk and fruit juices. *International Journal of Food Science and Technology* **39**(1), 91-97.
- European Commission** (2005) Commission Regulation (EC) N°2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Communities* **L 338**(22.12.2005), 1-26.
- European Food Safety Authority (EFSA)** (2011) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *The EFSA Journal* **9**(3), 2090-2468.
- Farkas, D.F. i Hoover, D.G.** (2000) High pressure processing. *Journal of Food Science* **65**, 47-64 (supplement).
- Food Safety and Inspection Service (FSIS)** (2003) 9 CFR Part 430: Control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat and poultry products. *Federal Register* **68**(109), 34208-34254.
- Food Safety and Inspection Service (FSIS)** (2014) Compliance guideline: Controlling *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products. Disponible a : http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/d3373299-50e6-47d6-a577-e74a1e549fde/Controlling_LM_RTE_Guideline_0912?MOD=AJPERES [Consulta: 8 març 2014]
- Garriga, M. i Aymerich, M.T.** (2009) Advanced decontamination technologies: high hydrostatic pressure on meat products. A *Safety of meat and processed meat*, pp. 183-208. Editat F. Toldra. New York: Springer Science+Business Media.

- Gervilla, R., Ferragut, V. i Guamis, B.** (2000) High pressure inactivation of microorganisms inoculated into ovine milk of different fat contents. *Journal of Dairy Science* **83**(4), 674-682.
- Gombas, D.E., Chen, Y., Clavero, R.S., i Scott, V.N.** (2003) Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Journal of Food Protection* **66**, 559-569.
- Grau, F.H. i Vanderlinde, P.B.** (1993) Aerobic growth of *Listeria monocytogenes* on beef lean and fatty tissue: Equations describing the effects of temperature and pH. *Journal of Food Protection* **56**(2), 96-101.
- Hajmeer, M., Basheer, I. i Cliver, D.O.** (2006) Survival curves of *Listeria monocytogenes* in chorizos modeled with artificial neural networks. *Food Microbiology* **23**(6), 561-570.
- Hayman, M.M., Kouassi, G.K., Anantheswaran, R.C., Floros, J.D. i Knabel, S.J.** (2008) Effect of water activity on inactivation of *Listeria monocytogenes* and lactate dehydrogenase during high pressure processing. *International Journal of Food Microbiology* **124**(1), 21-26.
- Hereu, A., Bover-Cid, S., Simonin, H., Garriga, M. i Aymerich, T.** (2011) Tratamiento de productos listos para el consumo mediante bioconservantes naturales y alta presión hidrostática (PROCARTE, acción 2). A *Productos cárnicos para el siglo XXI. Seguros, nutritivos y saludables. Capítulo 4.*, p. 348. Cáceres.
- Hoz, L., Cambero, M.I., Cabeza, M.C., Herrero, A.M. i Ordóñez, J.A.** (2008) Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packed dry-cured ham by e-beam radiation. *Journal of Food Protection* **71**(10), 2001-2006.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)** (2002) *Microorganisms in foods 7: Microbiological Testing in Food Safety Management*. Springer, pp. 362.
- Jofré, A., Aymerich, T., Monfort, J.M. i Garriga, M.** (2008a) Application of enterocins A and B, sakacin K and nisin to extend the safe shelf-life of pressurized ready-to-eat meat products. *European Food Research and Technology* **228**(1), 159-162.
- Jofré, A., Garriga, M. i Aymerich, T.** (2007) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham through active packaging with natural antimicrobials and high-pressure processing. *Journal of Food Protection* **70**(11), 2498-2502.
- Jofré, A., Garriga, M. i Aymerich, T.** (2008b) Inhibition of *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in cooked ham by combining antimicrobials, high hydrostatic pressure and refrigeration. *Meat Science* **78**(1-2), 53-59.
- Koseki, S., Mizuno, Y. i Yamamoto, K.** (2007) Predictive modelling of the recovery of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked ham after high pressure processing. *International Journal of Food Microbiology* **119**(3), 300-307.
- Leistner, L.** (2000) Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* **55**(1-3), 181-186.
- Little, C.L., Sagoo, S.K., Gillespie, I.A., Grant, K. i McLauchlin, J.** (2009) Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in selected retail ready-to-eat foods in the United Kingdom. *Journal of Food Protection* **72**(9), 1869-1877.
- McClements, J.M.J., Patterson, M.F. i Linton, M.** (2001) The effect of growth stage and growth temperature on high hydrostatic pressure inactivation of some psychrotrophic bacteria in milk. *Journal of Food Protection* **64**(4), 514-522.
- Molina-Höppner, A., Doster, W., Vogel, R.F. i Ganzle, M.G.** (2004) Protective effect of sucrose and sodium chloride for *Lactococcus lactis* during sublethal and lethal high-pressure treatments. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(4), 2013-2020.
- Morales, P., Calzada, J. i Nuñez, M.** (2006) Effect of high-pressure treatment on the survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in sliced vacuum-packaged iberian and serrano cured hams. *Journal of Food Protection* **69**(10), 2539-2543.
- Ordóñez Pereda, J., Juárez Iglesias, M., Zurera Cosano, G. i Otero Carballeira, A.** (2004) Opinión del Comité científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Presidencia de la AESA, en relación con la aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos.
- Patterson, M.F.** (2005) Microbiology of pressure-treated foods. *Journal of Applied Microbiology* **98**(6), 1400-1409.

- Pérez-Rodríguez, F. i Valero, A.** (2013) *Predictive microbiology in foods*. New York: Springer.
- Quintavalla, S. i Vicini, L.** (2002) Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science* **62**(3), 373-380.
- Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)** (2010) The Rapid Alert System for Food and Feed Annual Report 2010. 1-64. Disponible a : http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/docs/rasff_annual_report_2010_en.pdf [Consulta: 21 gener 2013]
- Rasanayagam, V., Balasubramaniam, V.M., Ting, E., Sizer, C.E., Bush, C. i Anderson, C.** (2003) Compression heating of selected fatty food materials during high-pressure processing. *Journal of Food Science* **68**(1), 254-259.
- Rendueles, E., Omer, M.K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R. i Prieto, M.** (2011) Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT-Food Science and Technology* **44**(5), 1251-1260.
- Ritz, M., Jugiau, F., Rama, F., Courcoux, P., Semenou, M. i Federighi, M.** (2000) Inactivation of *Listeria monocytogenes* by high hydrostatic pressure: effects and interactions of treatment variables studied by analysis of variance. *Food Microbiology* **17**, 375-382.
- Ross, T.** (1999) *Predictive food microbiology models for the meat industry*. North Sydney, Australia: Meat and Livestock Australia.
- Ross, T.** (2010) Defining “short shelf life” foods with respect to risk from *Listeria monocytogenes* (Final report: September 2010). Disponible a : <http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/short-shelf-life/report.pdf> [Consulta: 25 març 2014]
- Simpson, R. i Gilmour, A.** (1997) The effect of high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* in phosphate-buffered saline and model food systems. *Journal of Applied Microbiology* **83**(2), 181- 188.
- Sinensky, M.** (1974) Homeoviscous adaptation—A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **71**(2), 522-525.
- Smelt, J.P.P.M., Rijke, A.G.F. i Hayhurst, A.** (1994) Possible mechanisms of high-pressure inactivation of microorganisms. *High Pressure Research* **12**, 199-203.
- Tholozan, J.L., Ritz, M., Jugiau, F., Federighi, M. i Tissier, J.P.** (2000) Physiological effects of high hydrostatic pressure treatments on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 202-212.
- United States Food and Drug Administration (USFDA)** (2008) Guidance for industry: Control of *Listeria monocytogenes* in refrigerated or frozen ready-to-eat foods. Disponible a: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodProcessing/HACCP/ucm073110.htm> [Consulta: 21 gener 2013]
- Wesche, A.M., Gurtler, J.B., Marks, B.P. i Ryser, E.T.** (2009) Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* **72**(5), 1121-1138(18).

6 CONCLUSIONS I PERSPECTIVES DE FUTUR

D'acord amb l'objectiu plantejat en aquesta tesi doctoral i amb els resultats obtinguts, inclosos com a articles i discutits globalment en la present memòria, s'han extret les **conclusions** que es presenten a continuació.

1. Les altes pressions (HP) tenen efectes listericides en productes carnis llestos per al consum (RTE). El grau d'inactivació de *L. monocytogenes* provocat pels tractaments d'HP depèn en gran mesura de les característiques del producte RTE tractat, la qual cosa fa necessària una validació específica per tal d'ajustar en cada cas particular les condicions de tractament.
2. Els valors d' a_w característics dels productes carnis curats RTE (e.g. pernil curat) tenen efectes bacteriostàtics (no permeten el creixement de *L. monocytogenes* durant la vida útil) però redueixen l'efectivitat listericida dels tractaments d'HP. L'efecte piezoprotector de l' a_w mostra una tendència lineal pel que fa a la inactivació immediata. A llarg termini, la piezoprotecció de l' a_w permet una millor supervivència de *L. monocytogenes* durant l'emmagatzematge en refrigeració dels productes carnis curats RTE envasats al buit.
3. En productes carnis curats RTE, el criteri de funcionament compatible amb l'Objectiu de Seguretat Alimentària (FSO) en el marc de les polítiques de "tolerància zero" per *L. monocytogenes* (i.e. 2,39 logs de reducció), s'aconsegueix amb tractaments de l'ordre de 600 MPa/5 min en productes d' a_w relativament alta. En productes carnis curats de baixa o molt baixa a_w podria ser necessària la combinació d'HP amb altres tecnologies com la bioconservació (e.g. addició de nisina) per assolir els mateixos estàndards de seguretat alimentària.
4. L'HP com a tractament post-processat antilisteria en productes carnis curats és més efectiu (tant a curt com a llarg termini) que l'aplicació de nisina. L'aplicació directa de nisina sobre la superfície dels productes curats és més efectiva que l'aplicació mitjançant envasat actiu. En qualsevol cas, l'aplicació combinada d'aquests tractaments en el marc de la tecnologia d'obstacles, amplia el marge de seguretat en la minimització i el control de *L. monocytogenes* durant l'emmagatzematge dels productes carnis curats RTE.
5. En productes carnis cuits RTE, el comportament de *L. monocytogenes* front als tractaments d'HP, en termes de cinètica d'inactivació i posterior creixement, depèn del contingut en greix del producte. La velocitat d'inactivació és menor i el temps de latència és lleugerament més llarg en mortadella (producte greixós) que en pernil cuit (producte magre), fent necessari el desenvolupament de models matemàtics d'aquests paràmetres específics per cada producte.

6. Els procediments clàssics de regressió en dos passos (*two-step modelling*) són de gran utilitat per a l'exploració preliminar de les dades, la identificació dels factors significatius a tenir en compte en la generació del model, així com la selecció dels models matemàtics més adients per ajustar a les dades disponibles. Tanmateix, els procediments de modelització mitjançant la regressió global de totes les dades disponibles en un sol pas (*one step/global modelling*) generen models més ajustats i robustos.
7. Els models matemàtics d'inactivació de *L. monocytogenes* per HP obtinguts per productes carnis cuits RTE, s'han validat i permeten estimar acuradament les condicions de pressió i temps de tractament necessàries per tal d'assolir els criteris de funcionament (e.g. 4 o 5 logs de reducció) i complir amb els requeriments i/o recomanacions establertes per les autoritats competents.
8. L'estat fisiològic de *L. monocytogenes* previ al tractament per HP dels productes carnis cuits RTE té un impacte determinant en l'efectivitat del tractament (efecte listericida). El grau d'inactivació en cèl·lules prèviament adaptades al fred (crescudes a 8 °C) va ser considerablement major que les cèl·lules prèviament sotmeses a un estrès per congelació (-80 °C), independentment del nivell d'inòcul.
9. L'estat fisiològic de *L. monocytogenes* previ al tractament per HP també condiciona el comportament del patogen durant l'emmagatzematge dels productes carnis cuits RTE, provocant importants diferències en el temps de latència (λ). Les cèl·lules prèviament adaptades al fred (8 °C) creixen sense o amb menor latència, en comparació amb les cèl·lules prèviament congelades (-80 °C).
10. La velocitat de creixement (μ_{max}) de *L. monocytogenes* en productes carnis cuits no es veu afectada pel tractament d'HP, ni per altres factors estudiats com el tipus de producte, el nivell d'inòcul o l'estat fisiològic del patogen.
11. La modelització matemàtica a través de l'ús del concepte temps de latència relativa (*Relative Lag Time, RLT*) permet la quantificació empírica de l'efecte de l'estat fisiològic de *L. monocytogenes* en la cinètica de creixement del patogen després d'un tractament d'HP a 400 MPa/5 min.
12. Els models matemàtics desenvolupats permeten quantificar l'impacte de l'aplicació d'un tractament d'HP de 400 MPa/5 min en la vida útil segura en refrigeració dels productes carnis cuits RTE. En els productes pressuritzats, el temps necessari per incrementar 2 logs els nivells de contaminació de *L. monocytogenes* (l'anomenat *time to 2 log increase*) s'allargaria de l'ordre de 10 vegades en comparació amb els productes sense pressuritzar.

Els treballs realitzats en aquesta tesi doctoral han posat de manifest l'interès de continuar la investigació en diversos aspectes que es recullen a continuació a mode de **perspectives de futur**.

Per una banda seria interessant determinar i quantificar l'efecte d'altres paràmetres relacionats amb les característiques dels productes carnis RTE, en la cinètica d'inactivació per HP i el posterior comportament de *L. monocytogenes*. A més d'aprofundir en l'estudi de l'efecte del contingut greixós, tindrien un interès particular determinades substàncies bioconservants com els àcids orgànics i les seves sals, per exemple el lactat, pel qual s'han descrit efectes piezoprotectors.

Aprofundir en l'efecte de l'estat fisiològic de *L. monocytogenes* i en el comportament del patogen després dels tractaments d'HP en referència a les hipòtesis plantejades sobre la coexistència de dues subpoblacions, detectant i estudiant la presència i el comportament de cèl·lules danyades subletalment.

Ampliar les condicions de processat per HP assajades per tal de poder incloure el temps i la intensitat del tractament d'HP en els models de creixement presentats. Aquests estudis permetrien l'obtenció de models per quantificar la millora en la seguretat del producte en funció del tractament d'HP aplicat.

En últim terme, els modes matemàtics obtinguts es podrien aplicar en el marc de l'anàlisi de riscos per tal d'avaluar quantitativament l'impacte de les HP en la protecció dels consumidors (*e.g.* en termes de reducció de probabilitat de contraure listeriosi), la millora del compliment dels criteris microbiològics i de tolerància zero establerts en diferents països, així com donar suport científic a la presa de decisions que requereix la gestió del risc associat a *L. monocytogenes* en productes carnis RTE.