

PRODUCTOS CÁRNICOS FERMENTADO-CURADOS
FUNCIONALES Y SEGUROS.
NUEVA VÍA DE INGESTIÓN DE PROBIÓTICOS

Raquel RUBIO MORENO

Dipòsit legal: Gi. 2033-2014

<http://hdl.handle.net/284744>



<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

**PRODUCTOS CÁRNICOS FERMENTADO-CURADOS
FUNCIONALES Y SEGUROS.
NUEVA VÍA DE INGESTIÓN DE PROBIÓTICOS.**



TESIS DOCTORAL

Raquel Rubio Moreno - 2014

TESIS DOCTORAL

**Productos cárnicos fermentado-curados
funcionales y seguros. Nueva vía de ingestión de
probióticos.**

**Raquel Rubio Moreno
2014**

Programa de Doctorado en Tecnología

Directoras:

Dra. Margarita Garriga Turón

Dra. Teresa Aymerich Calvet

Tutora:

Dra. M. Dolors Parés Oliva

*Memoria presentada para optar al Título de Doctor por la
Universitat de Girona*

El trabajo expuesto en esta memoria ha sido subvencionado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) a través de la concesión de una beca pre-doctoral y del Proyecto INIA (RTA2009-00045-00-00).

La Dra. Margarita Garriga Turón, Jefa del Programa de Seguridad Alimentaria del IRTA y la Dra. Teresa Aymerich Calvet, Directora del Subprograma de Seguridad Biótica de los Alimentos del IRTA,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “Productos cárnicos fermentado-curados funcionales y seguros. Nueva vía de ingestión de probióticos” y presentado por Raquel Rubio Moreno para la obtención del Título de Doctora ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Dra. Margarita Garriga Turón

Jefa del Programa de
Seguridad Alimentaria
IRTA (Monells)

Dra. Teresa Aymerich Calvet

Directora del Subprograma
de Seguridad Biótica
IRTA (Monells)

*“Dadas las circunstancias adecuadas,
sin más base que los sueños,
la determinación y la libertad de intentarlo,
personas muy corrientes hacen
constantemente cosas extraordinarias”*

Dee Ward Hock

Agradecimientos

Quisiera dar las gracias a todas aquellas personas que habéis contribuido, directa o indirectamente, en la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, quisiera agradecer a mis Directoras de Tesis Margarita Garriga y Teresa Aymerich la oportunidad brindada para realizar esta Tesis y darles las gracias por su gran ayuda, dedicación, supervisión y buenos consejos.

A las investigadoras Anna Jofré y Sara Bover porque siempre me han resuelto dudas de cualquier ámbito y han estado siempre dispuestas a echarme una mano en todo.

Gracias también a todos mis compañeros de Laboratorio y de despacho (unos están, otros ya se fueron, pero me siguen dando apoyo por otras vías): Carmen, Yoli, Maria, Belén, Nico, Tiago, Kathi, Sergi, Anna. A todos vosotros os doy las gracias por los momentos inolvidables compartidos dentro y fuera del IRTA y porque además de compañeros me llevo buenos amigos. A Patri, Clara y todos los compañeros que tuve durante mi estancia en el IPLA por la increíble acogida que me brindaron. A Montse y Albert y a mis dos sobrinos postizos (Paula y Biel) por esas largas cenas, juegos, charlas y confidencias hasta altas horas de la madrugada.

A "Les Lloques" porque ante cualquier crisis emocional con una quedada y unas risas bastaba.

A "Las vecinas" por esos desayunos de los sábados y los antiguos "paseos" en bicicleta, las charlas de los "cloc, cloc"...

A mis padres y abuelos por haberme convertido en lo que soy y ayudarme en todo. Sin vosotros nada de esto hubiera sido posible. ¡Os quiero infinito!

Y, por último, pero de las personas más importantes en mi vida, a Oscar: primero fue el proyecto final de carrera, después el trabajo final de máster, ahora la Tesis... Mil gracias por tu infinita paciencia, tu cariño y, simplemente, por hacerme tan feliz y, sobretodo, por la nueva etapa de la vida que nos espera. T'ESTIMO!

4. METODOLOGÍA.....	43
5. RESULTADOS.....	49
1. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages.....	50
2. Nutritionally enhanced fermented sausages as a vehicle for potential probiotic lactobacilli delivery.....	60
3. Potentially probiotic and bioprotective lactic acid bacteria starter cultures antagonize the <i>Listeria monocytogenes</i> adhesion to HT29 colonocyte-like cells.....	67
4. The potential probiotic <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CTC1679 survives the passage through the gastrointestinal tract and its use as starter culture results in safe nutritionally enhanced fermented sausages.....	83
6. DISCUSIÓN GENERAL.....	91
1. Aislamiento, caracterización molecular, identificación y caracterización <i>in vitro</i> (tecnológica, de seguridad y funcional) de cepas de BAL procedentes de lactantes.....	93
1.1 Aislamiento, caracterización molecular e identificación de los aislados.....	93
1.2 Caracterización <i>in vitro</i> (tecnológica, funcional y de seguridad).....	96
1.2.1 Caracterización tecnológica.....	97
1.2.2 Caracterización funcional.....	101
1.2.3 Estudios de bioseguridad.....	103
2. Elaboración de embutidos fermentado-curados de baja acidez, nutricionalmente mejorados, potencialmente probióticos y seguros.....	106
2.1 Viabilidad de cepas de <i>Lactobacillus</i> potencialmente probióticas como cultivos iniciadores de embutidos fermentado-curados de baja acidez nutricionalmente mejorados.....	106
2.2 Estudio de la seguridad alimentaria del nuevo embutido potencialmente probiótico.....	111
3. Estudio sobre la potencialidad de colonización del TGI y ensayo preliminar de intervención en humanos.....	112
4. Perspectivas de futuro.....	117
7. CONCLUSIONES.....	119
8. BIBLIOGRAFÍA.....	121

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
ANICE	Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España
ARNr 16S	Subunidad 16S del ARN ribosómico
a_w	Actividad de agua
BAL	Bacterias del ácido láctico
°C	Grados centígrados
ca.	<i>Circa</i>
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CE	Comisión Europea
CGC+	Cocos Gram-positivos Catalasa-positivos
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CO ₂	Dióxido de carbono
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EFC	Embutidos fermentado-curados
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
FOSHU	<i>Foods for Specified Health Uses</i> (Alimentos para Uso Específico de Salud)
FUFOSE	<i>Functional Food Science in Europe</i> (Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa)
g	Gramo
h	Horas
HR	Humedad relativa
ICMSF	<i>International Commission on Microbial Specifications for Foods</i> (Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos)
ILSI	<i>International Life Science Institute</i> (Instituto Internacional de Ciencias de la Vida)
KCl	Cloruro de potasio
kg	Quilogramo

ABREVIATURAS

log	Logaritmo
LPC	Listo para el consumo
MERCASA	Mercados Centrales de Abastecimiento, S.A.
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
ml	Mililitro
MPa	Megapascal
N	Número de muestras ensayadas
N ₂	Nitrógeno
Na	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NAOS	Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
p.e.	Por ejemplo
RAPD-PCR	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> (Amplificación al Azar de Fragmentos Polimórficos de ADN)
TGI	Tracto gastrointestinal
UFC	Unidades formadoras de colonia

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Plan de trabajo de la Tesis Doctoral	44
Fig. 2. Halos de inhibición de la cepa <i>L. gasseri</i> CTC1700 en el antagonismo indirecto frente a <i>L. monocytogenes</i> (A) y <i>Salmonella</i> (B).....	99
Fig. 3. Resultados del test de auto-agregación para las cepas <i>L. rhamnosus</i> CTC1679 (+) (A) y <i>L. casei/paracasei</i> CTC1707 (-) (B).....	102
Fig. 4. <i>L. rhamnosus</i> CTC1679 (no productora de tiramina), forma un halo opaco en medio agar descarboxilasa (A); <i>L. oris</i> CTC1711 (productora de tiramina), forma un halo transparente y un cambio de color en el medio(B).	104
Fig. 5. Perfiles RAPD-PCR (cebador KS) de colonias seleccionadas al azar (1-8) aisladas del lote con <i>L. rhamnosus</i> CTC1679. Cepa parental (+), marcador de peso molecular (M).....	108
Fig. 6. Observación de <i>L. rhamnosus</i> CTC1679 al microscopio óptico (contraste de fases) a 1.000×.....	114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de embutidos fermentados (según Roca e Incze, 1990).	15
Tabla 2. Clasificación de embutidos fermentados (adaptado de Lücke, 2003).	15
Tabla 3. Principales especies microbianas usadas como probióticos en alimentos (Saxelin, 2008).	29
Tabla 4. Recopilación de publicaciones relacionadas con el uso de probióticos en embutidos fermentado-curados.	37
Tabla 5. Técnicas analíticas empleadas en cada uno de los artículos presentados.	45

RELACIÓN DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS

Esta Tesis está conformada por un compendio de cuatro artículos, citados a continuación:

1. Rubio, R., Jofré, A., Martín, B., Aymerich, T., Garriga, M. (2014). Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiology* 38, 303-311.

De acuerdo con los datos del *Journal Citation Reports* (JCR) de 2012:

Factor de impacto: 3,407

Posición en la Categoría *Food Science & Technology*: 9/124 (primer cuartil).

2. Rubio, R., Jofré, A., Aymerich, T., Guàrdia, M.D., Garriga, M. (2014). Nutritionally enhanced fermented sausages as a vehicle for potential probiotic lactobacilli delivery. *Meat Science* 96, 937-942.

De acuerdo con los datos del *Journal Citation Reports* (JCR) de 2012:

Factor de impacto: 2,754

Posición en la Categoría *Food Science & Technology*: 17/124 (primer cuartil).

3. Garriga, M., Rubio, R., Aymerich, T., Ruas-Madiedo, P. Potentially probiotic and bioprotective lactic acid bacteria starter cultures antagonize the *Listeria monocytogenes* adhesion to HT29 colonocyte-like cells. *Beneficial Microbes*, revisión enviada el 08-07-2014.

De acuerdo con los datos del *Journal Citation Reports* (JCR) de 2012:

Factor de impacto: 1,474

Posición en la Categoría *Nutrition & Dietetics*: 55/76 (tercer cuartil).

4. Rubio, R., Martín, B., Aymerich, T., Garriga, M. The potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679 survives the passage through the gastrointestinal tract and its use as starter culture results in safe nutritionally enhanced fermented sausages (2014). *International Journal of Food Microbiology* 186, 55-60.

De acuerdo con los datos del *Journal Citation Reports* (JCR) de 2012:

Factor de impacto: 3,425

Posición en la Categoría *Food Science & Technology*: 8/124 (primer cuartil).

Resumen

Los embutidos fermentado-curados (EFC) están presentes en muchas dietas y son muy apreciados por el consumidor, pero a la vez constituyen una fuente importante de grasa y de sal, responsables de enfermedades cardiovasculares. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias en la fabricación de EFC para innovar en este campo, en beneficio de la promoción de la salud del consumidor.

Con el objetivo de conseguir embutidos funcionales, seguros y con características organolépticas aceptables, se ha investigado la posibilidad de incorporar cepas de *Lactobacillus* potencialmente probióticas como cultivos iniciadores en un EFC de baja acidez, tipo fuet, nutricionalmente mejorado (reducido en sal y grasa). En un primer estudio, se aislaron y caracterizaron bacterias del ácido láctico (BAL) procedentes de heces de lactantes, con el fin de garantizar, dada su procedencia, su implantación en el tracto gastrointestinal (TGI) humano. Se obtuvieron un total de 109 aislados, que fueron tipificados e identificados mediante técnicas moleculares (RAPD-PCR y secuenciación parcial del ADN). Se preseleccionaron seis cepas de *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei/paracasei* CTC1677 y CTC1678, *Lactobacillus gasseri* CTC1700 y CTC1704, *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679 y *Lactobacillus fermentum* CTC1693), género predominante en los EFC y comúnmente presente en la microbiota del TGI humano, que presentaron un mayor potencial tecnológico, funcional y de seguridad *in vitro*, para evaluar su potencial como cultivos iniciadores en un modelo de EFC tradicional. Las dos cepas de *L. casei/paracasei* (CTC1677 y CTC1678) y la cepa *L. rhamnosus* CTC1679 fueron las que presentaron mayor potencial como cultivos iniciadores en el modelo y, por lo tanto, las seleccionadas para ser ensayadas como cultivos iniciadores en fuet nutricionalmente mejorado y evaluar sus características sensoriales en el producto final. Además, también se evaluó la viabilidad como cultivos iniciadores de 3 cepas probióticas comerciales (*L. plantarum* 299v, *L. rhamnosus* GG y *L. casei* Shirota) en el mismo tipo de embutido. La cepa potencialmente probiótica *L. rhamnosus* CTC1679 fue la que demostró un mayor potencial como cultivo iniciador en este tipo de embutido, obteniendo un producto sensorialmente correcto y seguro desde el punto de vista de seguridad alimentaria, tal y como lo demostró el posterior estudio de inoculación tipo “challenge test”, realizado con dicha cepa y los patógenos *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*.

Paralelamente, se evaluó la capacidad de colonización del TGI, empleando la línea celular HT29, y la cepa *L. rhamnosus* CTC1679 se erigió como la más prometedora para continuar los estudios en esta dirección, mediante un estudio de intervención en humanos que consumieron diariamente fuet que contenía dicha cepa como cultivo iniciador. *L. rhamnosus* CTC1679 fue recuperada viable en las heces de los voluntarios durante la ingesta diaria del fuet y al final del periodo de consumo de éste, dentro de los niveles recomendados para conseguir la colonización temporal del intestino y ejercer los efectos saludables, confirmando la capacidad de la misma para sobrevivir al paso por el TGI durante la ingesta del embutido.

Por todo ello, como conclusión general, se puede afirmar que a través de la estrategia de reformulación planteada (reducción de sal y de grasa y adición del cultivo potencialmente probiótico *L. rhamnosus* CTC1679) se ha desarrollado un EFC de baja acidez con gran potencial funcional, microbiológicamente seguro y con las características sensoriales adecuadas.

Resum

Els embotits fermentats-curats (EFC) estan presents en moltes dietes i són molt apreciats pel consumidor, però a la vegada constitueixen una font important de greix i sal, responsables de malalties cardiovasculars. Per tant, és necessari el desenvolupament de noves estratègies en la fabricació d'EFC per innovar en aquest camp, en benefici de la promoció de la salut del consumidor.

Amb l'objectiu d'aconseguir embotits funcionals, segurs i amb característiques organolèptiques acceptables, s'ha investigat la possibilitat d'incorporar soques de *Lactobacillus* potencialment probiòtiques com a cultius iniciadors en un EFC de baixa acidesa, tipus fuet, nutricionalment millorat (reduït en sal i greix). En un primer estudi, es van aïllar i caracteritzar bacteris de l'àcid làctic (BAL) procedents de femtes de lactants, amb la finalitat de garantir, donat el seu origen, la seva implantació en el tracte gastrointestinal (TGI) humà. Es van obtenir un total de 109 aïllats, que van ser tipificats i identificats emprant tècniques moleculars (RAPD-PCR i seqüenciació parcial de l'ADN). Es van preseleccionar sis soques de *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei/paracasei* CTC1677 i CTC1678, *Lactobacillus gasseri* CTC1700 i CTC1704, *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679 i *Lactobacillus fermentum* CTC1693), gènere predominant en els EFC i comunament present en la microbiota del TGI humà, que van presentar *in vitro* un major potencial tecnològic, funcional i de seguretat, per avaluar el seu potencial com a cultius iniciadors en un model d'EFC tradicional. Les dues soques de *L. casei/paracasei* (CTC1677 i CTC1678) i la soca *L. rhamnosus* CTC1679 van ser les que van presentar major potencial com a cultius iniciador en el model i, per tant, les seleccionades per ser assajades com a cultius iniciadors en fuet nutricionalment millorat i avaluar les seves característiques sensorials en el producte final. A més, també es va avaluar la viabilitat com a cultius iniciadors de 3 soques probiòtiques comercials (*L. plantarum* 299v, *L. rhamnosus* GG i *L. casei* Shirota) en el mateix tipus d'embotit. La soca potencialment probiòtica *L. rhamnosus* CTC1679 va ser la que va demostrar un major potencial com a cultiu iniciador en aquest tipus d'embotit, obtenint un producte sensorialment correcte i segur des del punt de vista de seguretat alimentària, tal i com va demostrar el posterior estudi d'inoculació tipus "challenge test", dut a terme amb aquesta soca potencialment probiòtica i els patògens *Listeria monocytogenes* i *Salmonella*.

Paral·lelament, es va avaluar la capacitat de colonització del TGI, emprant la línia cel·lular HT29, i la soca *L. rhamnosus* CTC1679 es va posicionar com la més prometedora per continuar els estudis en aquesta direcció, mitjançant un

estudi d'intervenció en humans que van consumir diàriament fuet que contenia aquesta soca com a cultiu iniciador. *L. rhamnosus* CTC1679 va ser recuperada viable en les femtes dels voluntaris durant la ingesta diària del fuet i al final del període de consum d'aquest, dins dels nivells recomanats per aconseguir una colonització temporal de l'intestí i exercir els efectes saludables, confirmant la capacitat de la mateixa per a sobreviure al pas pel TGI durant la ingesta de l'embotit.

Per tot això, com a conclusió general, es pot afirmar que a través de l'estratègia de reformulació plantejada (reducció de sal i de greix i addició del cultiu potencialment probiòtic *L. rhamnosus* CTC1679) s'ha obtingut un EFC de baixa acidesa amb gran potencial funcional, microbiològicament segur i amb les característiques sensorials adequades.

Abstract

Fermented meats play an important part in many diets and are very appreciated by the consumer. However, these products are an important source of fat and salt, associated to chronic cardiovascular diseases. Therefore, it is necessary to develop new strategies in the manufacture of fermented meats in order to innovate in this area to obtain healthier products.

With the objective to achieve functional, safe and with a satisfactory overall sensory quality fermented sausages, the possibility of incorporate potentially probiotic *Lactobacillus* strains as starter cultures in nutritionally enhanced (with reduced fat and salt content) low-acid fermented sausages was assessed. In a first study, lactic acid bacteria (LAB) isolated from infant faeces were characterized to ensure, given its origin, its implantation in the human gastrointestinal tract (GIT). A total of 109 LAB isolates were typified and identified by molecular methods (RAPD-PCR and DNA partial sequencing). Six *Lactobacillus* strains (*Lactobacillus casei/paracasei* CTC1677 and CTC1678, *Lactobacillus gasseri* CTC1700 and CTC1704, *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679 and *Lactobacillus fermentum* CTC1693), the most technologically relevant genus in fermented sausages and commonly present in the human GIT, which were showed the highest technological, functional and safe *in vitro* potential, were pre-selected for testing their potential as starter cultures in a model sausage assay. *L. casei/paracasei* strains (CTC1677 and CTC1678) and *L. rhamnosus* CTC1679 showed the highest potential as starter cultures in the model sausage, thus were further selected to assess their suitability as starter cultures during the manufacture of nutritionally enhanced *fuet* and their effect on the sensory properties of the final product. Moreover, the suitability of 3 commercial probiotic strains (*L. plantarum* 299v, *L. rhamnosus* GG and *L. casei* Shirota) was also assessed in the same type of product. According to the results, the potential probiotic *L. rhamnosus* CTC1679 was the most suitable *Lactobacillus* strain to be used as starter culture in this kind of fermented sausage, producing a final product with adequate sensory properties and safe from the food safety point of view, as it was proved after a challenge test study with this potential probiotic strain and the pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella*.

Simultaneously, the ability to colonize the GIT was studied by using the human intestinal cellular line HT29. *L. rhamnosus* CTC1679 was the most promising strain for further studies in this way, and therefore a human intervention study consisting of healthy volunteers who consumed *fuet* containing

this strain daily was carried out. *L. rhamnosus* CTC1679 was successfully recovered from the volunteers' faeces during and at the end of the ingestion period at the recommended levels to reach a temporary colonization of the gut and to exert health benefits, confirming the capability of this potential probiotic strain to survive and persist through the GIT during the ingestion of the sausage.

Thus, it can be concluded that the proposed strategy focused on reformulation (reduced fat and salt content and the addition of *L. rhamnosus* CTC1679 as potential probiotic culture), resulted on a low-acid fermented sausage with a high functional potential, microbiologically safe and with adequate sensory characteristics.

1. JUSTIFICACIÓN

1. Justificación

La innovación tecnológica se considera actualmente la principal fuerza motriz del crecimiento económico en los países de economía avanzada. Este esfuerzo innovador se traduce en capacidad de transformar nuevas ideas y nuevos conocimientos en bienes o servicios (nuevos productos) avanzados y de calidad, que alcanzan altas cuotas de mercado, y dan lugar a mayores beneficios para las empresas (Sosvilla, 2010). Por otro lado, la combinación entre desarrollo tecnológico y preocupación por la relación dieta-salud ha propiciado el interés por los alimentos funcionales como promotores de la salud del consumidor. La industria alimentaria, tanto como demandante de materias primas del sector agrario como generadora de empleo y de valor añadido, tiene un peso considerable en el contexto de la industria española. Durante el año 2012, el gasto por persona en alimentos y bebidas para consumo en el hogar fue de 1.468 euros (MERCASA, 2013). Dentro del conjunto de la industria alimentaria, el sector cárnico constituye un sector de primera magnitud que se está adaptando a las nuevas tendencias y demandas del consumidor dentro de la actual y dinámica complejidad del mercado.

Microorganismos probióticos en productos cárnicos. Estrategias para la obtención de productos más saludables

La demanda actual del consumidor europeo se orienta hacia productos que ofrecen beneficios en materia de salud: el interés de los probióticos surgió a raíz de este concepto. Las bacterias del ácido láctico (BAL), por su clasificación como microorganismos seguros, *Generally Recognized as Safe* (GRAS) (FDA, 1997) y *Qualified Presumption of Safety* (QPS) (EFSA, 2007) y por su importancia numérica en el tracto gastrointestinal (TGI), han sido descritas en los últimos años como excelentes candidatas para su uso como probióticos. El mercado de los productos probióticos está dominado, básicamente, por una amplia gama de productos lácteos. Por lo tanto, es interesante el desarrollo y la incorporación de nuevos tipos de alimentos para incrementar así la oferta de productos probióticos en el mercado.

Los embutidos fermentado-curados (EFC) abarcan una gran variedad de productos regionales y tradicionales muy apreciados por el consumidor (Conter *et al.*, 2008). Aunque la aplicación comercial de microorganismos probióticos en embutidos fermentados es poco común, éstos podrían ser aptos como vehículo de probióticos (Arihara, 2006; Ammor y Mayo, 2007). Además, se ha observado que la matriz cárnica protege la supervivencia de los probióticos a través del tracto gastrointestinal (Klingberg y Budde, 2006). Es fundamental que los

microorganismos seleccionados para su uso como probióticos se adapten a las condiciones ecológicas de los EFC, sean capaces de competir con la microbiota endógena y alcancen niveles suficientes en el producto final para poder ingresar viables en su momento de consumo y promover así efectos beneficiosos sobre la salud del consumidor (De Vuyst *et al.*, 2008). La dosis efectiva de ingestión diaria de microorganismos probióticos para promover efectos beneficiosos sobre la salud humana no se conoce con exactitud y varía según los estudios y estándares (Rouhi *et al.*, 2013), aceptándose valores mínimos necesarios entre 10^8 - 10^{10} microorganismos (Champagne *et al.*, 2011).

Desde un punto de vista nutricional, la idoneidad de los productos cárnicos fermentados como vehículo de microorganismos probióticos pasa por poderlos integrar en una dieta variada y equilibrada, sin que su consumo represente un aporte excesivo de grasas y calorías, en línea con los objetivos de la Estrategia NAOS (Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y prevención de la Obesidad), establecida por el Ministerio de Sanidad y consumo (AESAN, 2005) a partir de las recomendaciones de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) / Organización Mundial de la Salud (OMS) (FAO/OMS) (2003). Con la implantación de la Estrategia NAOS se abre un gran reto para la industria alimentaria española emplazada a desarrollar productos que contribuyan a una alimentación más sana y equilibrada.

En este sentido, los productos cárnicos fermentados “probióticos” podrían formularse con menos sal y grasa, lo que mejoraría cualitativamente las características nutricionales de este tipo de producto con alegaciones funcionales. El sodio es un ingrediente esencial, el cual es añadido en la dieta humana mayoritariamente en forma de cloruro de sodio (NaCl), comúnmente llamado sal. En los últimos años, diversos estudios han evidenciado la relación entre el consumo de sal y la incidencia de la hipertensión (Karppanen y Mervaalaa, 2006; Doyle y Glass, 2010; Newson *et al.*, 2013). El sodio es aportado a la dieta, principalmente, a través del consumo de productos alimentarios transformados y, en el hogar, durante la cocción y en el momento de consumo (Mattes y Donnelly, 1991). La carne y los derivados cárnicos, como p.e. los productos cárnicos fermentado-curados, constituyen una fuente importante de grasa, concretamente de ácidos grasos saturados y colesterol (Valsta *et al.*, 2005), responsables del desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (obesidad, diabetes *mellitus*, enfermedades cardiovasculares (ECV) y algunos tipos de cáncer) (FAO/OMS, 2003).

1. Justificación

Así, basándose en todas estas consideraciones expuestas, la FAO/OMS (2003) recomienda restringir el consumo diario de sal a menos de 5 g/día (ingesta diaria de sodio no superior a 2 g) y que la energía proveniente de las grasas en un régimen alimentario sano no exceda el 30%. Respecto a la sal, en el marco europeo (CE, 2009) se están implementando iniciativas para lograr las recomendaciones de la OMS, proponiendo la reducción de un 16 %. En España, el Ministerio de Sanidad y Política Social presentó un plan de acción durante el periodo 2010-2014 (AESAN, 2009) para disminuir el consumo de sal entre la población española que incluyó medidas como la reducción del contenido de sal en alimentos elaborados, entre ellos los productos cárnicos.

Desde este contexto se planteó, en el marco del proyecto INIA (RTA2009-00045-00-00), adecuado a las prioridades temáticas del Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias, la posibilidad de utilizar un EFC de baja acidez tipo fuet, nutricionalmente mejorado (reducido en sal y grasa), microbiológicamente seguro y sensorialmente aceptable, como producto vehiculador de microorganismos potencialmente probióticos. Para tal finalidad, en la presente Tesis, se plantearon una serie de objetivos encadenados en una secuencia lógica, que consistió en: aislar cepas de BAL de origen humano (de heces de lactantes sanos), por considerarse una de las mejores estrategias de selección de cepas potencialmente probióticas (Saarela *et al.*, 2000; FAO/OMS, 2002), caracterizarlas *in vitro* (caracterización tecnológica, funcional y de seguridad) e *in situ* (en un modelo de EFC y en fuet), así como evaluar la capacidad de supervivencia en el TGI mediante un estudio preliminar de intervención en humanos con la cepa más prometedora, propiedad indispensable para su posible uso futuro como cepa potencialmente probiótica en EFC.

2. INTRODUCCIÓN

1. Importancia de la carne en la dieta

A lo largo de la historia, el consumo de carne ha tenido importantes repercusiones nutricionales y culturales (Carbajal, 2004). El consumo de carnes y elaborados cárnicos es el más importante en la cesta de la compra del consumidor español, como lo demuestra el hecho de que de los 67.634 millones de euros que alcanzó el gasto alimentario en el hogar en España en 2012, un 22,7% correspondió a las carnes y derivados, muy por encima de los otros sectores principales de productos que conforman la cesta de la compra del consumidor español, como son las frutas y hortalizas frescas y transformadas (16,9%), los productos de la pesca (13,1%) o las leches y derivados lácteos (12,2%) (ANICE, 2013). El consumo medio de carne y derivados en España durante el período 2009-2010, según los datos aportados por la Encuesta Nacional de Ingesta Dietética Española (AESAN, 2011), fue de 164 g/persona/día en una dieta estimada de 2.482 kcal/persona/día, aportando proteínas y grasas que superan los valores recomendados para el perfil calórico. La carne y los derivados cárnicos constituyen una fuente importante de proteínas (20-25%), de determinadas vitaminas, y algunos minerales. Sin embargo, desde el punto de vista nutricional, una ingesta excesiva de estos productos no es recomendable por su contenido significativo de grasas saturadas y sodio (Muguerza *et al.*, 2004). El elevado consumo de grasas saturadas y colesterol está relacionado con el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (ECV, obesidad, hipercolesterolemia, diabetes *mellitus* y ciertos tipos de cáncer (p.e. de colon)) (FAO/OMS, 2003). Por ello, la FAO/OMS (2003) recomiendan que las grasas deberían representar entre el 15 y el 30% de la ingesta energética diaria total, y las grasas saturadas deberían constituir menos del 10% de ese total.

Por lo que respecta a la sal, numerosos estudios han demostrado una correlación significativa entre las dietas con un alto contenido en sodio, ingerido en la dieta en forma de NaCl (sal común), de manera que por cada 2,5 g de sal se ingiere 1 g de sodio (Zurera-Cosano *et al.*, 2011), y la incidencia y/o prevalencia de la hipertensión arterial y, por lo tanto, su directa implicación con el riesgo de padecer ECV (Kannel, 1996; Law, 1997; Karppanen y Mervaala,

2006). De acuerdo con las recomendaciones de la FAO/OMS (2003), el consumo diario de sal no debería exceder de 5 g/día (2 g de sodio/día). Una de las propuestas de la Unión Europea (CE, 2009) para lograr esta recomendación de la OMS, es la reducción de un 16% en cuatro años (disminuyendo un 4% cada año), de esta forma los consumidores se adaptan al sabor salado reducido y se mantiene un progreso continuo. La mayoría de los estados miembros prefieren actuar sobre la reducción de sal en pan, productos cárnicos, quesos y comidas preparadas. En el caso de España, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), inició en 2009 un plan de reducción con unos objetivos concretos que permitieran pasar progresivamente de la ingesta actual de 9,7 g/día a una ingesta de 8,5 g/día en el año 2014 (AESAN, 2009).

Cabe destacar que según el Reglamento (CE) No 1924/2006 (CE, 2006) del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, un alimento podrá declararse reducido en sal y/o en grasa solamente si las reducciones en sal y grasa son de como mínimo una diferencia del 25% y 30%, respectivamente, en comparación con el producto homólogo.

2. Productos cárnicos fermentado-curados

Los productos cárnicos fermentado-curados se incluyen dentro del grupo de alimentos listos para el consumo (LPC), definidos por el Reglamento (CE) 2073/2005 como aquellos alimentos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos (CE, 2005). La estabilidad y el bajo riesgo sanitario de este tipo de productos se basan fundamentalmente en (Ordóñez y de la Hoz, 2001): (1) el descenso de los valores de pH por la fermentación microbiana de los hidratos de carbono; (2) la disminución de la actividad de agua (a_w) a causa de los solutos añadidos y de la deshidratación progresiva durante la maduración; (3) la adición de nitratos y nitritos, que contribuye a prevenir el crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes; (4) las especias, con cierta actividad antimicrobiana.

2. Introducción

Los productos cárnicos fermentado-curados se elaboran a partir de la carne fresca (pH 5,6-6,0) y no se tratan por calor, sino que se dejan madurar en cámaras de temperatura y humedad relativa (HR) controladas. Pueden ser piezas enteras, como el jamón serrano, pero también pueden presentarse en forma de carnes picadas embutidas en tripa natural o artificial (p.e. salchichón, chorizo, fuet).

2.1 Embutidos cárnicos picados fermentado-curados

Los embutidos picados fermentado-curados son productos elaborados con una mezcla de carne y grasa picadas (habitualmente de cerdo), sal, agentes de curado (nitrito y nitrato), azúcares, especias y aditivos autorizados (Ordóñez y de la Hoz, 2001). La sal actúa como primer obstáculo contra el crecimiento de microorganismos indeseables, provocando un descenso inmediato de la a_w hasta valores de 0,96-0,97 (Nychas y Arkoudelos, 1990). Además, el NaCl, añadido en un 2,2-3%, es un componente importante desde el punto de vista tecnológico, tanto como potenciador del sabor como por inducir la solubilización y difusión de las proteínas miofibrilares del músculo, favoreciendo la textura de gel (Lücke, 1998).

El nitrito, añadido directamente en forma de nitrito de sodio o proveniente de la reducción del nitrato potásico, actúa como agente antimicrobiano y contribuye a la formación del color típico del curado. El nitrito, al igual que el ascorbato, añadido en forma de ascorbato de sodio, actúa como antioxidante, inhibiendo los procesos auto-oxidativos que conducen a la rancidez del producto. El ascorbato, además, actúa de coadyuvante del proceso de curado, mejorando el color y el *flavor* del producto. Las especias (p.e la pimienta y el ajo) se utilizan como potenciadores del sabor y también tienen efectos antimicrobianos y antioxidantes.

La mezcla homogeneizada es embutida en tripas (naturales o artificiales) de diámetro variable según el tipo de embutido. La masa embutida se somete generalmente a un proceso de fermentación hasta el valor de pH deseado y posteriormente se realiza un proceso de maduración (fase de secado) hasta alcanzar un contenido de agua preestablecido, a la temperatura y HR más apropiadas (Arnau *et al.*, 2007).

2.2. Clasificación y fabricación de los embutidos fermentado-curados

La elaboración y la clasificación de estos embutidos varían de unos países a otros (Adams, 1986; Zeuthen, 1995). La clasificación propuesta por Roca e Incze (1990) considera el tiempo de fermentación y maduración del embutido como un criterio básico y establece dos tipos dentro de los EFC: de maduración corta y de maduración larga, con un contenido final de agua entorno al 30-40% y del 20-30%, respectivamente (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de embutidos fermentados (según Roca e Incze, 1990).

Tipo de embutido	Tiempo de producción	Contenido final de agua (%)	Valor final de a_w
Untable	3-5 días	34-42	0,95-0,96
Loncheable:			
maduración corta	1-4 semanas	30-40	0,92-0,94
maduración larga	12-14 semanas	20-30	0,85-0,86

Lücke (2003) propuso una clasificación desde un punto de vista microbiológico, basado en la a_w y en el tratamiento de superficie (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de embutidos fermentados (adaptado de Lücke, 2003).

Categoría	Tiempo maduración	a_w final	Aplicación de ahumado	Ejemplos
Embutido seco con moho	> 4 semanas	< 0,90	No	Salami (Italia) <i>Saucisson sec</i> (Francia)
Embutido seco con moho	> 4 semanas	< 0,90	Sí (durante la fermentación)	Salami (Hungría)
Embutido seco sin moho	> 4 semanas	< 0,90	Sí o No	<i>Dauerwurst</i> (Alemania)
Embutido semi-seco con moho	< 4 semanas	0,90-0,95	No	Embutidos fermentado-curados (España y Francia)
Embutido semi-seco con o sin moho	> 4 semanas	0,90-0,94	No	Salchichón (España)
Embutido semi-seco sin moho	< 4 semanas (10-20 días)	0,90-0,95	Sí (con excepciones)	Embutidos fermentado-curados (Alemania, Holanda, Escandinavia y EE.UU.)
Embutido fermentado fresco untable	< 2 semanas	0,94-0,97	Sí o No	Sobrasada (España) <i>Streichmettwurst</i> (Alemania)

2. Introducción

Otros criterios de clasificación se basan en la acidez, el grado de picado de los ingredientes, adición o no de cultivos iniciadores, adición de uno u otros ingredientes, especias y condimentos (Ordóñez y de la Hoz, 2001) o en la proporción humedad/proteína (Zeuthen, 1995). Todos estos factores, influyen decisivamente en las características generales de los productos, por lo que serían parámetros de clasificación válidos ya que implican diversas tecnologías de fabricación. Con respecto a su acidez se han clasificado en:

- Embutidos fermentado-curados de baja acidez, productos típicos de los países europeos del área mediterránea. El proceso de fabricación de estos embutidos de baja acidez prescinde de la etapa de fermentación, realizándose una sola etapa de maduración a baja temperatura (<10-12 °C) con el fin de evitar una intensa y rápida acidificación (Sanz *et al.*, 1998). Son productos con un pH final entre 5,3-6,2 (Aymerich *et al.*, 2006), como p.e. el fuet. El fuet es un embutido de pequeño calibre (<40 mm) típico de Cataluña, muy apreciado por sus características organolépticas.

- Embutidos fermentado-curados ácidos (pH final < 5,3), típicos de los países del norte de Europa y de EE.UU, con la diferencia que los primeros se someten a una temperatura de fermentación media (20-24°C), mientras que en los segundos se utilizan temperaturas cercanas a 37°C (Ordóñez y de la Hoz, 2001).

2.3 Microbiota de los embutidos fermentado-curados

La microbiota típica de los EFC está constituida preferentemente por BAL y cocos gram-positivos catalasa-positivos (CGC+) (Aymerich *et al.*, 2003). Esta microbiota es, en general, capaz de generar por sí sola una correcta fermentación, pues la adición de sal (con la consecuente disminución de la a_w) y azúcares (como sustrato energético) favorecen selectivamente su desarrollo. En el ámbito de la elaboración industrial de EFC es habitual el uso de cultivos iniciadores, que proporcionan a la masa cárnica inicial una elevada carga microbiana beneficiosa que presumiblemente dominará sobre la microbiota endógena, permitiendo que la fermentación se lleve a cabo de una manera más controlada, estandarizando así la calidad del proceso y reduciendo tanto el tiempo de maduración como el peligro de que se produzcan deficiencias de origen microbiano (Cocconcelli, 2007).

2.3.1 Bacterias del ácido láctico (BAL)

Las BAL constituyen la microbiota mayoritaria de los EFC, con recuentos finales superiores a 10^7 UFC/g (Erkkilä *et al.*, 2001b; Benito *et al.*, 2007). *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus plantarum* son las especies mayoritarias en embutidos ácidos (Hammes *et al.*, 1990; Hugas *et al.*, 1993), siendo *L. sakei* la predominante en EFC de baja acidez (Aymerich *et al.*, 2003). Las BAL son microorganismos fermentativos que pueden seguir dos rutas metabólicas para hidrolizar los hidratos de carbono: homofermentativa y heterofermentativa. La primera es la que, prácticamente de manera exclusiva, produce ácido láctico, responsable del descenso de pH durante la fermentación que implica diversos efectos beneficiosos, tales como (Geisen *et al.*, 1992; Hugas y Monfort, 1997):

- Inhibición del crecimiento de microorganismos causantes de alteraciones y patógenos, facilitando la conservación.
- Desnaturalización de las proteínas, permitiendo: i) la coagulación proteica a un pH próximo al punto isoeléctrico de las proteínas cárnicas y, consecuentemente, el desarrollo de la textura y cohesión características de este tipo de producto; ii) la reducción de la capacidad de retención de agua por parte de las proteínas cárnicas, hecho que acelera el proceso de secado.
- Inducción de las reacciones de reducción de nitratos y nitritos a óxido nítrico, aportando el color deseado de producto curado.
- Modulación de las reacciones enzimáticas que contribuyen al desarrollo del aroma y *flavor*.

2.3.2 Cocos Gram-positivos Catalasa-positivos (CGC+)

Simultáneamente al crecimiento de las BAL, se observa el desarrollo de otro grupo microbiano importante: los CGC+, siendo los más predominantes los estafilococos coagulasa-negativos y, concretamente, *Staphylococcus xylosus* (Martín *et al.*, 2006). Los recuentos de estos microorganismos pueden alcanzar niveles de entre 10^5 - 10^8 UFC/g (Aymerich *et al.*, 2003). La propiedad tecnológica más importante de los CGC+ es la actividad nitrato y nitrito reductasa, que promueve: i) el desarrollo del color de curado (Liepe, 1983); ii) la actividad

2. Introducción

catalasa, evitando la oxidación lipídica y de pigmentos y, previniendo así, la rancidez y defectos organolépticos en el producto final (Barrière *et al.*, 1998); iii) la actividad proteolítica y lipolítica, que contribuyen al desarrollo de las propiedades organolépticas características de este tipo de producto (Johansson *et al.*, 1994; Montel *et al.*, 1998).

3. Seguridad alimentaria en productos listos para el consumo

La carne fresca, debido a sus características físico-químicas (pH ca. 7 y $a_w > 0,97$) y a su elevado contenido en nutrientes, representa un excelente sustrato para el crecimiento de la mayoría de microorganismos. Después de periodos de almacenaje de carne fresca en refrigeración en condiciones aeróbicas, la mayoría de la microbiota presente consiste en microorganismos psicrótrofos gram-negativos de los géneros *Pseudomonas* y *Enterobacteriaceae*, mientras que los microorganismos gram-positivos, incluidas las BAL, se encuentran a niveles más bajos (Gill, 1982; Lücke, 1998). Las principales fuentes de contaminación de la carne durante el procesado de la canal son la superficie externa y el tracto digestivo del animal sacrificado (Garriga y Aymerich, 2007). La microbiota contaminante incluye microorganismos tecnológicamente importantes pero también microorganismos deteriorantes y patógenos (Garriga y Aymerich, 2007), siendo *L. monocytogenes* y *Salmonella* los más relacionados con brotes de enfermedades transmitidas por el consumo de productos LPC (Moore, 2004). Los instrumentos, equipos y superficies empleados durante la evisceración de la canal y la manipulación de los operarios también pueden producir contaminaciones cruzadas (Garriga y Aymerich, 2007; Jaroni *et al.*, 2011). Talon *et al.* (2007) investigaron los ecosistemas microbianos en 54 unidades de procesado de EFC tradicionales y reportaron la contaminación con *Salmonella* y *L. monocytogenes* en el 4,8 y 6,7%, respectivamente, de las muestras de los equipos analizados. Una amenaza importante para los procesadores de alimentos es la capacidad de *L. monocytogenes* para formar biofilms, ya que una vez formado es muy difícil de erradicar (Jaroni *et al.*, 2011).

La protección de la salud pública es un tema prioritario a nivel global. En la Unión Europea, los requerimientos generales de seguridad alimentaria están

establecidos en el Reglamento (CE) No 2073/2005 (CE, 2005), relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimentarios, en el cual los productos que no cumplan con dichos criterios no podrán ser comercializados. Para *L. monocytogenes*, los límites establecidos para “alimentos LPC que no pueden favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes*, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales” son ≤ 100 UFC/g durante la vida útil. Para *Salmonella*, “los productos cárnicos destinados a ser consumidos crudos, excluidos los productos en los que el proceso de fabricación o la composición del producto elimine el riesgo de *Salmonella*”, se requiere ausencia en 25 g durante la vida útil.

La fermentación es un método de conservación que aumenta la estabilidad y la seguridad microbiológica como consecuencia de diferentes obstáculos que tienen lugar durante la maduración de los EFC, principalmente la reducción de la a_w y del pH. Sin embargo, en los EFC de baja acidez, con una reducción del pH moderada, se pierde una de las barreras de seguridad respecto a los embutidos más ácidos: la acidez, permitiendo así la supervivencia de patógenos como *Salmonella* y *L. monocytogenes* (Moore, 2004).

3.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria es un género formado por bacilos gram-positivos, no esporulados, anaerobios facultativos y móviles por medio de flagelos. Se han identificado seis especies, entre las que *L. monocytogenes* es la principal causante de infecciones en los humanos y, dentro de esta especie, las cepas hemolíticas. Entre los 13 serotipos identificados, 1/2a, 1/2b y 4b son los más importantes desde el punto de vista epidemiológico (Rocourt y Buchrieser, 2007). La temperatura óptima de crecimiento de *Listeria* se encuentra alrededor de 30-37°C, aunque puede crecer y sobrevivir en un rango de temperaturas de -0,4 a 45°C (ICMSF, 1996). El límite de crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos con pH neutro y un elevado contenido en nutrientes, se establece en 0°C (Walker *et al.*, 1990). Los valores limitantes de a_w dependen del ambiente; en productos cárnicos, se ha descrito el límite de crecimiento entorno a 0,93 (ICMSF, 1996). En EE.UU., una directiva del *Food Safety and Inspection Service* (FSIS, 2002) fijó como límite de crecimiento de *L. monocytogenes* en alimentos

2. Introducción

valores de: $pH < 4,5$, $pH < 5,0$ con refrigeración, $a_w < 0,90$, $a_w < 0,92$ con refrigeración, o $a_w < 0,95$ y $pH < 5,5$. A nivel europeo, el Reglamento (CE) 2073/2005 ha establecido que los alimentos con $pH \leq 4,4$ o $a_w \leq 0,92$, o alimentos con $pH \leq 5,0$ y $a_w \leq 0,94$, no pueden favorecer el crecimiento del patógeno (CE, 2005). La enfermedad causada por *L. monocytogenes*, la listeriosis, es responsable de infecciones oportunistas y, aunque no es frecuente, tiene una elevada tasa de mortalidad en la población de riesgo, que incluye: individuos con el sistema inmunológico alterado, mujeres embarazadas, bebés y ancianos. La gravedad de los síntomas es variable, pudiendo ir desde un cuadro leve, parecido a una gripe, hasta una sepsis grave en el caso de la población de riesgo. La dosis infectiva de *L. monocytogenes* no es bien conocida. No obstante, parece ser superior a las 100 células, aunque puede variar según la cepa y la susceptibilidad del paciente (NACMCF, 1991). El tiempo de incubación puede ser extremadamente variable, de 3 a 70 días (Forsythe, 2010). Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), en el 2012 se confirmaron en Europa 1.642 casos de listeriosis en humanos, con una tasa de mortalidad ca. 18% (mayor número de casos mortales reportados desde el 2006) (EFSA, 2014). Los productos cárnicos y de pescado LPC fueron las fuentes más significativas que presentaron niveles del patógeno que excedían del límite legal (100 UFC/g) (EFSA, 2014).

3.2 *Salmonella*

Salmonella, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, es una bacteria gram-negativa, anaerobia facultativa, no esporulada, de forma bacilar y que puede fermentar la glucosa con producción de ácido y gas. El género *Salmonella* se divide en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. En Europa, los serotipos más comunes involucrados en brotes de salmonelosis son *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, siendo las causantes de un 41,3 y 22,1%, respectivamente, del total de casos de salmonelosis (91.034 casos confirmados) reportados en Europa durante el 2012 (EFSA, 2014). Los casos humanos de *S. Enteritidis* han sido asociados al consumo de huevos contaminados y carne de ave, mientras que los de *S. Typhimurium* se han asociado al consumo de carne de cerdo o de bovino (EFSA, 2014).

Salmonella es capaz de multiplicarse en un amplio rango de temperaturas (5-46°C) y pH (3,8-9,5). La a_w afecta de manera significativa al crecimiento del patógeno, siendo el valor óptimo de crecimiento ca. 0,99, y valores inferiores a 0,94 inhiben su crecimiento.

Salmonella puede causar gastroenteritis, fiebre entérica y septicemia. La dosis infectiva puede variar desde 20 hasta 10^6 células según el serotipo, alimento y vulnerabilidad del huésped (edad y estado de salud) (Forsythe, 2010). Se han observado dosis infectivas muy bajas (inferiores a 100 células) en agua y alimentos grasos o con capacidad tamponadora (ICMSF, 1996). El periodo de incubación se encuentra entre las 16-72 horas y puede durar de 2 a 7 días.

3.3 Incidencia de *L. monocytogenes* y *Salmonella* en EFC

Los EFC, gracias a sus características físico-químicas (a_w y pH), son considerados alimentos microbiológicamente estables. Sin embargo, varios estudios han reportado el crecimiento y supervivencia de *L. monocytogenes* y *Salmonella* durante la maduración y en el producto acabado (Glass y Doy, 1989; Ihnot *et al.* 1998; Encinas *et al.*, 1999; Barbuti y Parolari, 2002; Aymerich *et al.*, 2003; Hajmeer *et al.*, 2006; Nightingale *et al.*, 2006), habiéndose descrito algunos brotes asociados al consumo de este tipo de productos (Moore 2004).

Los límites de crecimiento de los patógenos y los parámetros físico-químicos pueden ser ensayados y ajustados a valores específicos para fines generales, pero los microorganismos pueden responder diferente en los alimentos debido a las interacciones que tienen lugar entre los parámetros físico-químicos y la composición de la matriz (Brocklehurst, 2004), y al efecto protector de ciertos componentes del alimento. Por lo tanto, para predecir el comportamiento de un microorganismo patógeno en un alimento, especialmente cuando su procesado incluye nuevas tecnologías o cambios en la formulación, resulta indispensable la investigación mediante estudios de inoculación tipo *challenge test* como paso previo a su comercialización.

4. Alimentos funcionales

El concepto de "alimento funcional" surgió por primera vez en Japón a mediados de la década de los 80. Debido al incremento de los costes en la atención

2. Introducción

sanitaria y con el objetivo de mejorar la salud pública, el Ministerio de Salud y Bienestar del Japón lanzó en 1991 la reglamentación para los “Alimentos para uso específico de salud” (*Foods for specified health use* o FOSHU). El interés por los alimentos funcionales en Europa y EE.UU. es más reciente y ha ido popularizándose y extendiéndose debido a la creciente preocupación de la sociedad actual por el mantenimiento de un buen estado de salud a través de la alimentación. En Europa, se redactó un documento de consenso sobre conceptos científicos en relación con los alimentos funcionales elaborado por un comité de expertos de la *Functional Food Science Europe* (FUFOSE), bajo el liderazgo del *International Life Sciences Institute* (ILSI) (Diplock *et al.*, 1999), que define un alimento funcional como aquél que está suficientemente demostrado que actúa beneficiosamente sobre una o más funciones del organismo, más allá de su efecto nutricional, mejorando la salud y el bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedad. Según el ILSI (2002), un alimento funcional puede ser: i) un alimento natural; ii) un alimento al que se ha añadido, eliminado o modificado un componente por medios biotecnológicos; iii) un alimento en el que se ha modificado la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes; o iv) una combinación de cualquiera de estas posibilidades. Así, un alimento es considerado funcional porque, además de destacar por sus propiedades nutritivas, contiene ciertos elementos cuyo consumo diario dentro de una dieta equilibrada contribuye a mantener o mejorar el estado de salud y bienestar.

Según el ILSI (2002) son varias las funciones fisiológicas que podrían verse beneficiadas por el aporte de alimentos funcionales en la dieta: el desarrollo y crecimiento óptimos, la regulación del metabolismo o utilización de nutrientes, la función antioxidante, la disminución del riesgo cardiovascular, el mantenimiento de la función y la fisiología del TGI, la mejora de las funciones cognitivas y mentales y el rendimiento y mejora del estado físico.

4.1 Estrategias para la obtención de productos cárnicos más saludables

La investigación y la industria cárnica han ido evolucionando para satisfacer las demandas actuales del mercado, diseñando varias posibilidades para modificar la composición de la carne y sus derivados con el fin de desarrollar productos

cárnicos más saludables y potencialmente funcionales. Las estrategias tecnológicas empleadas para modificar la composición de los productos cárnicos se basan, fundamentalmente, en procesos de reformulación (reducción y/o eliminación de componentes perjudiciales para la salud y/o incorporación de otros que mejoran el carácter funcional), conservando una óptima calidad sensorial. La reformulación permite actuar de forma rápida y directa para obtener productos cárnicos más saludables, promoviendo su carácter funcional. Atendiendo a las premisas recogidas en el documento del ILSI (2002) y según Sánchez-Muniz (2004), las condiciones que debería cumplir un producto cárnico para ser considerado funcional son:

1. Mejorar la dieta y la salud.
2. Sus beneficios nutricionales o los de sus ingredientes específicos deben fundamentarse sobre una base científica sólida.
3. La ingesta diaria apropiada debe estar establecida por expertos.
4. No debe resultar nocivo si se ingiere por encima de la ingesta aconsejada.
5. El componente funcional que tenga debe estar caracterizado por sus propiedades físicas y químicas valoradas a través de métodos analíticos detallados y por su presencia cualitativa y cuantitativa en el producto.
6. No debe reducir el valor nutritivo respecto al producto convencional.
7. El alimento debe ser administrado de manera convencional, nunca en forma de tabletas, cápsulas o polvos.
8. El ingrediente funcional debe ser un producto natural.

La funcionalidad de un ingrediente depende de muchos factores, tales como la estabilidad del ingrediente, la formulación del alimento, el sometimiento a procesos tecnológicos como encapsulación, calor, fermentación o secado (Arvanitoyannis y van Houwelingen-Koukaliaroglou, 2005).

La presente Tesis se centrará en la reducción de sal y de grasa y en la incorporación de probióticos potenciales para la obtención de un EFC de baja acidez con propiedades nutricionales más saludables.

4.1.1 Reducción de sal en embutidos fermentado-curados

Entre las distintas categorías de alimentos identificadas que contribuyen en mayor medida a la ingesta de sal en la dieta, se encuentran los productos cárnicos curados, con cantidades destacables (jamón serrano, 4,5%; salchichón, 2,9%; fuet, 3,7%; chorizo, 3,3%), aportando un 17,08% de la cantidad de sodio de la dieta (AESAN, 2009). Los EFC son un tipo de producto cárnico muy apreciado por el consumidor y con propiedades sensoriales estrechamente relacionadas con la duración y las condiciones de procesado. La adición de NaCl en estos productos juega un papel importante en el desarrollo de sus características sensoriales, aportándoles un sabor característico (Ruusunen y Puolanne, 2005). El NaCl está involucrado en la solubilización de las proteínas miofibrilares debido al aumento de la fuerza iónica, contribuyendo a la gelificación y ligazón de las partículas que componen el embutido e influyendo en la textura del producto final (Ruusunen y Puolanne, 2005). En este sentido, uno de los principales problemas asociados con la reducción parcial o completa del NaCl está relacionado con los cambios en la ligación de las proteínas y, por lo tanto, en la textura (Arnau *et al.*, 2011). La sal también condiciona las reacciones bioquímicas y enzimáticas (proteólisis, lipólisis y oxidación lipídica) que discurren durante la maduración de los EFC, afectando al aroma del producto final (Toldrá *et al.*, 1997). Cabe destacar también su efecto conservador debido, principalmente, a su habilidad para disminuir la a_w , reduciendo así el agua disponible para los microorganismos (Sofos, 1983; Wirth, 1989). Este hecho puede provocar una pérdida de fluidos de la célula y, por estrés osmótico, comportar la plasmólisis y, consecuentemente, la muerte celular. En el caso en que la disminución de la a_w permita la supervivencia de los microorganismos, se suele alargar la fase de latencia y disminuir la tasa de crecimiento exponencial y, de esta forma, la carga microbiana total en el alimento. En este caso la sal sólo provoca una alteración de las actividades metabólicas: en la síntesis de enzimas o interfiriendo en la propia actividad enzimática (Shelef y Seiter, 1993; Ravishankar y Juneja, 2000).

Así, unas propiedades funcionales que convierten el NaCl en un ingrediente esencial en el procesado de productos cárnicos evidencian la necesidad de

valorar distintas soluciones a nivel de los procesos de selección de la materia prima y de sistemas de transformación (en la formulación y el procesado) para poder elaborar productos cárnicos reducidos en sal, pero que mantengan la calidad sensorial e higiénico-sanitaria de su homólogo con contenido “normal” de sal y, a la vez, ser viable económica y tecnológicamente. Además, cabe destacar que los consumidores muestran una actitud positiva hacia la reducción de sodio en los productos cárnicos (Guàrdia *et al.*, 2006).

Según Ruusunen *et al.* (2005) existen diferentes opciones para reducir el contenido de NaCl en productos cárnicos procesados: (1) la sustitución (total o parcial) por otras sales cloradas (KCl, CaCl₂ y MgCl₂); (2) la sustitución con sales no cloradas, (fosfatos, lactato, ascorbato, etc.); (3) el uso de nuevas tecnologías o modificación del procesado; (4) combinaciones de todas las anteriores.

En estudios previos se ha demostrado que la reducción de sodio en productos cárnicos es posible desde el punto de vista tecnológico y sensorial (Askar *et al.*, 1993; Gou *et al.*, 1996; Gelabert *et al.*, 2003; Guàrdia *et al.*, 2006, 2008; Corral *et al.*, 2013).

El KCl es el sustituto de NaCl más utilizado en EFC (Desmond, 2006; Zurera-Cosano *et al.* 2011). Además, en lo que respecta a la estabilidad microbiológica, se ha observado que el KCl puede tener un efecto antimicrobiano similar al NaCl a molalidad equivalente sobre patógenos como *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Boziaris *et al.*, 2007; Bidlas y Lambert, 2008). Se ha descrito que se puede sustituir el 35-50% de NaCl con KCl en productos cárnicos sin pérdida de funcionalidad, aunque niveles por encima del 50% pueden producir sabores amargos o metálicos (Askar *et al.*, 1993; Collins, 1997). En salchichón, según resultados de Gou *et al.* (1996) y Gelabert *et al.* (2003), a partir del 40% de sustitución del NaCl por KCl se observó un aumento del gusto amargo. Posteriormente, Guàrdia *et al.* (2008), observaron el efecto de la reducción al 50% del contenido de NaCl en fuets y su sustitución parcial con KCl y lactato potásico, utilizando diferentes relaciones molares (del 0 al 50% de sustitución, con sólo un sustituto o en combinación de los dos), sobre los atributos sensoriales y grado de aceptación del producto final. Los resultados mostraron que en la sustitución molar de hasta el 50% con KCl, la intensidad del color era similar a la del control (100% NaCl). Por lo que respecta a los atributos

2. Introducción

de gusto y *flavor*, observaron una mayor percepción del gusto amargo en comparación con el control, tanto en los fueets donde se aplicó una sustitución parcial con KCl como en los que se aplicó lactato potásico. Por lo que respecta a los atributos de textura, el KCl como único sustituto (50%) no afectó a la cohesividad, la pastosidad y la fluidez de la grasa. Respecto al grado de aceptación del producto final, los lotes que presentaron una mayor aceptabilidad fueron los que contenían mayor cantidad de KCl (KCl como único sustituto (50%) y combinación KCl (40%)/lactato potásico (10%).

La mezcla de sales de cloro (KCl, CaCl₂ y MgCl₂) fue otra alternativa llevada a cabo por otros autores para reducir el contenido en NaCl en EFC. Gimeno *et al.* (1998) y Zanardi *et al.* (2010), estudiaron la reducción del 50% de contenido en NaCl, obteniendo productos finales que presentaron una ligera disminución del gusto salado y de la intensidad de color en comparación con el control (100% NaCl). Armenteros *et al.* (2009) elaboraron embutidos con una reducción del 45% del contenido de NaCl y obtuvieron productos aceptables con características sensoriales similares al control (100% NaCl).

4.1.2 Reducción de grasa en embutidos fermentado-curados

El desarrollo de alimentos con bajo contenido en grasa constituye uno de los retos principales de la industria alimentaria. Durante los últimos años, el consumo de carne y productos cárnicos con elevado contenido en grasa ha sido relacionado con diversas enfermedades crónicas debidas a la cantidad y calidad de la grasa de los mismos y, en consecuencia, han tenido lugar campañas publicitarias y sanitarias dirigidas a disminuir una ingesta abusiva. Por este motivo, con el fin de satisfacer las necesidades del consumidor actual y ofrecer productos cárnicos con mejores características nutritivas, se han llevado a cabo numerosas investigaciones encaminadas a la reducción de su contenido graso (Muguerza *et al.*, 2004; Weiss *et al.*, 2010; Mora-Gallego *et al.*, 2013). No obstante, se considera que el contenido en grasa de un producto cárnico es uno de los factores determinantes de sus características sensoriales. El nivel de grasa condiciona la apariencia visual, la textura y el aroma y el sabor de los alimentos (Akoh, 1998) no sólo por el sabor y aroma característicos aportados por la grasa, sino también por el efecto modulador que ésta tiene sobre la

liberación (intensidad y duración) de aromas y sabores presentes en la matriz del alimento (Lucca y Tepper, 1994). La reducción de grasa, por lo tanto, podría conllevar una serie de inconvenientes sobre las características sensoriales de algunos productos cárnicos. Los EFC son productos cárnicos con una proporción de grasa que puede llegar al 50% (Jiménez-Colmenero, 2000). Este elevado contenido da una idea del papel fundamental de la grasa sobre las propiedades de este tipo de productos y las estrategias encaminadas a reducir este contenido podrían verse limitadas por las modificaciones asociadas sobre la apariencia, textura y sabor de los embutidos. Jiménez-Colmenero *et al.* (2001) llevaron a cabo una revisión sobre la obtención de carne y productos cárnicos más saludables, en la que resumen que el éxito del nuevo producto elaborado implica que éste debe poseer unas adecuadas propiedades tecnológicas, sensoriales y nutricionales, además de ser seguro y conveniente para el consumo. Para la obtención de EFC de reducido o bajo contenido graso, las principales estrategias encontradas en la bibliografía consisten fundamentalmente, por una parte, en la simple reducción de la proporción de grasa empleada en su formulación usando, por tanto, mayor porcentaje de carne magra (eliminación de grasa sin sustituto) y, por otra parte, en la reducción de grasa acompañada de la adición simultánea de otro u otros ingredientes no grasos distintos a la carne (reemplazantes de la grasa).

En relación al primer planteamiento, se han llevado a cabo diversos estudios en los que se ha evaluado el efecto del empleo de una menor proporción de grasa en la formulación de los EFC, contrastando las características analizadas de estos embutidos con las de un embutido control, con una cantidad de grasa normal o convencional. El objetivo común de estos estudios es, principalmente, conocer el límite de reducción del contenido en grasa que permite que los embutidos conserven una adecuada calidad tecnológica y sensorial.

Lorenzo y Franco (2012) analizaron las diferencias en la apariencia de embutidos con un contenido graso de 5, 10 y 20% y observaron como a medida que disminuyó este contenido, los embutidos perdieron luminosidad y se incrementó el color rojo. En el análisis sensorial, observaron que a medida que disminuyó el contenido graso aumentó significativamente la dureza y la gomosidad de los embutidos y disminuyó la jugosidad.

2. Introducción

Papadima y Bloukas (1999) y Olivares *et al.* (2010) analizaron las variaciones en la textura entre embutidos con contenidos en grasa de 10, 20 y 30%. Ambos estudios describen también un aumento de la dureza a medida que disminuyó el contenido graso. En el análisis sensorial, los primeros autores encontraron que los embutidos mejor valorados fueron los que tenían un contenido en grasa intermedio (20%) y los peor valorados fueron los embutidos de mayor contenido graso (30%). Sin embargo, en el análisis sensorial llevado a cabo por Olivares *et al.* (2010), los embutidos con mayor contenido graso fueron los mejor valorados y los de menor contenido graso los peores.

En otro estudio más reciente, Mora-Gallego *et al.* (2013), fabricaron EFC de baja acidez con un contenido en grasa inferior a 12,5% (reducción del 70% en comparación con el producto homólogo) que presentaron propiedades sensoriales satisfactorias.

En segundo lugar, con la finalidad de paliar las consecuencias negativas derivadas de la reducción o eliminación del contenido en grasa en los EFC, se han llevado a cabo estudios en los que esta eliminación, total o parcial, de grasa se acompaña con la adición de otros ingredientes no grasos. Mendoza *et al.* (2001) elaboraron embutidos bajos en grasa (con un contenido en grasa del 6,3, 12 y 25%) a los que adicionaron distintas proporciones (6, 7, 10 y 11,5%) de inulina, previamente hidratada, con el fin de evaluar sus efectos sobre las características sensoriales y textura de los mismos. La adición de inulina no corrigió la disminución de la intensidad de color originado por la reducción de grasa cuando se añadió en pequeñas cantidades (6-7%), pero sí lo hizo en mayores concentraciones (10-11,5%). Además la adición de 11,5% de inulina presentó mejores puntuaciones en el análisis sensorial en comparación con el control (embutido reducido en grasa pero sin inulina), pero menores que el producto control con elevado contenido de grasa.

En otro estudio, Yalinkiliç *et al.* (2012) combinaron la utilización de diferentes proporciones de grasa (10, 15 y 20%) con la adición de diferentes cantidades de fibra de naranja (0, 2 y 4%) en la elaboración de un embutido turco y observaron como la utilización de fibra de naranja aumentaba la luminosidad de los embutidos, corrigiendo así la pérdida de color que tiene lugar al reducir el contenido graso.

Muguerza *et al.* (2001) y Mora-Gallego *et al.* (2013 y 2014) han estudiado el uso de aceite de oliva y de aceite de girasol como sustitutos de la grasa en chorizo de Pamplona y fuet, respectivamente, obteniendo productos aceptables desde el punto de vista sensorial.

4.1.3 Probióticos en alimentos

4.1.3.1 Definición y principales microorganismos utilizados como probióticos

De acuerdo con la definición de la FAO/OMS (2001), el criterio principal para considerar una cepa como probiótica es que, cuando se administre en la cantidad adecuada, confiera al huésped un beneficio para su salud. La mayoría de cepas empleadas como probióticos pertenecen a los grupos de BAL, principalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Tanto las BAL como *Bifidobacterium*, por su clasificación como microorganismos seguros, *Generally Recognized as Safe* (GRAS) (FDA, 1997) y *Qualified Presumption of Safety* (QPS) (EFSA, 2007), y por su importancia numérica en el TGI, han sido descritas en los últimos años como excelentes candidatas para su uso como probióticos.

Según Saxelin (2008), las principales especies microbianas utilizadas como probióticos en alimentos son las siguientes (Tabla 3):

Tabla 3. Principales especies microbianas usadas como probióticos en alimentos (Saxelin, 2008).

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	

4.1.3.2 Efectos beneficiosos de los probióticos en la salud humana

Los probióticos ejercen una acción benéfica sobre la salud del organismo huésped gracias al mantenimiento del equilibrio ecológico del tracto digestivo y a la inhibición de la colonización y del crecimiento de bacterias patógenas u oportunistas. El efecto saludable de los probióticos debe demostrarse a partir de evidencias científicas generadas con ensayos clínicos en humanos (FAO/OMS, 2002; Guarner *et al.*, 2010). El efecto beneficioso para la salud depende de la cepa administrada, de la dosis, de la forma de administración y de características inherentes al huésped.

Los probióticos pueden actuar sobre la salud humana a distintos niveles: i) interactuando con la microbiota intestinal (competición por los nutrientes, producción de agentes antimicrobianos, exclusión competitiva); ii) mejorando el efecto barrera de la mucosa y epitelio intestinales; y/o iii) afectando al sistema inmune (O'Hara y Shanahan, 2007).

Entre los efectos beneficiosos, destacan:

➤ **Actividad frente a enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal**

La enfermedad inflamatoria intestinal es una afección crónica que causa inflamación en el tubo o paredes del TGI. La microbiota intestinal juega un papel importante en los periodos inflamatorios de la enfermedad, en cuyo caso un tratamiento probiótico podría remediar la inflamación a través de su interacción con la microbiota autóctona. Determinados estudios defienden que la combinación de cepas de *Lactobacillus*, *Saccharomyces boulardii*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium* pueden mejorar los síntomas de la enfermedad de Crohn (Gupta *et al.*, 2000; Guslandi *et al.*, 2000), la colitis ulcerosa (Ishikawa *et al.*, 2003) y el síndrome del colon irritable (Nobaek *et al.*, 2000; Schultz y Sartor, 2000).

La evidencia más significativa de que el uso de probióticos puede ayudar en estas enfermedades proviene de ensayos clínicos aleatorios, de doble ciego y controlados con placebo, realizados con la mezcla probiótica VSL#3, compuesta por distintas cepas probióticas. La administración de esta mezcla a pacientes con *pouchitis* (la complicación a largo término más común después de realizar

cirugía en pacientes con colitis ulcerosa) mejoró la calidad de vida de los mismos (Gionchetti *et al.*, 2000; Gionchetti *et al.*, 2003; Mimura *et al.*, 2004).

➤ **Prevención y tratamiento de diarreas**

Entre los efectos más documentados de los probióticos se encuentra la prevención y tratamiento de la diarrea de diversas etiologías, entre las que se incluyen: la diarrea infecciosa, la asociada a tratamiento antibiótico o la “del viajero”.

Entre los mecanismos por los que los probióticos podrían prevenir o aminorar la diarrea se incluyen: la producción de sustancias antimicrobianas y la competición con virus o bacterias patógenas por nutrientes y por los receptores de unión a las células epiteliales. La capacidad de adhesión de las bacterias probióticas constituye uno de los criterios de selección de bacterias probióticas. Diversos estudios han demostrado la capacidad de ciertas cepas probióticas, sobretodo de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, de adhesión y de inhibición o desplazamiento de patógenos invasivos tales como *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *S. aureus* y *Escherichia coli* mediante el uso de diversos modelos *in vitro* basados en líneas celulares (Caco-2 y HT29) y moco intestinal (Gueimonde *et al.*, 2006; Moroni *et al.*, 2006; Collado *et al.*, 2007; Lim e Im, 2012).

Cepas de *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *Lactobacillus bulgaricus*, *S. boulardii* y *Bifidobacterium* han mostrado eficacia en la prevención y tratamiento de diarreas en humanos (Guandalini *et al.*, 2000; Marteau *et al.*, 2001; Sazawal *et al.*, 2006; Liong, 2007; Hibberd, 2009).

➤ **Reducción de la intolerancia a la lactosa**

La intolerancia a la lactosa es una situación en que existe una deficiencia de la enzima lactasa, lo que provoca que este disacárido pase inalterado al intestino grueso, donde es fermentado por microbiota intestinal, con la consiguiente producción de agua, ácidos grasos y gases, que ocasionan síntomas como diarrea, dolor abdominal o distensión por gases. Se ha podido comprobar que el consumo de yogur con *Streptococcus thermophilus* y *L. bulgaricus* reduce los síntomas de intolerancia a la lactosa, ya que degradan parcialmente la lactosa

2. Introducción

contenida en el mismo, lo que permite una mejor absorción (Salminen *et al.*, 1996; Gorbach, 2000).

➤ **Reducción de los niveles de colesterol**

Los niveles elevados de ciertos lípidos en sangre son un factor de riesgo de ECV. La capacidad de ciertas especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* de presentar actividad sobre los ácidos biliares sugiere que pueden tener un papel en el control de los niveles de colesterol en sangre, ya que el colesterol es un precursor de los ácidos biliares (Liong, 2007).

➤ **Actividad frente a *Helicobacter pylori***

Helicobacter pylori es una bacteria asociada a gastritis crónicas, úlcera gastroduodenal y un factor de riesgo para el cáncer gastrointestinal. La habilidad de las bacterias probióticas para inhibir la capacidad de adherencia y la actividad ureasa necesaria para la supervivencia de la bacteria en el medio ácido del estómago ha sido investigada por diversos autores (Hamilton-Miller, 2003; Lesbros-Pantoflickova *et al.*, 2007). En estudios *in vivo* en animales y humanos, los microorganismos probióticos no son capaces de erradicar a este microorganismo, pero sí son capaces de reducir la carga microbiana y la inflamación (Cats *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Sgouras *et al.*, 2005).

4.1.3.3 Criterios de selección de los probióticos

En el 2002, la FAO y la OMS elaboraron conjuntamente una guía para la evaluación, de forma individual, de las cepas probióticas, proporcionando así un asesoramiento científico en relación con la evaluación de la inocuidad de los probióticos (en relación a su patogenicidad, toxicogenicidad y alergenicidad) y a sus propiedades funcionales y nutricionales, que incluye los siguientes aspectos:

➤ **Identificación del género, la especie y la cepa probiótica**

Los lactobacilos y las bifidobacterias incorporados a estos productos se consideran seguros según su clasificación taxonómica. Por ello, es necesaria una correcta identificación a nivel de género y especie para garantizar que se trata de microorganismos inocuos (GRAS). No obstante, los efectos beneficiosos no pueden atribuirse de forma generalizada a un género o especie, sino que son dependientes de cepa. Por ello, es necesaria la identificación a nivel intraespecífico mediante métodos de caracterización fenotípica y genotípica, con

el fin de asociar un determinado efecto a una cepa concreta y poder realizar su seguimiento en estudios tecnológicos, clínicos y epidemiológicos.

➤ **Estudios *in vitro* para la selección de probióticos de uso en humanos**

Se incluyen los ensayos de resistencia a la acidez gástrica y a las sales biliares, que constituyen unas condiciones limitantes para la supervivencia a través del TGI, de lo contrario los microorganismos probióticos no llegarían viables al final del intestino para ejercer su acción beneficiosa para la salud, y la adherencia a la mucosa intestinal y a las células epiteliales, ya que se consideran propiedades que deben de poseer para ejercer efectos inmunomoduladores. También se incluyen ciertas habilidades como son la reducción de la adhesión de la microbiota competitiva, la actividad antimicrobiana frente a patógenos y la capacidad de hidrolizar las sales biliares.

➤ **Seguridad de los probióticos**

Aunque son muchas las propiedades beneficiosas de los microorganismos probióticos, es requisito indispensable que su administración no suponga ningún riesgo para la salud del consumidor. Es preferible que los microorganismos para uso humano sean de origen humano, es decir, que sean miembros habituales y deseables de la microbiota intestinal de individuos sanos. Las cepas utilizadas en alimentos pertenecen, generalmente, a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, comensales en la microbiota humana, garantizando *a priori* su inocuidad. No obstante, se recomienda su caracterización para confirmar la ausencia de: resistencias transferibles a antibióticos, actividades metabólicas perjudiciales, infectividad en animales inmunodeprimidos, producción de toxinas y capacidad hemolítica (en el caso en que la cepa evaluada perteneciera a una especie productora). También es importante la realización de estudios epidemiológicos sobre posibles efectos adversos en los consumidores y de estudios *in vivo* en animales y humanos para demostrar las propiedades atribuidas a la cepa evaluada en relación con el beneficio sobre la salud.

➤ **Reclamos de salud y etiquetado**

Se recomienda la incorporación en el etiquetado de los siguientes aspectos: i) género, especie y nombre de la cepa, para evitar confusiones sobre su identidad y, además, información sobre su funcionalidad; ii) mínimo número de

2. Introducción

viables de la cepa probiótica al final de la vida útil; iii) ingestión recomendada para que la dosis del probiótico sea efectiva en relación con la mejora de salud declarada; iv) efectos beneficiosos que puede proporcionar a la salud; v) condiciones adecuadas de almacenamiento; y vi) dirección de contacto con centros de información al consumidor.

Además de la identificación y evaluación de los criterios funcionales y de seguridad de la cepa, citados anteriormente, es importante también la evaluación de los aspectos tecnológicos, que dependerán del producto que se use como vehículo de suministro del probiótico. En todo caso, el probiótico deberá mantener una elevada viabilidad y estabilidad durante el procesado y almacenamiento del producto, así como conferir buenas características organolépticas al producto final.

4.1.3.4 Incorporación de probióticos en embutidos fermentado-curados

Actualmente, el consumo de productos probióticos está limitado, básicamente, a productos lácteos y complementos alimenticios. Por lo tanto, es recomendable investigar nuevas formas de ingestión de microorganismos probióticos, diferentes a la amplia gama de productos lácteos existentes en el mercado, incrementando así la oferta de productos a incluir dentro de una dieta variada. Los alimentos fermentados de origen cárnico podrían constituir excelentes alimentos probióticos, dado que en el procesado de este tipo de productos juegan un papel fundamental microorganismos del género *Lactobacillus*. Además, se ha visto que la matriz del embutido protege los microorganismos en su tránsito a través del TGI mejorando su supervivencia (Työppönen *et al.*, 2003; Klingberg y Budde, 2006). Los EFC son productos que, generalmente, no han sido sometidos a tratamiento térmico durante el proceso de elaboración, por lo cual pueden ser buenos vehículos alimentarios de bacterias probióticas (Ammor y Mayo, 2007). Klingberg y Budde (2006) observaron como la supervivencia de la cepa *L. plantarum* MF1298, incluida en un EFC, mejoraba en comparación con la que mostraba cuando ésta se administraba directamente liofilizada y encapsulada. No obstante, por lo general, la viabilidad de las bacterias en las condiciones de fabricación de los EFC depende de la cepa y, por lo tanto, una elección apropiada de la bacteria probiótica para su incorporación en el

embutido será un factor clave a tener en cuenta. En este sentido, la selección de BAL aisladas de EFC podría ser una buena fuente de probióticos que se adaptasen mejor a las condiciones ecológicas de este tipo de productos que los que proceden de un ambiente distinto. Papamanoli *et al.* (2003), Pennacchia *et al.* (2004 y 2006) y Klingberg *et al.* (2005) seleccionaron cepas aisladas de EFC para su uso como cultivos iniciadores probióticos en este tipo de productos.

Las cepas seleccionadas, además de ser capaces de sobrevivir a las condiciones de fermentación, secado y almacenamiento del embutido, deben alcanzar niveles que permitan aportar los efectos beneficiosos para el huésped y no conferir connotaciones sensoriales negativas al producto final. La dosis efectiva de ingestión diaria de microorganismos probióticos no se conoce con exactitud y varía según los estudios y estándares (Rouhi *et al.*, 2013), aceptándose valores mínimos necesarios entre 10^8 - 10^9 microorganismos (Champagne *et al.*, 2011). En otros estudios, se ha aceptado como valores mínimos necesarios entre 10^6 - 10^8 microorganismos viables/ml o g de producto para conseguir la colonización intestinal temporal y, consecuentemente, ejercer los efectos beneficiosos sobre la salud (Salminen *et al.*, 1993; Työppönen *et al.*, 2003; Korbekandi *et al.*, 2010). Una vez que los microorganismos alcanzan el intestino, para establecerse como habitantes en el TGI, deben adherirse a las células epiteliales intestinales. La adhesión a la mucosa intestinal es considerada como un prerrequisito para la colonización intestinal por parte de la cepa con potencial probiótico (Alander *et al.*, 1999) y, adicionalmente, propicia fenómenos de inmunomodulación (Schiffrin *et al.*, 1997) y de exclusión competitiva de bacterias enteropatógenas (Fernández *et al.*, 2003). Las líneas celulares HT-29 y Caco-2 expresan las características morfológicas y fisiológicas de los enterocitos humanos y han sido ampliamente empleadas para evaluar *in vitro* la capacidad de adhesión de BAL y bifidobacterias potencialmente probióticas (Crociani *et al.*, 1995; Gueimonde *et al.*, 2006; Vizoso-Pinto *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2012; Serafini *et al.*, 2013). Por lo tanto, una alternativa válida sería aislar BAL del TGI humano que, en teoría, van a presentar una mayor facilidad para colonizar el intestino humano que las aisladas de otras fuentes, y que hayan demostrado una elevada viabilidad durante el proceso de elaboración del producto, alcanzando elevados niveles en el producto final. En

2. Introducción

este sentido, cepas de *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* y *L. paracasei* de origen intestinal humano han demostrado que pueden sobrevivir al proceso de fabricación de EFC, siendo detectadas a niveles de 10^7 - 10^9 UFC/g en el producto final (Erkkilä *et al.*, 2001a,b; Pidcock *et al.*, 2002; Ruiz-Moyano *et al.*, 2011a,b; Rubio *et al.*, 2013a).

La Tabla 4 muestra un listado de diferentes publicaciones relacionadas con el uso de microorganismos probióticos o potencialmente probióticos como cultivos iniciadores en EFC y los recuentos alcanzados en el embutido por las cepas ensayadas dependiendo del proceso de fabricación del embutido, así como los resultados obtenidos.

Tabla 4. Recopilación de publicaciones relacionadas con el uso de probióticos en embutidos fermentado-curados.

Producto	Cepa	Viabilidad (UFC/g)	Proceso de fabricación / ensayo	Resultados obtenidos	Referencia
Embutido fermentado-curado ácido (pH final 4,9-5,0)	<i>L. rhamnosus</i> GG	$>10^8$ (dF) / ca. 10^9 (dM)	Inoculación inicial: 10^7 UFC/g	El número de viables no afectó a las propiedades sensoriales y tecnológicas del producto final y fueron similares al producto comercial.	Erkkilä <i>et al.</i> , 2001a.
	<i>L. rhamnosus</i> LC-705	10^8 (dF) / $>10^8$ (dM)	Fermentación: 7 días a 19-23°C		
	<i>L. rhamnosus</i> E-97800	$>10^8$ (dF) / ca. 10^9 (dM)	Ahumado entre días 2 y 5		
	<i>L. plantarum</i> E-98098	$>10^7$ (dF) / ca. 10^8 (dM)	Maduración: 28 días a 17°C		
	<i>Pediococcus pentosaceus</i> E-90390	$>10^8$ (dF) / ca. 10^9 (dM)	75% HR		
	<i>L. rhamnosus</i> GG	10^8 (dF)	Inoculación inicial: 10^7 UFC/g	La cepa E-97800 fue la que mostró una mayor capacidad de acidificación y crecimiento.	Erkkilä <i>et al.</i> , 2001b.
	<i>L. rhamnosus</i> LC-705	10^8 (dF)	Fermentación: 7 días a 19-23°C		
	<i>L. rhamnosus</i> E-97800	ca. 10^9 (dF)	89-95% HR		
		Al final del proceso de maduración, recuentos ligeramente más bajos, manteniéndose la diferencia entre cepas	Ahumado entre días 2 y 5		
			Maduración: 21 días a 17°C		
			75% HR		

2. Introducción

Tabla 4. Continuación.

Producto	Cepa	Viabilidad (UFC/g)	Proceso de fabricación / ensayo	Resultados obtenidos	Referencia
15 tipos de embutidos fermentado-curdados	<i>L. plantarum</i> MF1291 <i>L. plantarum</i> MF1298 <i>L. pentosus</i> MF1300	4,7×10 ⁷ (dM) / 2×10 ⁷ (dA) 2,6×10 ⁸ (dM, dA) 2,9×10 ⁸ (dM, dA)	Inoculación inicial: 10 ⁶ -10 ⁷ UFC/g Fermentación: 3 días a 24°C Maduración: 25 días a 16°C Almacenaje: 22 días a 5°C	Las tres cepas fueron capaces de sobrevivir en un ambiente similar al del TGI humano, inhibir bacterias patógenas <i>in vitro</i> , consideradas seguras con respecto a su patrón de resistencia antibiótica y producir un embutido de calidad similar al comercial.	Klingberg <i>et al</i> , 2005.
Embutido fermentado-curado ácido (pH final ca. 5,0)	Cepas de BAL aisladas de dos tipos de EFC griegos.	-	Ensayos <i>in vitro</i> (caracterización bioquímica y enzimática y actividad antimicrobiana).	El 58% de las cepas de <i>L. curvatus</i> y de <i>L. plantarum</i> aisladas de los embutidos fueron resistentes a las sales biliares y presentaron actividad antimicrobiana frente a <i>L. monocytogenes</i> .	Papamanoli <i>et al</i> , 2003.

Tabla 4. Continuación.

Producto	Cepa	Viabilidad (UFC/g)	Proceso de fabricación / ensayo	Resultados obtenidos	Referencia
Salami (pH después de la fermentación 4,4-5,0)	15 cepas de BAL de origen intestinal humano y lácteo. <i>P. pentosaceus</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. casei</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. acidophilus</i> <i>B. longum</i> <i>B. lactis</i>	10^7 - 10^8 (dF) 10^6 - 10^8 (dM)	Inoculación inicial: 10^6 - 10^7 UFC/g Fermentación: 72 h a 25°C 85% HR Maduración: 42 días a 15°C 70% HR	Se observó que cultivos no procedentes de ambientes cármicos podían mejorar la seguridad alimentaria del embutido inhibiendo el crecimiento de los patógenos <i>E. coli</i> O111 y <i>L. monocytogenes</i> .	Pidcock <i>et al.</i> , 2002.
Salchichón (pH final 4,6-5,0)	<i>L. rhamnosus</i> GG <i>L. plantarum</i> 299v	ca. 10^8 (dF, dM, dA)	Inoculación inicial: dos concentraciones de cada cepa (10^5 y 10^7 UFC/g) Fermentación: 20-22°C y 90-95% HR (hasta que el pH fue ca. 5,0) Maduración: 12°C y 78-80% HR (hasta que los valores de a_w fueron ca. 0,90-0,92) Almacenaje: 1 mes a 1°C	<i>L. rhamnosus</i> GG mostró mayor capacidad acidificante. <i>L. plantarum</i> 299v inoculado a 10^5 UFC/g co-dominó con BAL endógenas y fue la cepa más prometedora para su uso en EFC. Fue el lote con probiótico mejor valorado en el análisis sensorial y el que presentó las cualidades organolépticas más similares al control (embutido sin cepa probiótica añadida).	Rubio <i>et al.</i> , 2013a.

2. Introducción

Tabla 4. Continuación.

Producto	Cepa	Viabilidad (UFC/g)	Proceso de fabricación / ensayo	Resultados obtenidos	Referencia
Embutido ibérico (pH final 6,0)	1000 cepas de BAL aisladas de embutidos ibéricos y del TGI humano y de cerdo	-	Ensayos <i>in vitro</i> de supervivencia a las condiciones ecológicas de la fermentación y del TGI humano.	312 cepas mostraron una buena adaptación a las condiciones ecológicas del embutido. De éstas, 51 presentaron gran capacidad de supervivencia a las condiciones del TGI humano.	Ruiz-Moyano <i>et al.</i> , 2008.
	18 cepas de <i>Lactobacillus</i>	-	Ensayos <i>in vitro</i> (producción de aminas biógenas, D-ácido láctico, sensibilidad antibiótica, hemólisis, adhesión, actividad antimicrobiana contra patógenos alimentarios).	<i>L. fermentum</i> HL57 y <i>L. reuteri</i> PL519 y PL542 fueron seleccionadas como candidatas para su uso como probióticos en este embutido.	Ruiz-Moyano <i>et al.</i> , 2009.
	<i>L. fermentum</i> HL57 <i>Pediococcus acidilactici</i> SP979 <i>L. reuteri</i> HL519	ca. 10 ⁷ (DM) ca. 10 ⁷ (DM) >10 ⁸ (dM)	Inoculación inicial: 3-5x10 ⁷ UFC/g Fermentación: 22 días a 10°C y 80% HR Maduración: 26 días a 12°C y 70% HR	Características físico-químicas y aceptabilidad global sin diferencias significativas entre los diferentes lotes.	Ruiz-Moyano <i>et al.</i> , 2011a,b.

^{dF}Después de la fermentación; ^{dM}Después de la maduración; ^{dA}Después del almacenaje; HR: humedad relativa; TGI: tracto gastrointestinal

3. OBJETIVOS

3. Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral consistió en la selección de un cultivo iniciador potencialmente probiótico a partir de cepas de origen humano para su inclusión en un EFC de baja acidez tipo fuet, nutricionalmente mejorado (reducido en sal y grasa), que permita la obtención de un producto funcional, seguro y con características organolépticas aceptables.

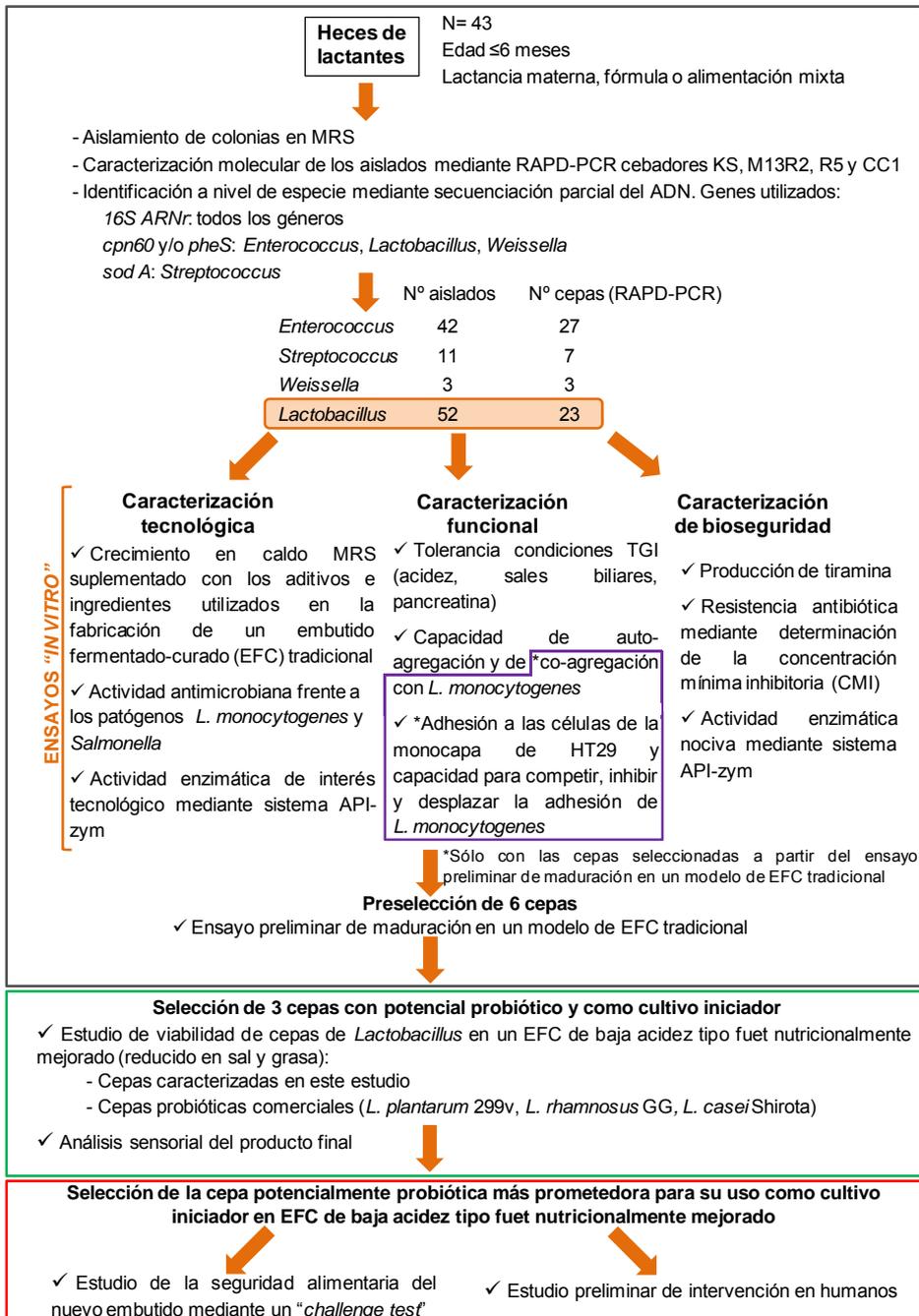
Con esta finalidad se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. Aislamiento, caracterización molecular, identificación y caracterización *in vitro* (tecnológica, de seguridad y funcional) de cepas de bacterias del ácido láctico aisladas de heces de lactantes.
2. Estudio de la viabilidad (implantación y dominancia frente a las bacterias del ácido láctico endógenas) de las cepas seleccionadas como potenciales probióticas en este estudio y de tres cepas probióticas comerciales (*Lactobacillus plantarum* 299v, *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus casei* Shirota), como cultivos iniciadores en EFC de baja acidez, tipo fuet, nutricionalmente mejorado (reducido en sal y grasa) y valoración sensorial del producto final.
3. Evaluación de la seguridad microbiológica alimentaria del fuet fabricado con la cepa potencialmente probiótica más prometedora como cultivo iniciador, mediante estudios de inoculación tipo *challenge test* con *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*, durante la fabricación y almacenaje del embutido.
4. Evaluación de la supervivencia y persistencia en el tracto gastrointestinal de la cepa seleccionada como potencialmente probiótica a través de un estudio preliminar de intervención en humanos durante y después de haber finalizado el periodo de consumo del “fuet potencialmente probiótico”.

4. METODOLOGÍA

4. Metodología

En la Fig. 1 se resume el plan de trabajo junto con las publicaciones obtenidas de los diferentes resultados.



□ Artículo 1 □ Artículo 2 □ Artículo 3 □ Artículo 4

Fig. 1. Plan de trabajo de la Tesis Doctoral.

Para tener una visualización global de las técnicas analíticas empleadas en cada uno de los artículos presentados en la Tesis Doctoral, se presenta la siguiente Tabla:

Tabla 5. Técnicas analíticas empleadas en cada uno de los artículos presentados.

Análisis	Artículo 1	Artículo 2	Artículo 3	Artículo 4
Físico-químicos				
pH	-	Electrodo penetración Xerolit conectado a un pH-metro portátil Crison	-	Electrodo penetración Xerolit conectado a un pH-metro portátil Crison
a_w	-	Aqualab S3TE	-	Aqualab S3TE
% grasa	-	FoodScan™ Lab	-	-
% sal	-	785 DMP Titrino	-	-
Microbiológicos				
Aislamiento y recuento de BAL		Agar MRS (anaerobiosis, 37°C, 48-72 h)		Agar Rogosa (anaerobiosis, 37°C, 48 h)
Investigación y <i>L. monocytogenes</i>			Agar CLA (aerobiosis, 37°C, 48 h)	
Salmonella	-	ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004	-	ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004
	-	CHROMagar™ Salmonella Plus (aerobiosis, 37°C, 48 h)	-	CHROMagar™ Salmonella Plus (aerobiosis, 37°C, 48 h)
		ISO 6579:2002		ISO 6579:2002

4. Metodología

Tabla 5. Continuación.

Análisis	Artículo 1	Artículo 2	Artículo 3	Artículo 4
Microbiológicos Investigación y recuento <i>E. coli</i> CGC+	-	ChromID Coili agar (doble capa, aerobiosis, 37°C, 48 h)	-	ChromID Coili agar (doble capa, aerobiosis, 37°C, 48 h)
	-	Agar MSA (aerobiosis, 30°C, 48 h)	-	-
	-	Agar VRBD (doble capa, aerobiosis, 37°C, 24 h)	-	-
Identificación BAL a nivel de especie	Secuenciación 16S, <i>cpn60</i> , <i>pheS</i> , <i>sodA</i>	-	-	Agar M-RTL V (anaerobiosis, 37°C, 48 h) (Sakai <i>et al.</i> , 2010)
Tipificación de BAL	RAPD-PCR (cebadores KS, M13R2, R5, CC1)	RAPD-PCR (cebador KS)	-	RAPD-PCR (cebador KS)
	Electroforesis capilar automatizada (QIAxcel)		-	QIAxcel
Caracterización Tecnológica	Simulación capacidad supervivencia condiciones procesado de un EFC tradicional (BioscreenC)	-	-	-
		-	-	-
	Antagonismo directo e indirecto	-	-	-
	Evaluación actividades enzimáticas implicadas en el desarrollo del <i>flavor</i> de EFC (Api-Zym)	-	-	-

Tabla 5. Continuación.

Análisis	Artículo 1	Artículo 2	Artículo 3	Artículo 4
Caracterización Funcional	Caldo MRS a pH 3,5	-	-	-
	Pancreatina	-	-	-
	Agar Oxgall	-	-	-
	Test auto-agregación (Reniero <i>et al.</i> , 1992)	-	-	-
	-	-	Test co-agregación (Vandevoorde <i>et al.</i> , 1992)	-
Biosseguridad	Producción tiramina (Agar Descarboxilasa, Bover-Cid y Holzapfel, 1999)	-	Estudio de adhesión y de competitividad, inhibición y desplazamiento de <i>L. monocytogenes</i> (Línea celular HT29)	-
	Determinación de la CMI (Etest®)	-	-	-
	Estudio actividades enzimáticas nocivas para el huésped (Api-Zym)	-	-	-
	-	ASTM (1981)	-	-
	-	ISO 8586-1 (1993)	-	-
Sensorial	-	ISO 8586-2 (1994)	-	-
Estadístico	ANOVA multifactorial. Modelo general lineal (GLM) (SAS Enterprise Guide 4.2)	ANOVA multifactorial. Modelo general lineal (GLM) (SAS Enterprise Guide 4.2)	ANOVA de una vía (SPSS 19.0)	ANOVA multifactorial. Modelo general lineal (GLM) (SAS Enterprise Guide 4.2)

5. RESULTADOS

1. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages.

Rubio, R., Jofré, A., Martín, B., Aymerich, T., Garriga, M. (2014).
Food Microbiology 38, 303-311.

Raquel Rubio, Anna Jofré, Belén Martín, Teresa Aymerich, Margarita Garriga. "Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages". *Food microbiology*. Vol. 38 (April 2014) : p. 303-311

IRTA-Food Safety Programme, Finca Camps i Armet, E-17121 Monells, Girona, Spain

Received 16 November 2012, Revised 28 July 2013, Accepted 30 July 2013, Available online 14 August 2013

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.015>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002013001548>

Copyright © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved

Abstract

A total of 109 lactic acid bacteria isolated from infant faeces were identified by partial 16S rRNA, *cpn60* and/or *pheS* sequencing. *Lactobacillus* was the most prevalent genus, representing 48% of the isolates followed by *Enterococcus* (38%). *Lactobacillus gasseri* (21%) and *Enterococcus faecalis* (38%) were the main species detected. A further selection of potential probiotic starter cultures for fermented sausages focused on *Lactobacillus* as the most technologically relevant genus in this type of product. Lactobacilli strains were evaluated for their ability to grow *in vitro* in the processing conditions of fermented sausages and for their functional and safety properties, including antagonistic activity against foodborne pathogens, survival from gastrointestinal tract conditions (acidity, bile and pancreatin), tyramine production, antibiotic susceptibility and aggregation capacity. The best strains according to the results obtained were *Lactobacillus casei/paracasei* CTC1677, *L. casei/paracasei* CTC1678, *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679, *L. gasseri* CTC1700, *L. gasseri* CTC1704, *Lactobacillus fermentum* CTC1693. Those strains were further assayed as starter cultures in model sausages. *L. casei/paracasei* CTC1677, *L. casei/paracasei* CTC1678 and *L. rhamnosus* CTC1679 were able to lead the fermentation and dominate (levels *ca.* 10⁸ CFU/g) the endogenous lactic acid bacteria, confirming their suitability as probiotic starter cultures.

Highlights

- *Lactobacillus gasseri* and *Enterococcus faecalis* were the main species in infant faeces.
- RAPD-PCR discriminated 60 profiles out of 109 LAB isolates.
- Six of 109 LAB isolated from infants were qualified as potential probiotics.
- Selected lactobacilli were assayed as starter cultures in model sausages.
- Three of the selected strains were effective meat starter cultures.

Keywords

- Fermented sausages;
- Lactic acid bacteria;
- *Lactobacillus*;
- RAPD-PCR;
- Probiotics

2. Nutritionally enhanced fermented sausages as a vehicle for potential probiotic lactobacilli delivery.

Rubio, R., Jofré, A., Aymerich, T., Guàrdia, M.D., Garriga, M. (2014).
Meat Science 96, 937-942.

Raquel Rubio, Anna Jofré, Teresa Aymerich, Maria Dolors Guàrdia, Margarita Garriga. "Nutritionally enhanced fermented sausages as a vehicle for potential probiotic lactobacilli delivery". *Meat science*. Vol. 96, 2, Part A (February 2014) : p. 937-942

IRTA-Food Safety Programme, Finca Camps i Armet, E-17121 Monells, Girona, Spain
Food Technology Programme, Finca Camps i Armet, E-17121 Monells, Girona, Spain

Received 20 February 2013, Revised 5 September 2013, Accepted 7 September 2013

Available online 14 September 2013

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.09.008>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174013005263>

Copyright © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved

Abstract

The suitability of three potential probiotic lactobacilli strains (*Lactobacillus casei* CTC1677, *L. casei* CTC1678 and *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679), previously isolated from infants' faeces and characterized, and three commercial probiotic strains (*Lactobacillus plantarum* 299v, *L. rhamnosus* GG and *L. casei* Shirota) was assessed during the manufacture of low-acid fermented sausages (*fuets*) with reduced Na⁺ and fat content. The inoculated strains were successfully monitored by RAPD-PCR during the process. *L. rhamnosus* CTC1679 was the only strain able to grow and dominate (levels ca. 10⁸ CFU/g) the endogenous lactic acid bacteria population in two independent trials, throughout the ripening process. Thus, *fuet* containing *L. rhamnosus* CTC1679 as a starter culture could be a suitable vehicle for putative probiotic bacteria delivery. All the final products recorded a satisfactory overall sensory quality without any noticeable off-flavour, and with the characteristic sensory properties of low-acid fermented sausages.

Highlights

- Nutritionally enhanced *fuets* with putative probiotic lactobacilli were manufactured.
- *Fuets* showed the characteristic sensory properties of low-acid fermented sausages.
- *Fuets* can be labelled with claims of 'reduced fat and salt content'.
- *L. rhamnosus* CTC1679 was the only strain able to dominate in both replicates.
- A putative probiotic effect could be achieved eating 10 g/day of *fuet* with CTC1679.

Keywords

- Fermented sausages;
- Probiotic cultures;
- RAPD-PCR;
- Sensory analysis;
- Fat reduction;
- Salt reduction

3. Potentially probiotic and bioprotective lactic acid bacteria starter cultures antagonize the *Listeria monocytogenes* adhesion to HT29 colonocyte-like cells.

Garriga, M., Rubio, R., Aymerich, T., Ruas-Madiedo, P.

Beneficial Microbes, revisión enviada el 08-07-2014.

RESEARCH ARTICLE

Potentially probiotic and bioprotective lactic acid bacteria starter cultures antagonize the *Listeria monocytogenes* adhesion to HT29 colonocyte-like cells

Margarita Garriga^a, Raquel Rubio^a, Teresa Aymerich^a and Patricia Ruas-Madiedo^{b*}

^a IRTA-Food Safety Programme. Finca Camps i Armet, E-17121 Monells (Girona), Spain.

^b Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC). Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa (Asturias), Spain

* Corresponding author: P. Ruas-Madiedo (IPLA-CSIC). Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa (Asturias), Spain. Tel.: (+34) 985892131; fax: (+34) 985892233
E-mail address: ruas-madiedo@ipla.csic.es

Abstract

The capability of five lactic acid bacteria (LAB) to counteract the adhesion of *Listeria monocytogenes* to the epithelial intestinal cell line HT29 was studied. The highest adhesion ability to HT29 was achieved by the intestinal strain *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679, followed by the meat-derived strains *Lactobacillus sakei* CTC494 and *Enterococcus faecium* CTC8005. Surprisingly, the meat strains showed significantly better adhesion to HT29 than two faecal isolates of *Lactobacillus casei* and even significantly higher than the reference strain *Lb. rhamnosus* GG. Additionally, the anti-listerial, bacteriocin-producer starter culture *Lb. sakei* CTC494 was able to significantly reduce the adhesion of *L. monocytogenes* to HT29 in experiments of exclusion, competition and inhibition. The performance was better than the faecal isolate *Lb. rhamnosus* CTC1679. Our results reinforce the fact that the ability of LAB to interact with a host epithelium model, as well as to antagonize with foodborne pathogens, was a strain-specific characteristic.

Additionally, it was underlined that this trait was not dependent on the origin of the bacterium since some food LAB behave better than intestinal ones. Therefore, the search for novel strains in food niches is a suitable approach to find those with potential health benefits. These strains are likely pre-adapted to the food environment, which would make more feasible their inclusion in the formulation of probiotic foods.

Keywords

Lactobacillus, pathogen, adhesion, competition, antagonism

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are one of the main microbial groups involved in spontaneous, as well as controlled, food fermentations. Nowadays the use of LAB strains as cultures to initiate a fermentative process is a common practice in food industry. The search for novel “*functional starters*” that can “contribute to the microbial safety or offer one or more organoleptic, technological, nutritional or health advantages” (Leroy and De Vuyst, 2004), is of pivotal relevance for the manufacture of traditional products as well as for the development of new foods (Bourdichon *et al.*, 2012). It is well known that the rapid acidification of the raw (food) material by LAB allows the partial control of food-borne pathogens such as, among others, *Listeria monocytogenes*. Moreover, the use of bacteriocin-producing strains may contribute to reduce the risk of *L. monocytogenes* during dry sausage manufacturing process, thus improving the food safety (Hugas *et al.*, 1995; Työppönen *et al.*, 2003). This pathogen is able to adhere and invade the intestinal epithelium causing a severe disease which is associated with high mortality in immune-compromised populations (EFSA, 2014; Milillo *et al.*, 2012). The ability of LAB strains to exclude *L. monocytogenes* from mucus and intestinal cells has been previously reported (Collado *et al.*, 2007; Gueimonde *et al.*, 2006); such strains could be considered as potential probiotics, i.e., “live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host” (FAO/WHO, 2006). Different mechanisms have been proposed to explain the capability of probiotic LAB to counteract the effects of *L. monocytogenes* in the gut; for example, the production of bacteriocins (Corr *et al.*, 2007), the stimulation of the host immune response (Corr *et al.*, 2007) or the modulation of

listeria and host transcriptomes by the presence of LAB (Archambaud *et al.*, 2012).

In previous studies, we have showed the high potential as functional starters of several strains belonging to the IRTA culture collection. *Lactobacillus sakei* CTC494, isolated from naturally fermented sausages, is a starter culture producing sakacin K (Aymerich *et al.*, 2000), with proved anti-listerial activity in dry fermented sausages (Hugas *et al.*, 1995). *Enterococcus faecium* CTC8005, a non-virulent and non-aminogenic strain isolated from a meat-processing factory, was able to inhibit the growth of *L. monocytogenes* in low-acid fermented sausages during the whole ripening process, achieving a further reduction in the pathogen counts after a high hydrostatic pressure treatment (Rubio *et al.*, 2013). On the other hand, the strains *Lactobacillus casei/paracasei* CTC1677 and CTC1678, as well as *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679, were selected among several LAB isolated from infants' faeces based on their safety, technological and potential probiotic properties and their capability to lead the fermentation in model sausages (Rubio *et al.*, 2014b) being *Lb. rhamnosus* CTC1679 a suitable starter culture for nutritionally enhanced fermented sausages (Rubio *et al.*, 2014a). In the current work, we want to know whether these five strains could also exert an anti-listerial effect upon gut cells as a step further to characterise their probiotic potential. For that purpose, the human intestinal cellular line HT29 was chosen as *in vitro* model to mimic the colonic epithelium. HT29 monolayers were challenged with different pair combinations of these LAB and *L. monocytogenes* in order to elucidate the ability of different strains to antagonize the adhesion of the pathogen.

2. Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

The strains and culture conditions used in this study are listed in Table 1. As routinely procedure, stocks (with 20% glycerol) of LAB stored at -80°C were surface streaked on de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). *L. monocytogenes* CTC1034 (serovar 4b) was grown on Chromogenic Listeria Agar (CLA, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England). Plates were incubated for 48 h under different temperatures and O₂ concentration (Table 1). Isolated colonies were picked up to inoculate 10 ml MRS broth, for LAB strains, or 10 ml TSBYE broth (Tryptic Soy Broth Yeast Extract, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) for *L. monocytogenes*. Cultures were grown overnight

under same conditions and were used to inoculate (2% v/v) fresh broths, which were incubated for 24 h. These 24 h-grown cultures were used to prepare bacterial suspensions for the following assays.

Table 1 Bacterial strains and culture conditions used in this study.

Bacteria	Strain¹	Origin	Culture conditions²	Reference
<i>Lactobacillus casei</i>	CTC1677	Infants' faeces	MRS, 37°C, anaerobic	Rubio <i>et al.</i> (2014a,b)
<i>Lactobacillus casei</i>	CTC1678	Infants' faeces	MRS, 37°C, anaerobic	Rubio <i>et al.</i> (2014a,b)
<i>Lactobacillus sakei</i>	CTC494	Meat product	MRS, 32°C, anaerobic	Hugas <i>et al.</i> (1995)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	CTC1679	Infants' faeces	MRS, 37°C, anaerobic	Rubio <i>et al.</i> (2014a,b)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	LMG18243 (GG)	Culture collection	MRS, 37°C, anaerobic	-
<i>Enterococcus faecium</i>	CTC8005	Meat environment	MRS, 37°C, aerobic	Rubio <i>et al.</i> (2013)
<i>Listeria monocytogenes</i>	CTC1034	Meat product	CLA, 37°C, aerobic	Garriga <i>et al.</i> (2002)

¹ CTC: IRTA culture collection; LMG-BCCM: Belgian co-ordinated collection of microorganisms.

² MRS: de Man Rogosa and Sharpe; CLA: chromogenic listeria agar; anaerobic conditions achieved with Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Germany).

Co-aggregation of bacterial strains

The co-aggregation assay was used to detect the aggregation of the pathogen *L. monocytogenes* CTC1034 with the LAB strains and was performed in three independent experiments as previously described (Vandevoorde *et al.*, 1992). Briefly, overnight bacterial cultures were harvested by centrifugation at 2400 ×g for 10 min and washed twice with phosphate buffered saline (PBS) (NaCl, 8g/l; KH₂PO₄, 0.34; K₂HPO₄, 1.21 g/l). The optical density (OD) of the bacterial suspensions was adjusted to 0.60±0.02 at 600 nm with a spectrophotometer (Novaspec Plus, Amersham Biosciences, UK). Equal volumes (2 ml) of LAB and pathogen strains were mixed and shaken for 30 min at 150 rpm and

allowing the flocks to settle. Four ml of the bacterial suspensions alone were used as controls. After shaking, the mixtures and the bacterial suspensions alone were incubated for 1 h at room temperature and subsequently the OD at 600 nm was determined. The co-aggregation (%) was expressed according to Handley *et al.* (1987) equation:

$$\text{Co-aggregation (\%)} = \frac{(\text{ODLAB} + \text{ODListeria}) - 2 \times \text{ODmixture}}{(\text{ODLAB} + \text{ODListeria})} \times 100$$

ODLAB= optical density of LAB strain; ODListeria= optical density of *L. monocytogenes* CTC1034; ODmixture= optical density of mixed bacterial suspension (LAB + Listeria).

Culture conditions of HT29 cell line

The epithelial intestinal cell line HT29 (ECACC 91072201), derived from human colon adenocarcinoma, was purchased from the European Collection of Cell Cultures (Salisbury, UK). The cell line was grown in McCoy's medium supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated bovine foetal serum and a mixture of antibiotics (50 µg/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamicin and 1.25 µg/ml amphotericin B). All media and supplements were obtained from Sigma (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). For routine maintenance, the incubations took place at 37°C, 5% CO₂ in a SL Waterjacked CO₂ Incubator (Sheldon Mfg. Inc., Cornelius, Oregon, USA) following standard procedures. For all experiments, 10⁵ HT29-cells/ml were seeded in 24-well plates and incubated for 11 days until they reached a confluent differentiated state (monolayer, about 10⁷ cells/ml).

Adhesion of single strains to HT29

The ability of the strains, including the reference strain *Lb. rhamnosus* GG, to adhere to HT29 cell line was assayed (Ayeni *et al.*, 2011). For this purpose, 24 h-grown bacterial cultures were harvested by centrifugation (7940 ×g, 10 min), washed twice with phosphate buffered saline (PBS) and resuspended in McCoy's medium without antibiotics at a concentration about 1×10⁸ CFU/ml. HT29 monolayers were washed twice with Dulbecco's PBS buffer (Sigma) to remove the antibiotics and then bacterial suspensions (500 µl) were added at a ratio of about 1:10 (eukaryotic-cell: bacteria). Plates were incubated for 1 h at 37°C, 5% CO₂ in a Heracell® 240 incubator (Thermo Electron LDD GmbH, Langenselbold, Germany). After the incubation period, supernatants were discarded and monolayers were softly washed twice with Dulbecco's PBS buffer to remove the non-attached bacteria. Afterwards, the monolayers

were trypsinized to release the eukaryotic cells and bacteria adhered. After appropriate serial dilutions in Ringer solution, counts to determine the number of adhered bacteria were carried out in MRS agar or CLA for LAB or *L. monocytogenes*, respectively. Results were expressed as the percentage of bacteria adhered with respect to the amount of bacteria added (% CFU bacteria adhered/CFU bacteria added). The assay was carried out with two consecutive passages of the cell line and two bacterial duplicates were tests in each one (in two independent wells). Thus each bacterium was tested in four replicates.

Capability of LAB to modify the adhesion of *L. monocytogenes* to HT29

The ability of the LAB strains under study to compete for, and to inhibit or displace the adhesion of *L. monocytogenes* CTC1034 to HT29 monolayers was evaluated following similar procedures to those previously described (Collado *et al.*, 2005). Pair combinations of each LAB with the pathogen were tested in duplicate wells in two replicated plates, as follows.

To evaluate the ability of the LAB strains to compete with *L. monocytogenes* for adhesion to HT29, both LAB and pathogen strains were simultaneously added in equal volume (250 μ l each) of the same bacterial-suspension concentration (about 0.5×10^8 CFU/ml). After 1 h of co-incubation at 37°C and 5% CO₂, the percentage of LAB or *L. monocytogenes* adhered was determined by counting as indicated in the previous section.

In the inhibition assay, each LAB strain was first added (500 μ l of 10^8 CFU/ml) alone to wells containing HT29-monolayers and incubated for 1 h at 37°C and 5% CO₂. Thus, the non-adhered cells were removed by washing twice PBS and, then, *L. monocytogenes* CTC1034 was added (500 μ l at 10^8 CFU/ml) over the HT29-monolayer partially colonized with the LAB strain. Afterwards, the plate was incubated for 1 additional hour in the same conditions.

For exclusion experiment the order of sequential bacterial addition was changed. First *L. monocytogenes* CTC1034 was added alone, at the same concentration indicated above, and co-incubated for 1 h with the HT29 cell line. Afterwards, monolayers were washed and then the LAB strains added following 1 h of incubation. At the end of the incubation period (2 h), the percentage of adhesion for each bacterial strain was determined by counting in the respective selective media.

Changes in the adhesion of *L. monocytogenes* CTC1034 to HT29 due to competition, inhibition or exclusion with each LAB were expressed as percentage of *Listeria* adhered in the presence of the LAB respect to % of

Listeria adhered alone. Negative values indicate a reduction in the adhesion of listeria promoted by the presence of LAB.

Statistical analysis

The SPSS 19.0 software for Windows (SPSS Inc., Chicago IL, USA) was used to statistically analyse the data by means of independent one-way ANOVA tests and by the post-hoc mean comparison LSD (least significant difference, $p < 0.05$) test. On one hand, the differences in adhesion among the seven strains added independently to HT29 were assessed. On the other hand, for each LAB strain one-way ANOVA tests were performed to compare the adhesion of *L. monocytogenes* to HT29 under the three experimental conditions (competition, inhibition or exclusion) with respect to the adhesion of listeria alone. Differences in *L. monocytogenes* co-aggregation among the five LAB under study were determined as well. In the legend of each figure, the statistical analysis carried out with the corresponding set of data is indicated.

3. Results and discussion

The *in vitro* adhesion to intestinal cell lines is a test often used to evaluate the probiotic potential of novel strains, since the transient colonization of the intestinal epithelium would allow the probiotic to exert its beneficial effect (FAO/WHO, 2006).

The results obtained in our study shown that, in general, all LAB strains presented good adhesion ability to HT29 monolayer (Figure 1). The percentages of adhesion were similar or higher than those of the strain *Lb. rhamnosus* GG, used as reference due to its good adherent properties (Lebeer *et al.*, 2007; Vizoso-Pinto *et al.*, 2007). From the three strains of human origin, only *Lb. rhamnosus* CTC1679 showed significantly higher ($p < 0.05$) adhesion ability than the strain GG. Interestingly, both strains from meat origin (*Lb. sakei* CTC494 and *E. faecium* CTC8005) adhered significantly better to HT29 than *Lb. casei* intestinal strains (CTC1677 and CTC1678) and the reference GG strain. It is well known that the adhesion capability of LAB is a characteristic of strain but not of species (Laparra and Sanz, 2009; Tuomola and Salminen, 1998). Furthermore, closely (isogenic) related strains present different adherence properties to intestinal epithelial cells (Nikolic *et al.*, 2012). This strain-dependent adhesion capability is directly related with the presence of (strain-specific) structural molecules involved in the interaction of bacteria with the environment, such as expolysaccharides, fimbriae, pili, lipoteichoic acids,

secreted proteins, etc. (Lebeer *et al.*, 2010). Our study underlines that the natural niche of these strains did not condition the presence of adhesins able to *in vitro* interact with the host epithelium, since some food LAB attached better to HT29 cells than intestinal-origin ones. The pathogen *L. monocytogenes* CTC1034 also showed a notable adherence (25%) to HT29 monolayers (Figure 1), significantly higher than the reference strain GG (about 6%). It seems that also the ability of *Listeria* to adhere to epithelial cells widely depends on the strain tested (Moroni *et al.*, 2006), which is directly correlated with the surface-molecules fingerprint (Jaradat *et al.*, 2003).

The capability to counteract the effect of pathogens in the gut is one of the desirable characteristics for potential probiotic candidates (FAO/WHO, 2006). The high *in vitro* adhesion of our LAB strains to epithelial intestinal cells prompted us to evaluate their antagonism against the food-borne pathogen *L. monocytogenes*, which in a physiological situation could reach the gut after the ingestion of contaminated foods, invading intestinal cells, among other virulent traits, and causing disease. In order to *in vitro* evaluate the potential protective effect of the LAB under study, we have chosen the good-adherent listeria strain CTC1034 to perform the experiments of competition, inhibition and exclusion of the pathogen adhesion to HT29 by each strain. The overall view of results depicted in Figure 2 evidenced that the faecal origin non-bacteriocinogenic *Lb. rhamnosus* CTC1679 and the anti-listerial meat-derived *Lb. sakei* CTC494 were the most efficient strains exerting antagonism against *L. monocytogenes* adhesion to HT29 monolayers. The remaining strains had no effect or even increased the adhesion of the food-borne pathogen to the cell line; this behaviour has been previously reported for other LAB and enteropathogens (Ayeni *et al.*, 2011; Gueimonde *et al.*, 2006). Therefore, the capability of the LAB to prevent the binding of *L. monocytogenes* to the intestinal epithelium was also a characteristic dependent on the LAB strain (Lavilla-Lerma *et al.*, 2013; Lim and Im, 2012; Nakamura *et al.*, 2012), but not on the food or intestinal origin of the bacteria tested. It is worth noting that *Lb. sakei* CTC494 was the only strain able to significantly ($p < 0.05$) reduce the listeria adhesion in the three experimental situations: inhibition, competition and exclusion. Indeed, this was the strain that reduced to a higher extent the adhesion of *L. monocytogenes* CTC1034. Our results showed that the highest adherent strains were also those showing the highest antagonism, i.e., strains CTC1679 and CTC494 (Figure 2). This result reinforced the fact of the existence of a positive correlation between the adhesion properties of potential probiotics and their ability to counteract the adhesion of pathogens such as *L. monocytogenes* (Bouchard *et al.*, 2013).

Regarding putative mechanisms of bacterial antagonism, co-aggregation could be one way of probiotics action preventing the attachment of pathogens to the intestinal surface (Ouwehand *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2009). The probiotic could interact with the pathogen, thus avoiding its binding to the cellular line. In our case, *L. monocytogenes* CTC1034 co-aggregated with *Lb. rhamnosus* CTC1679 which was also able to reduce adhesion of pathogen (Table 2); however, co-aggregation seemed not to be the mechanism of action of *Lb. sakei* CTC494 that was the strain with better anti-listerial performance. Besides, listeria also co-aggregated with *Lb. casei* CTC1677, but this strain was not able to reduce the adhesion of the pathogen to the epithelial cells. These results suggest that capability of some LAB to promote co-aggregation with Listeria and to antagonize its adhesion to the cell line model is highly dependent of the strain considered. This characteristic must be related with the presence of specific molecules in the LAB surface able to act either as ligands binding pathogens (Schachtsiek *et al.*, 2004) and/or as adhesins for attachment to the cell line (Walter *et al.*, 2008). Since surface components of LAB are involved in adhesion, co-aggregation and pathogen-adhesion interference, it could be suggested that these phenomena could be interrelated in some specific bacteria. Results obtained in our study support the fact that there are multiple mechanisms by which probiotics exert antagonism to inhibit the adhesion of the pathogens to the intestinal epithelium.

Table 2 Mean values of co-aggregation (%) between each LAB under study and *L. monocytogenes* CTC1034. One way ANOVA was carried out to asses differences among LAB strains (***) $p < 0.001$; those having different superscript are statistically different ($p < 0.05$) according to the mean comparison test LSD (least significant difference).

	Mean \pm SD ¹
	% co-aggregation <i>L.monocytogenes</i> CTC1034
<i>Lactobacillus casei</i> CTC1677	1.95 \pm 0.05 ^b
<i>Lactobacillus casei</i> CTC1678	-1.37 \pm 1.00 ^a
<i>Lactobacillus sakei</i> CTC494	-0.97 \pm 0.70 ^a
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CTC1679	5.42 \pm 1.57 ^c
<i>Enterococcus faecium</i> CTC8005	-1.31 \pm 0.47 ^a

¹ negative values indicates no co-aggregation

4. Conclusion

Results obtained with *in vitro* models are difficult to extrapolate to the physiological situation in the human GIT. However, the *in vitro* experiments could provide important information regarding the potential of a given strain before to be included in the food carrier and to be tested in human intervention studies. In this work we have shown that *Lb. rhamnosus* CTC1679 and *Lb. sakei* CTC494, both already proved to be suitable starter cultures for fermented sausages, are the best candidates to be used as probiotics to be included in the formulation of fermented foods that could promote health benefits. Next step forward to prove probiotic action will be to test the beneficial effect of these strains in human intervention studies.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) through the projects AGL2012-33278 and RTA2009-00045-00-00. R. Rubio is the recipient of a predoctoral fellowship awarded by the INIA (“Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias”).

References

- Archambaud, C., Nahori, M.A., Soubigou, G., Becavin, C., Laval, L., Lechat, P., Smokvona, T., Langella, P., Lecuit, M. and Cossart, P., 2012. Impact of lactobacilli on orally acquired listeriosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 16684-16689.
- Ayeni, F.A., Sánchez, B., Adeniyi, B.A., de los Reyes-Gavilán, C.G., Margolles, A. and Ruas-Madiedo, P., 2011. Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. *International Journal of Food Microbiology* 147: 97-104.
- Aymerich, T., Garriga, M., Monfort, J.M., Nes, I. and Hugas, M., 2000. Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. *Food Microbiology* 17: 33-45.
- Bouchard, D.S., Rault, L., Berkova, N., Le Loir, Y. and Even, S. 2013. Inhibition of *Staphylococcus aureus* invasion into bovine mammary epithelial cells by contact with live *Lactobacillus casei*. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 877-885.

- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrockh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I.B., Prajapati, J.B., Seto, Y., Schure, E.T., van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijelaars, S. and Hansen, E.B., 2012. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology* 154: 87-97.
- Collado, M.C., Gueimonde, M., Hernández, M., Sanz, Y. and Salminen, S., 2005. Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection* 68: 2672-2678. Collado, M.C., Meriluoto, J., and Salminen, S., 2007. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology* 45: 454-460.
- Corr, S.C., Gahan, C.G.M. and Hill, C., 2007. Impact of selected *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species on *Listeria monocytogenes* infection and the mucosal immune response. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 50: 380-388.
- EFSA, 2014. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 12: 3547-3859.
- FAO/WHO, 2006. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutrition paper 85.
- Garriga, M., Aymerich, M.T., Costa, S., Monfort, J.M. and Hugas, M., 2002. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiology* 19: 509-518.
- Gueimonde, M., Jalonen, L., He, F., Hiramatsu, M. and Salminen, S., 2006. Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food Research International* 39: 467-471.
- Handley, P.S., Harty, D.W.S., Wyatt, J.E., Brown, C.R., Doran, J.P. and Gibbs, A.C.C., 1987. A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*. *Journal of General Microbiology* 133: 3207-3217.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. and Monfort, J.M., 1995. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *Journal of Applied Bacteriology* 79: 322-330.
- Jaradat, Z.W., Wampler, J.L. and Bhunia, A.K., 2003. A *Listeria* adhesion protein-deficient *Listeria monocytogenes* strain shows reduced

- adhesion primarily to intestinal cell lines. *Medical Microbiology and Immunology* 192: 85-91.
- Laparra, J.M. and Sanz, Y., 2009. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiology* 49: 695-701.
- Lavilla-Lerma, L., Pérez-Pulido, R., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. and Valdivia, E., 2013. Characterization of functional, safety, and gut survival related characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from farmhouse goat's milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 163: 136-145.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J. and De Kersmaecker, S.C.J., 2010. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 8: 171-184.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Vélez, M.P., Vanderleyden, J. and De Kersmaecker, S.C.J., 2007. Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strains *Lactobacillus rhamonosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6768-6775.
- Leroy, F. and De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Science Technology* 15: 67-78.
- Lim, S.M. and Im, D.S., 2012. Inhibitory effects of antagonistic compounds produced from *Lactobacillus brevis* MLK27 on adhesion of *Listeria monocytogenes* KCTC3569 to HT-29 cells. *Food Science and Biotechnology* 21: 775-784.
- Milillo, S.R., Friedly, E.C., Saldivar, J.C., Muthaiyan, A., O'Bryan, C., Crandall, P.G., Johnson, M.G. and Ricke, S.C., 2012. A Review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 52: 712-725.
- Moroni, S.R., Kheadr, E., Boutin, Y., Lacroix, C. and Fliss, I., 2006. Inactivation of adhesion and invasion of food-borne *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Bifidobacterium* strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 6894-6901.
- Nakamura, S., Kuda, T., An, C., Kanno, T., Takahashi, H. and Kimura, B., 2012. Inhibitory effects of *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 isolated from narezushi, a fermented fish with rice, on *Listeria monocytogenes* infection to Caco2 cells and A/J mice. *Anaerobe* 18: 19-24.

- Nikolic, M., López, P., Strahinic, I., Suárez, A., Kojic, M., Fernández-García, M., Topisirovic, L., Golic, N. and Ruas-Madiedo, P., 2012. Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 158: 155-162.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C. and Salminen, S., 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal* 9: 43-52.
- Rubio, R., Bover-Cid, S., Martín, B., Garriga, M. and Aymerich, T., 2013. Assessment of safe enterococci as bioprotective cultures in low-acid fermented sausages combined with high hydrostatic pressure. *Food Microbiology* 33: 158-165.
- Rubio, R., Jofré, A., Aymerich, T., Guàrdia, M.D. and Garriga, M., 2014a. Nutritionally enhanced fermented sausages as a vehicle for potential probiotic lactobacilli delivery. *Meat Science* 96: 937-942.
- Rubio, R., Jofré, A., Martín, B., Aymerich, T. and Garriga, M., 2014b. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiology* 38: 303-311.
- Schachtsiek, M., Hammes, W.P. and Hertel, C. 2004. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 7078-7085.
- Tuomola, E.M. and Salminen, S.J., 1998. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology* 41: 45-51.
- Työppönen, S., Petäjä, E. and Mattila-Sandholm, T., 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology* 83: 233-244.
- Vandevoorde, L., Christiaens, H. and Verstraete, W., 1992. Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 214-219.
- Vizoso-Pinto, M.G., Schuster, T., Briviba, K., Watzl, B., Holzapfel, W.H. and Franz, C.M.A.P., 2007. Adhesive and chemokine stimulatory properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Journal of Food Protection* 70: 125-134.
- Walter, J., Schwab, C., Loach, D.M., Gänzle, M.G. and Tannock, G.W. 2008. Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, *in vitro* biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology* 154: 72-80.

Xu, H., Jeong, H.S., Lee, H.Y. and Ahn, J., 2009. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in Applied Microbiology* 49: 434-442.

Figure legends

Figure 1. Adhesion percentage of LAB strains and the pathogen *Listeria monocytogenes* CTC1034 to the human colonocyte-like HT29 monolayer. The strain *Lactobacillus rhamnosus* GG (LMG18243) was used as reference. Differences in adhesion among strains were assessed by means of one-way ANOVA. Bars that do not share a common letter are significantly different according to the mean comparison LSD (less significant difference, $p < 0.05$) test.

Figure 2. Changes in the adhesion of the pathogen *Listeria monocytogenes* CTC1034 to the human colonocyte-like HT29 monolayer in experiments of competition (black bar), inhibition (light-grey bar) and exclusion (dark-grey bar) with five LAB strains. For each LAB strain, one-way ANOVA test was performed to assess the differences of listeria adhesion among the experimental conditions with respect to the adhesion of the listeria added alone (control). Within the same LAB strain, bars that have an asterisk are significantly different ($p < 0.05$) from the control. The coefficients of variation ($100 \times \text{SD}/\text{mean}$) of the adhesion data ranged between 3% and 29%. Positive values in the Y-axis indicate increases in listeria adhesion to the HT29, with respect to listeria adhered alone (control), whilst negative values indicate decreases of adhesion.

Figure 1.

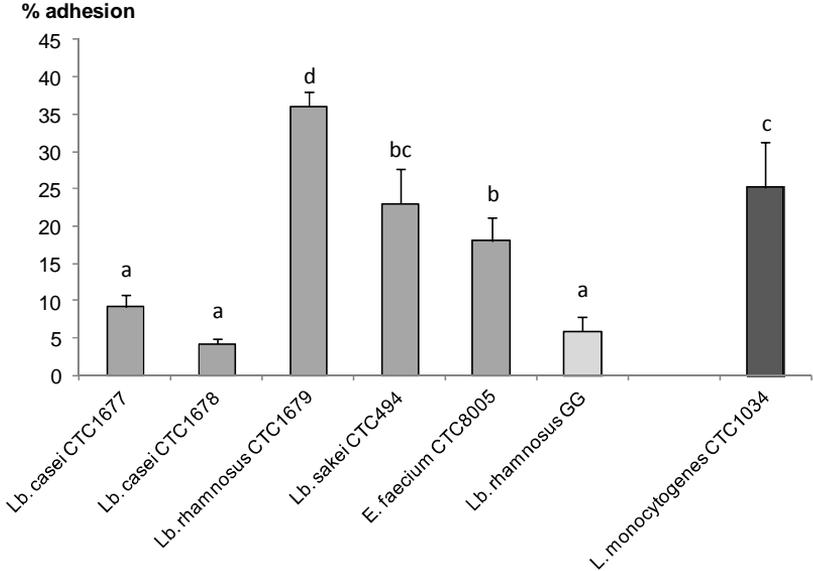
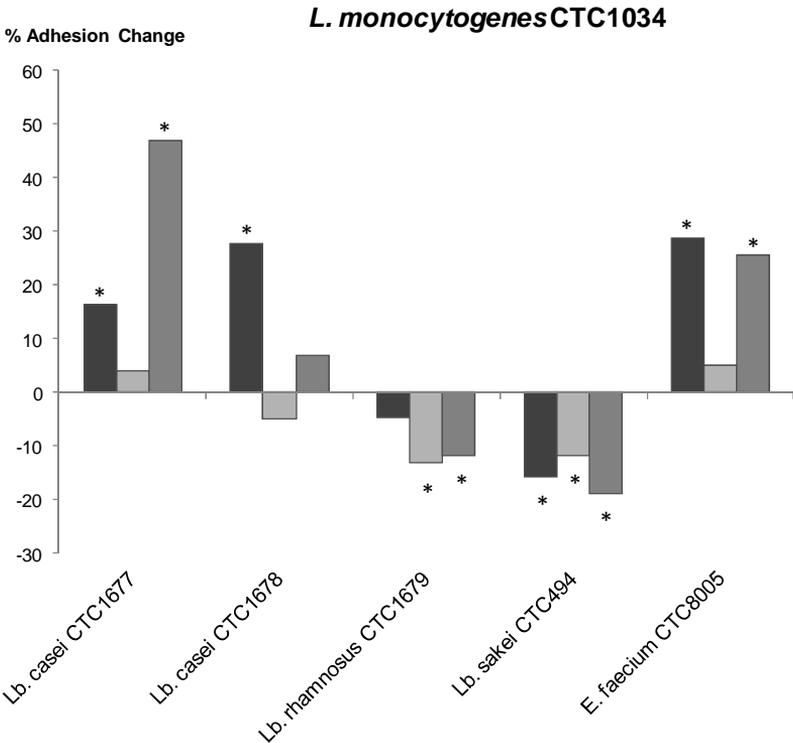


Figure 2.



- 4. The potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679 survives the passage through the gastrointestinal tract and its use as starter culture results in safe nutritionally enhanced fermented sausages.**

Rubio, R., Martín, B., Aymerich, T., Garriga, M. (2014).
International Journal of Food Microbiology 186, 55-60.

Raquel Rubio, Belén Martín, Teresa Aymerich, Margarita Garriga. "The potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679 survives the passage through the gastrointestinal tract and its use as starter culture results in safe nutritionally enhanced fermented sausages". *International journal of food microbiology*. Vol. 186, 1 (September 2014) : p. 55-60

Received 2 April 2014, Revised 28 May 2014, Accepted 13 June 2014

Available online 20 June 2014

Copyright © 2014 Elsevier B.V. All rights reserved

DOI: <http://10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.013>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160514002979>

Abstract

The human-derived potential probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679 was used as a starter culture in reduced fat and sodium low-acid fermented sausages (*fuets*) to assess its ability to survive through the gastrointestinal tract (GIT) in a human intervention study consisting of 5 healthy volunteers who consumed 25 g *fuet* a day for 21 days. Faecal samples were analysed during and after consumption. *L.rhamnosus* CTC1679 produced a transient colonisation of the human GIT and persisted during the ingestion period of *fuet* containing *L. rhamnosus* CTC1679 at levels *ca.* 8 log CFU/g. After 3 days of non-consumption, the strain was still recovered in the faeces of all the volunteers.

To evaluate the safety of the nutritionally enhanced manufactured *fuets*, a challenge test was designed in a separately manufactured batch.

L. rhamnosus CTC1679 was able to grow, survive and dominate (levels *ca.* 10⁸ CFU/g) the endogenous lactic acid bacteria (LAB), prevented the growth of *Listeria monocytogenes* throughout the whole ripening process of the *fuets* and eliminated *Salmonella*. After 35 days of storage at 4 °C, *L. monocytogenes* was not detected, achieving absence in 25 g of the product. The application of high hydrostatic pressure (HHP) treatment (600 MPa for 5 min) at the end of ripening (day 14) produced an immediate reduction of *L.monocytogenes* to levels < 1 log CFU/g. After 35 days of storage at 4 °C the pathogen was not detected.

Thus, the strain *L. rhamnosus* CTC1679 is a suitable starter culture for producing safe potentially probiotic fermented sausages.

Highlights

- *L. rhamnosus* CTC1679 was able to dominate the endogenous LAB in fuets.
- Fuets fermented with *L. rhamnosus* CTC1679 were microbiologically safe.
- HHP treatment after ripening produced an immediate reduction of *L. monocytogenes*.
- *L. rhamnosus* CTC1679 was able to survive and persist in the human GIT.

Keywords

- Fermented sausages;
- Lactobacilli;
- Foodborne pathogens;
- High hydrostatic pressure;
- Challenge test;
- Intervention study

6. DISCUSIÓN GENERAL

6. Discusión General

Los alimentos funcionales son aquellos obtenidos por diversos procedimientos, con la característica particular de que alguno de sus componentes, sea o no nutriente, afecta a funciones diana del organismo, de manera específica y positiva, y promueve un efecto fisiológico o psicológico más allá de su valor nutritivo tradicional. El efecto positivo de un alimento funcional puede ser tanto por su contribución al mantenimiento del estado de la salud y bienestar como por la reducción del riesgo de padecer una determinada enfermedad (Diplock *et al.*, 1999). Un alimento funcional puede ser un alimento natural o modificado (alterando, añadiendo o eliminando uno o varios de sus componentes) o una combinación de ambos. Todo ello permite a las industrias alimentarias el desarrollo de nuevos productos con un valor potencial añadido en el mercado, contribuyendo a la mejora de la calidad de la dieta y a la selección de alimentos que pueden afectar positivamente la salud y el bienestar del consumidor. En este sentido, con el objetivo final de obtener cepas de *Lactobacillus* potencialmente probióticas para su inclusión como cultivos iniciadores en un EFC de baja acidez tipo fuet nutricionalmente mejorado (reducido en sal y grasa), que permita la obtención de un producto funcional, seguro y con características sensoriales aceptables, la presente Tesis Doctoral consta de tres partes encadenadas en una secuencia lógica:

1. Aislamiento, caracterización molecular, identificación y caracterización *in vitro* (tecnológica, funcional y de seguridad) de cepas aisladas de heces de lactantes (Artículo 1).
2. Elaboración de embutidos fermentado-curados de baja acidez nutricionalmente mejorados, potencialmente probióticos y seguros (Artículos 2 y 4).
3. Estudio sobre la potencialidad de colonización del TGI de las cepas con potencial como probiótico y como cultivo iniciador en EFC y ensayo preliminar de intervención en humanos con la cepa más prometedora (*L. rhamnosus* CTC1679), seleccionada por su potencial como probiótico y como cultivo iniciador en un EFC, así como por su capacidad de adhesión a las células de la monocapa de HT29 (Artículos 3 y 4).

1. Aislamiento, caracterización molecular, identificación y caracterización *in vitro* (tecnológica, de seguridad y funcional) de cepas de BAL procedentes de lactantes

De acuerdo con las recomendaciones establecidas por la FAO/OMS (2002) para la evaluación de microorganismos probióticos, se identificaron a nivel de especie cepas aisladas de heces de lactantes (N= 43) y se estudiaron diversas características tecnológicas, funcionales y de seguridad *in vitro* con el fin de seleccionar aquellas que poseyeran las mejores propiedades para su uso como cultivos iniciadores en EFC de baja acidez tipo fuet.

1.1 Aislamiento, caracterización molecular e identificación de los aislados

La microbiota intestinal está compuesta por una amplia variedad de microorganismos que intervienen en procesos tan importantes como la función intestinal y la maduración del sistema inmunitario. Un determinante esencial en la elección de microorganismos probióticos es su capacidad para sobrevivir y persistir en las condiciones ambientales existentes durante el tránsito por el aparato digestivo y de colonizar el TGI. Por ello, en la presente Tesis Doctoral, se estableció la estrategia de aislar microorganismos potencialmente probióticos de heces de lactantes de hasta 6 meses de edad (cumpliendo con el criterio de la FAO de procedencia humana), fuente excelente de BAL, con el fin de garantizar, en principio, dada su procedencia, su implantación en el TGI humano.

Durante la etapa fetal el intestino se encuentra estéril y, al nacer, cuando los neonatos son expuestos a microorganismos de origen materno y del medio externo, es cuando tiene lugar la colonización de su intestino (Rivera Tapia, 2002). La composición inicial de la microbiota del TGI se determina desde el nacimiento y depende fundamentalmente de dos factores: el tipo de parto y la alimentación (Fanaro *et al.*, 2003). La leche materna es considerada una fuente excelente de lactobacilos para el intestino del lactante. Ahrné *et al.* (2005) observaron una presencia más elevada de especies del género *Lactobacillus* en heces de lactantes alimentados con leche materna que en los alimentados con fórmula. En el presente estudio no se pudo realizar esta comparación dado que

6. Discusión General

el número de muestras procedentes de lactantes alimentados con leche de fórmula y alimentación mixta no fue representativo (4 y 8, respectivamente, en comparación con las 31 muestras de alimentados exclusivamente con leche materna) (Artículo 1).

La correcta identificación de los aislados, tanto a nivel de especie como de cepa, fue el primer paso realizado en este estudio, esencial para garantizar que se trata de microorganismos presumiblemente inocuos clasificados como QPS (*Qualified Presumption of Safety*) (EFSA, 2007). Esta calificación sería equiparable al GRAS (*Generally Recognised As Safe*) de la FDA (1997) en los EE.UU. Los efectos beneficiosos de un probiótico no se pueden atribuir de forma generalizada a un género o especie, sino que son exclusivos de cada cepa. Por esta razón, es fundamental su correcta identificación mediante métodos de caracterización fenotípica y genotípica, con el fin de asociar un determinado efecto a una cepa concreta y poder realizar su seguimiento en posteriores estudios tecnológicos, clínicos y epidemiológicos (Sanz *et al.*, 2003). Para ello, se evaluó la diversidad genética de los 109 aislados totales de BAL obtenidos de heces de lactantes con edades ≤ 6 meses mediante la técnica molecular RAPD-PCR, extensamente empleada como un método rápido y sensible para la tipificación genética de cepas de diferentes especies de BAL (Ben Amor *et al.*, 2007). Esta técnica permitió el establecimiento de 60 perfiles diferentes que fueron posteriormente identificados a nivel de especie mediante la secuenciación parcial del ADN (Artículo 1). Se empleó el gen ARNr 16S para todos los aislados y, en los casos en los que esta secuenciación parcial no permitió identificar el aislado hasta el nivel de especie, se emplearon otras dianas génicas más específicas: los genes *pheS* (Naser *et al.*, 2005) y/o *cpn60* (Brousseau *et al.*, 2001) para *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Weissella* y el gen *SodA* (Poyart *et al.*, 2000) para *Streptococcus*. Así, de los 109 aislados totales, el género predominante fue *Lactobacillus* (48% del total de aislados), con las siguientes especies: *L. gasseri*, 21%; *L. casei/paracasei*, 10%; *L. fermentum* 9%; *L. rhamnosus*, 5%; *Lactobacillus oris*, 2% y *Lactobacillus vaginalis*, 1%. También fueron detectadas cepas del género *Enterococcus* (38%), todas pertenecientes a la especie *Enterococcus faecalis*, y de otros géneros minoritarios como *Streptococcus* (11%), pertenecientes a las especies *Streptococcus pasteurianus*,

Streptococcus salivarius, *Streptococcus lutetiensis* y *Streptococcus gallolyticus*, y *Weissella* (3%), todas de la especie *Weissella paramesenteroides*. La secuenciación de las dianas génicas propuestas no permitió distinguir entre las especies de *L. casei* y *L. paracasei*, dificultad puesta de manifiesto también por otros autores (Dellaglio *et al.*, 2002). Algunos autores consideran incluso eliminar la especie *L. paracasei* y unificar las dos especies en una sola bajo el nombre de *L. casei* (Collins *et al.*, 1989; Dicks *et al.*, 1996). En esta Tesis se ha usado la denominación *L. casei/paracasei* para estas especies.

Aunque algunos individuos presentaban más diversidad intraespecífica que otros, en la mayoría de los casos las cepas de un mismo lactante se mostraron idénticas o estrechamente relacionadas entre sí. *L. gasseri* fue la especie de lactobacilo mayoritariamente detectada en este estudio y, como la gran mayoría de aislados (82 de los 109 totales) provenían de heces de lactantes alimentados exclusivamente con leche materna, ésta podría ser la vía principal de ingestión. Martín *et al.* (2003), en un estudio realizado con 8 mujeres y sus hijos recién nacidos, demostraron la presencia de bacterias en la leche y su papel en la colonización del intestino del lactante, observando que ciertas cepas de *L. gasseri* se podían aislar simultáneamente de las muestras de leche, aureola mamaria, cavidad oral infantil y heces proporcionadas por una misma pareja madre-hijo. Los resultados de esta Tesis concuerdan también con los obtenidos por Ahrné *et al.* (2005) y Solís *et al.* (2010), que también encontraron *L. gasseri* como especie predominante en heces de lactantes alimentados con leche materna.

Lactobacillus y *Enterococcus* fueron los principales géneros aislados de las heces de lactantes (48 y 38%, respectivamente, del total de aislados). Éstos, aparte de ser componentes importantes de la microbiota del TGI humano, son los más relevantes en EFC de baja acidez, alcanzando recuentos de hasta 10^8 y $>10^4$ UFC/g, respectivamente (Aymerich *et al.*, 2003). No obstante, si bien se reconoce mayoritariamente la importancia del papel tecnológico de los lactobacilos en este tipo de productos cárnicos, la presencia de enterococos en alimentos es controvertida: mientras que, por un lado, han sido utilizados como cultivos iniciadores en la elaboración de queso (Centeno *et al.*, 1999; Bouton *et al.*, 2009) y como cultivos bioprotectores en productos cárnicos (Aymerich *et al.*,

2000; Rubio *et al.*, 2013b), por otro, ciertas cepas virulentas han sido asociadas con infecciones nosocomiales (Kayser, 2003), el deterioro de alimentos (Franz *et al.*, 1999), la propagación de resistencias antibióticas a través de la cadena alimentaria (Giraffa, 2002; Rizzotti *et al.*, 2005) y la producción de aminas biógenas (Gardini *et al.*, 2001; Giraffa, 2002). Por tanto, existe un debate acerca del uso de enterococos como parte de cultivos iniciadores para fermentaciones en la industria alimentaria, así como su utilización como probióticos en humanos (Franz *et al.*, 2003) y, por todo ello, los enterococos como género no están reconocidos como microorganismos QPS (EFSA, 2007). Si se quiere introducir cepas concretas como cultivos iniciadores, protectores adjuntos y/o probióticos debe confirmarse previamente, y de forma muy rigurosa, la inocuidad y seguridad para el consumo humano de dichas cepas (carencia de factores de virulencia y sensibilidad a antibióticos de interés clínico) (Franz *et al.*, 2001; Hummel *et al.*, 2007). Así, por todo esto y, como el objetivo final de este trabajo de Tesis era obtener cultivos iniciadores potencialmente probióticos para su uso en EFC, los posteriores estudios *in vitro* de caracterización tecnológica, funcional y de seguridad se centraron en las cepas de *Lactobacillus* que, además de ser el género de las BAL que predomina en los EFC y los responsables de la disminución del pH durante la fermentación de los EFC (Hugas *et al.*, 1993), se encuentra comúnmente presente en la microbiota del TGI humano y ha recibido considerable atención por sus propiedades probióticas y sus beneficios sobre la salud (Walter *et al.*, 2000).

1.2 Caracterización *in vitro* (tecnológica, funcional y de seguridad)

A partir de estudios *in vitro* de las propiedades tecnológicas, funcionales y de seguridad, se llevó a cabo un proceso de selección, partiendo de un total de 23 cepas de *Lactobacillus*, que permitió preseleccionar aquellas que presentaban mayor potencial como cultivo iniciador y como probiótico en EFC. Los primeros criterios que se aplicaron fueron los de aspecto tecnológico, pues aunque una cepa tenga muy buenas propiedades probióticas, si su aplicación no es viable tecnológicamente nunca llegará al intestino del consumidor en los niveles suficientes para ejercer su función como probiótico. Fue en esta fase de selección con criterios tecnológicos donde se descartaron la mayor cantidad de

cepas. De forma paralela a los ensayos de caracterización tecnológica, se evaluaron los criterios funcionales y, por último, se tuvieron en cuenta los criterios de seguridad, para descartar así las cepas que tuvieran una dudosa seguridad.

1.2.1 Caracterización tecnológica

La viabilidad de una cepa probiótica, uno de los prerrequisitos fundamentales para garantizar su funcionalidad, puede resultar seriamente afectada por la formulación de la matriz alimentaria que le sirve como vehículo (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002). La capacidad de supervivencia de las cepas potencialmente probióticas en los productos cárnicos fermentados va a estar condicionada por la composición inicial del producto y por los cambios en las características físico-químicas que ocurren durante el procesado de estos productos, y se considera que es cepa-dependiente. Por lo tanto, para que un microorganismo probiótico pueda alcanzar en el momento del consumo niveles de células viables suficientes en el producto, requisito necesario para ejercer sus efectos beneficiosos en el huésped, es indispensable la selección de un microorganismo adaptado a las condiciones del procesado de los productos cárnicos fermentados (De Vuyst *et al.*, 2008; Ruiz-Moyano *et al.*, 2008). Por esta razón, el primer criterio de selección aplicado en la presente Tesis fue el tecnológico, realizándose ensayos de viabilidad *in vitro* mediante el crecimiento en las condiciones de fermentación de un EFC. Además, también se estudió el antagonismo frente a los patógenos alimentarios *L. monocytogenes* y *Salmonella* (importante para la conservación y seguridad alimentaria del producto) y la presencia de determinadas actividades enzimáticas implicadas en el desarrollo del sabor y del aroma durante el proceso de maduración de este tipo de productos.

Para simular la capacidad de supervivencia a las condiciones de procesado de un EFC tradicional, se evaluó la capacidad de crecimiento *in vitro* en caldo de cultivo MRS suplementado con nitrito de sodio (MRS-Ni) o cloruro de sodio (MRS-sal) añadidos en las cantidades correspondientes a la formulación de un EFC tradicional (0,15 y 25 g/kg, respectivamente) a través de cinéticas de crecimiento mediante lectura de absorbancia en un espectrofotómetro de placas

6. Discusión General

(Bioscreen C) a 37°C (temperatura óptima de crecimiento de las cepas ensayadas) (Artículo 1). De las 23 cepas ensayadas, 18 de ellas fueron capaces de crecer en MRS-sal, aunque los valores de velocidad de crecimiento y tiempo de detección disminuyeron y aumentaron ($p < 0,05$), respectivamente, cuando se compararon con los valores obtenidos en el caldo MRS-control (sin ningún suplemento añadido). Así, estas 18 cepas fueron las seleccionadas para realizar el mismo experimento a 20°C (temperatura usada habitualmente en la fermentación de EFC) (Artículo 1). De las 18 cepas seleccionadas, se pudo observar que ninguna cepa de *L. gasseri* (5) ni *L. oris* (1) fue capaz de crecer a 20°C en caldo MRS-control ni en MRS-Ni, descartándose así para los posteriores ensayo con MRS-sal y MRS-mix (caldo MRS suplementado con las cantidades de glucosa, nitrito de sodio y cloruro de sodio correspondientes a las que contiene un EFC tradicional). Así, estos últimos ensayos a 20°C (MRS-sal y MRS-mix), se realizaron con las 12 cepas resultantes: 3 cepas de *L. fermentum* (CTC1693, CTC1695 y CTC1696), 3 cepas de *L. rhamnosus* (CTC1708, CTC1709 y CTC1679) y 6 cepas de *L. casei/paracasei* (CTC1677, CTC1678, CTC1705, CTC1706, CTC1707, CTC1675). Las 12 cepas fueron capaces de crecer en MRS-sal y MRS-mix, siendo preseleccionadas para posteriores ensayos *in vitro*. Además, las 6 cepas de *L. casei/paracasei* y la cepa *L. rhamnosus* CTC1679 mostraron valores de velocidad de crecimiento sin diferencias significativas ($p > 0,05$) en los medios MRS-control, MRS-sal y MRS-mix, hecho que podría confirmar su posible adaptación durante el proceso de maduración y su potencial como cultivos iniciadores en EFC. Coincidiendo con los estudios realizados por Papamanoli *et al.* (2003) y Hugas *et al.* (1993), el crecimiento a diferentes temperaturas y la tolerancia a la sal podría ser cepa-dependiente. Por lo general, los resultados obtenidos mostraron que la presencia de NaCl disminuyó la capacidad de crecimiento de las cepas, demostrando, como ya habían observado otros autores, que la tolerancia al NaCl durante el procesado de EFC es una característica importante para la selección de cultivos iniciadores (Rovira *et al.*, 1997; Bonomo *et al.*, 2008). El uso de cultivos bioprotectores de BAL bacteriocinogénicas junto con otros métodos de conservación permite conseguir barreras adicionales para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y deteriorantes en una gran variedad de

productos (Hugas, 2001). Es por ello que la actividad antimicrobiana frente a este tipo de microorganismos es una característica tecnológica interesante a tener en cuenta en las cepas que se quieran emplear como cultivos iniciadores en EFC para aumentar la seguridad alimentaria del producto. En la presente Tesis, la actividad antimicrobiana se evaluó *in vitro* de forma directa e indirecta mediante el método de la gota en agar (Tagg *et al.*, 1976; Schillinger y Lücke, 1989) en las 23 cepas de *Lactobacillus*, frente a los patógenos alimentarios *L. monocytogenes* y *Salmonella* (actividad deseable) y frente a la microbiota tecnológica (cultivo iniciador *Lactobacillus sakei* CTC494) (actividad no deseable) (Artículo 1). Los resultados

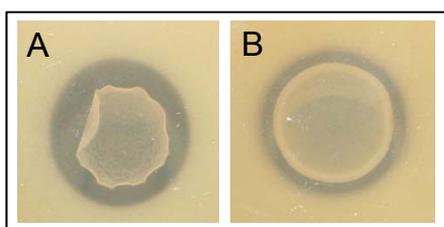


Fig. 2. Halos de inhibición de la cepa *L. gasseri* CTC1700 en el antagonismo indirecto frente a *L. monocytogenes* (A) y *Salmonella* (B).

mostraron que, de todas las cepas, sólo las pertenecientes a la especie *L. gasseri* (8) tenían capacidad antagonista (sólo en antagonismo indirecto) frente a los patógenos *L. monocytogenes* y *Salmonella* (Fig. 2). La actividad inhibitoria observada en el antagonismo indirecto podría ser debida

a la producción de ácidos orgánicos y no a la producción de una potencial bacteriocina termoestable, puesto que los sobrenadantes de los cultivos de *L. gasseri* neutralizados y pasteurizados a 95°C durante 10 min no mostraron actividad antimicrobiana. El peróxido de hidrógeno también podría actuar como sustancia inhibidora, pero la incubación de las placas en condiciones anaeróbicas descartó esta hipótesis. En otros estudios realizados por Toba *et al.* (1991) y Kawai *et al.* (2004), se obtuvieron cepas de *L. gasseri* aisladas de heces de infantes con capacidad para producir bacteriocinas. En nuestro caso, la producción de sustancias antimicrobianas (p.e: ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno), aparte de su importancia desde el punto de vista tecnológico en la conservación del alimento y de seguridad alimentaria (antagonismo frente a patógenos y competitividad frente a otras BAL endógenas), también es una propiedad importante por su implicación en la protección frente a infecciones en el TGI, pudiendo impedir la presencia y/o crecimiento de patógenos en las mucosas. Sin embargo, aunque la producción

6. Discusión General

in vitro de sustancias antimicrobianas ha sido una propiedad particularmente investigada entre las BAL probióticas, prácticamente no existen estudios sobre su síntesis *in vivo* en el TGI.

Por otro lado, también se evaluó la compatibilidad de las cepas de *Lactobacillus* con *L. sakei* CTC494 (Artículo 1), reconocido cultivo iniciador bacteriocinogénico, y se observó que en el antagonismo directo no fue inhibido por ninguna de ellas. Por tanto, sería posible utilizar estas cepas de *L. gasseri* como cultivos bioprotectores en EFC, bien como cultivos únicos o en co-cultivo junto a la cepa CTC494, previa valoración de su idoneidad. De este ensayo, se consideraron interesantes y se preseleccionaron para ensayos posteriores dos de las cepas de *L. gasseri* que presentaron mayor halo de inhibición en el antagonismo frente a los patógenos estudiados (CTC1700 y CTC1704).

La presencia de determinadas actividades enzimáticas en BAL empleadas como cultivos iniciadores en embutidos fermentados puede jugar un papel importante al contribuir en el sabor y el aroma durante el proceso de maduración de este tipo de productos. Por este motivo, se evaluaron distintas actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo de los lípidos, aminoácidos, proteínas y carbohidratos mediante perfiles enzimáticos obtenidos por el sistema Api-Zym de las cepas preseleccionadas a partir de los resultados obtenidos del crecimiento en las condiciones simuladas del proceso de fermentación y del antagonismo frente a patógenos (Artículo 1). En ninguna de las cepas testadas se detectó actividad lipolítica, confirmando la baja actividad lipolítica del género *Lactobacillus* (Montel *et al.*, 1998). De hecho, se conoce que las lipasas y fosfolipasas musculares son las principales responsables de la lipólisis en productos cárnicos (Vestergaard *et al.*, 2000), dado que las de origen microbiano presentan una actividad lipolítica muy escasa bajo las condiciones del proceso de maduración (Demeyer *et al.*, 2000). Asimismo, en la selección de bacterias para su uso como cultivos iniciadores en la elaboración de EFC es interesante la elección de cepas con ligera actividad proteolítica para la obtención de productos con características sensoriales adecuadas, ya que la hidrólisis de las proteínas contribuye en el desarrollo de péptidos y aminoácidos libres que influyen directamente en el aroma y sabor del producto final (Papamanoli *et al.*, 2003). En este sentido, se detectó la presencia de las enzimas leucina y valina

arilamidasa en todas las cepas de *L. rhamnosus* y *L. casei/paracasei* ensayadas. Según Montel *et al.* (1998), el pH de los EFC parece ser un factor limitante en la degradación de la leucina a través de las bacterias dado que a valores de pH inferiores a 5,8 las reacciones metabólicas bacterianas se ven desfavorecidas. No obstante, al tratarse de EFC de baja acidez (pH 5,3-6,2), la presencia de estas enzimas hace que estas cepas sean interesantes para su uso como cultivos iniciadores en este tipo de embutidos.

1.2.2 Caracterización funcional

La capacidad de las bacterias para sobrevivir y crecer en un nicho determinado depende de las condiciones biológicas y físico-químicas del ecosistema en particular. En este sentido, las bacterias probióticas, para mantener la viabilidad en las condiciones ambientales del TGI, donde ejercerán su función, tienen que ser resistentes a las condiciones extremas de este ambiente como son la acidez gástrica y la presencia de sales biliares y pancreatina. Además, se recomienda que las cepas sean de origen humano, ya que se implantarían o colonizarían el epitelio gastrointestinal humano con mayor facilidad que las aisladas de otras fuentes (Holzapfel *et al.*, 1998; Ouwehand *et al.*, 1999). Asimismo, y relacionado con la colonización del TGI, es deseable que las bacterias probióticas presenten capacidad de auto-agregación (Del Re *et al.*, 2000). También la protección frente a gastroenteritis u otras infecciones bacterianas que afectan al TGI del individuo, relacionado con el antagonismo frente a patógenos, es otro de los reclamos asociados al consumo de probióticos. Numerosos estudios han demostrado que las bacterias del género *Lactobacillus* constituyen una barrera microbiológica frente a las infecciones, poniendo de manifiesto el papel de los probióticos en la prevención y/o tratamiento de infecciones del TGI (Saavedra *et al.*, 1994; Guarino *et al.*, 1997; Salminen *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2002). Con estas premisas, se realizaron una serie de ensayos *in vitro* simulando las condiciones del TGI y se evaluó la capacidad de auto-agregación de las cepas de *Lactobacillus*.

Las 23 cepas de *Lactobacillus* demostraron una buena capacidad de supervivencia a las condiciones del TGI (crecimiento en presencia de sales biliares, de pancreatina y a pH ácido), resultado esperable dado la procedencia

6. Discusión General

intestinal de las cepas ensayadas (Artículo 1). Todas las cepas de *Lactobacillus* crecieron en presencia de sales biliares y todas ellas presentaron una supervivencia superior al 80% después de 3 horas de exposición a un pH de 3,5 y en medio con pancreatina. De forma similar, Prasad *et al.* (1998) demostraron una supervivencia superior al 80% de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* expuestas durante 3 horas a pH 3,0. Sin embargo, cabe remarcar que la viabilidad de las bacterias probióticas, a igualdad de pH, podría ser mayor en condiciones fisiológicas que en las soluciones en que se llevan a cabo los ensayos *in vitro* debido a que los constituyentes no ácidos de la secreción gástrica y los componentes de los alimentos pueden ejercer un efecto protector sobre los microorganismos durante su paso por el estómago (Conway *et al.*, 1987; Prasad *et al.*, 1998).

Por último, se realizó el ensayo de auto-agregación (capacidad de las células bacterianas de una cepa determinada para interactuar entre sí), realizado con las cepas preseleccionadas a partir de los ensayos *in vitro* de supervivencia a las condiciones de procesamiento de los EFC y del antagonismo frente a patógenos.

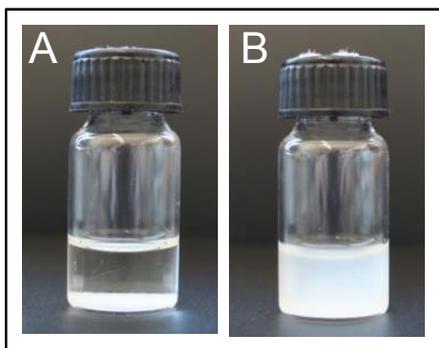


Fig. 3. Resultados del test de auto-agregación para las cepas *L. rhamnosus* CTC1679 (+) (A) y *L. casei/paracasei* CTC1707 (-) (B).

La capacidad de auto-agregación de las cepas usadas como probióticos parece ser una propiedad necesaria para que se dé la adhesión a las células epiteliales del intestino (Kos *et al.*, 2003). Tal y como se muestra en el Artículo 1, las cepas *L. fermentum* CTC1693, *L. gasseri* CTC1700 y CTC1704 y *L. rhamnosus* CTC1708, CTC1709 y CTC1679 presentaron una elevada capacidad de auto-agregación (valores positivos después de 2 horas

en contacto). Por el contrario, dos de las cepas de *L. casei/paracasei* testadas (CTC1677 y CTC1706) manifestaron valores positivos después de 20 horas en contacto, mostrando así una capacidad de auto-agregación más baja. En la Fig. 3 se muestra un ejemplo para valores de auto-agregación positivo y negativo.

1.2.3 Estudios de bioseguridad

Gracias a su largo historial de consumo, los lactobacilos son considerados como microorganismos seguros. Sin embargo, se ha reportado eventualmente el aislamiento de ciertas cepas de *Lactobacillus* en el torrente sanguíneo y como agentes de infecciones locales, en episodios generalmente asociados a individuos inmunocomprometidos (Husni *et al.*, 1997; Ishibashi y Yamakazi, 2001; Cannon *et al.*, 2005; Salminen *et al.*, 2006). Las especies de *Lactobacillus*, por lo general, poseen estatus QPS (EFSA, 2007). Este estatus se otorga a especies de microorganismos para las que existe un amplio historial de uso seguro en alimentación y cuyo consumo no representa ningún riesgo para la salud, basado en la identidad de la especie, el conocimiento científico de la misma, los datos de patogenicidad y los usos finales. La lista de microorganismos QPS está sujeta a una revisión al menos anual, aunque en caso necesario se pueden realizar revisiones más frecuentes si existe un requerimiento formal. La última lista se publicó en octubre de 2013 (EFSA, 2013). En esta Tesis, se analizó la seguridad de las cepas de *Lactobacillus* de forma individual evaluando la posible presencia de actividades enzimáticas perjudiciales para el huésped y el perfil de resistencia a antibióticos (Artículo 1). Entre las actividades bacterianas potencialmente perjudiciales por su toxicidad, se incluyen ciertas actividades enzimáticas que actúan sobre sustratos que se encuentran en el lumen intestinal, dando lugar a compuestos tóxicos como son las aminas biógenas (p.e. histamina, tiramina, putrescina, cadaverina), precursores de nitrosaminas carcinogénicas en alimentos (Bover-Cid y Holzapfel, 1999). A pesar de la importancia de las aminas biógenas, no hay una legislación específica para el establecimiento de límites legales de su presencia en productos cárnicos. Sólo existe una legislación específica para la histamina, y no para las demás aminas biógenas, y ésta es, principalmente, para pescado (Directiva 91/439/EEC). Por otro lado, la EFSA (2011b) ha fijado un límite para productos cárnicos, a niveles de 50 mg/kg para la histamina y de hasta 600 mg/kg para la tiramina.

6. Discusión General

Dado que algunos lactobacilos tienen capacidad de producir tiramina (Bover-Cid

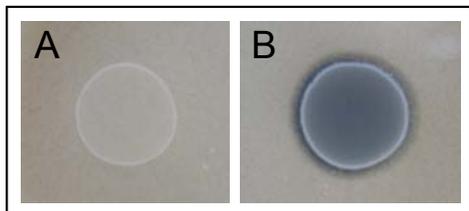


Fig. 4. *L. rhamnosus* CTC1679 (no productora de tiramina), forma un halo opaco en medio agar descarboxilasa (A); *L. oris* CTC1711 (productora de tiramina), forma un halo transparente y un cambio de color en el medio(B).

y Holzapfel, 1999), resulta conveniente evaluar esta propiedad en cualquier cepa que pretenda utilizarse en alimentos. De entre todas las cepas de *Lactobacillus*, sólo una de ellas, perteneciente a la especie *L. oris*, especie no reconocida como QPS (EFSA, 2013), mostró producción de tiramina (Fig. 4), descartándose así del estudio (Artículo 1).

La presencia de determinantes de resistencia a antibióticos genéticamente transferibles es una característica indeseable en las bacterias y, sobretudo, en aquellas que se pretenden incorporar en la cadena alimentaria, ya que una vez en el intestino, éstas podrían transferir las resistencias a otros microorganismos patógenos (Netherwood *et al.*, 1999; Teuber *et al.*, 1999). Además, las cepas resistentes a antibióticos o sus genes de resistencia pueden persistir en el TGI del huésped durante periodos relativamente prolongados, reduciendo el éxito de futuros tratamientos frente a una infección bacteriana (Jernberg *et al.*, 2010). Por esta razón, se realizó el estudio de la resistencia frente a diferentes antibióticos de las cepas de lactobacilos preseleccionadas a partir de los ensayos *in vitro* de supervivencia a las condiciones de procesado de los EFC, y de antagonismo frente a *L. monocytogenes* y *Salmonella* (Artículo 1). Los antibióticos empleados incluyeron los 10 recomendados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2008). De acuerdo con los puntos de corte (*breakpoints*) establecidos por la EFSA (2012), la gran mayoría de las cepas ensayadas fueron sensibles a los antibióticos testados y, por lo tanto, aceptables para su uso alimentario. Las dos cepas de *L. gasseri* con actividad antimicrobiana frente a patógenos (CTC1700 y CTC1704) presentaron resistencia a los antibióticos clindamicina (CMI>1 µg/ml) y kanamicina (CMI>64 µg/ml), resultados que concuerdan con los obtenidos por otros autores (Danielsen y Wind, 2003; Delgado *et al.*, 2005; Korhonen *et al.*, 2007). El hecho de que una cepa sea resistente a un antibiótico no significa necesariamente que sea peligrosa. La

resistencia intrínseca y adquirida por mutación presenta un bajo riesgo de transmisión horizontal, mientras que el riesgo de transferencia es máximo si la resistencia adquirida es mediada por genes transferibles (Ammor *et al.*, 2007). La EFSA (2012) recomienda que aquellas cepas que contienen resistencia adquirida a antimicrobianos no deberían ser utilizadas en alimentos, a menos que se pueda demostrar que la base genética de la resistencia adquirida es debido a una mutación cromosomal. De ser así, se considera generalmente aceptable a la cepa para su utilización en matrices alimentarias. De este modo, si se decidiera emplear como cultivos iniciadores de EFC alguna de estas 2 cepas de *L. gasseri*, se debería profundizar en el estudio de determinantes genéticos de resistencia a estos antibióticos (clindamicina y kanamicina) para comprobar si la resistencia observada es intrínseca o adquirida.

Anteriormente (apartado 1.2.1) se ha comentado el interés desde el punto de vista tecnológico de ciertas actividades enzimáticas en BAL empleadas como cultivos iniciadores en embutidos fermentados. Por otro lado, la presencia de algunas enzimas puede contribuir de un modo beneficioso en la salud del consumidor favoreciendo la digestión de los alimentos en el intestino o por el contrario asociarse a un posible factor de virulencia o patogenicidad en el huésped. Por ello, en la presente Tesis también se evaluó la presencia de estas enzimas mediante perfiles enzimáticos obtenidos por el sistema Api-Zym en las cepas de *Lactobacillus* preseleccionadas a partir de los ensayos *in vitro* de supervivencia a las condiciones de procesado de los EFC, y de antagonismo frente a patógenos (Artículo 1). En ninguna de las cepas ensayadas se detectaron actividades enzimáticas consideradas nocivas, tales como: actividades tripsinásicas (tripsina y α -quimiotripsina), implicadas en la patogenicidad de algunos microorganismos (Tanner *et al.*, 1985; Oakey *et al.*, 1995); actividades β -glucuronidasa y β -glucosidasa, relacionadas con el cáncer de colon al favorecer la conversión de algunos precarcinógenos en carcinógenos (Goldin, 1996; Kim y Jin, 2001; Gill y Rowland, 2002) y actividad N-acetil- β -glucosaminidasa, relacionada con la capacidad de degradación de glicoproteínas del moco intestinal (Hoskins y Boulding, 1981).

2. Elaboración de embutidos fermentado-curados de baja acidez, nutricionalmente mejorados, potencialmente probióticos y seguros

2.1 Viabilidad de cepas de *Lactobacillus* potencialmente probióticas como cultivos iniciadores de embutidos fermentado-curados de baja acidez nutricionalmente mejorados

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de caracterización *in vitro*, se preseleccionaron las 6 cepas con mayor potencial tecnológico, funcional y de seguridad (*L. casei/paracasei* CTC1677 y CTC1678, *L. gasseri* CTC1700 y CTC1704, *L. rhamnosus* CTC1679 y *L. fermentum* CTC1693), en base, sobretodo, a la supervivencia demostrada en los ensayos *in vitro* de simulación de las condiciones de procesado de los EFC y a la actividad antagonista frente a patógenos, para evaluar sus capacidades de implantación y acidificación en un ensayo preliminar de maduración utilizando un modelo de EFC (inóculo inicial ca. 10^6 UFC/g) (Artículo 1). Este modelo presentaba idéntica formulación que la masa cárnica de un embutido fermentado tradicional, se envasó al vacío para simular la embutición en tripa y se incubó a 15°C durante 9 días para simular el proceso de fermentación/maduración. Para asegurar la presencia y niveles de las cepas inoculadas como potenciales probióticas y demostrar su capacidad para competir con la microbiota autóctona presente en este tipo de productos, la competitividad de las cepas fue monitorizada mediante el análisis de perfiles de RAPD-PCR (Aymerich *et al.*, 2006) con el cebador KS (Rubio *et al.*, 2013b). Las dos cepas de *L. casei/paracasei* y la cepa de *L. rhamnosus* fueron las que alcanzaron una total implantación (recuentos entre 8,5-8,7 log UFC/g al final de la maduración) y una correcta acidificación en el modelo cárnico y, por tanto, las elegidas para ser ensayadas como cultivos iniciadores en un EFC tipo fuet nutricionalmente mejorado (contenido reducido de sal y grasa) en 2 experimentos independientes (Artículo 2). Además, también se incluyeron 3 cepas probióticas comerciales para evaluar su uso como cultivos iniciadores en el mismo tipo de embutido: *L. plantarum* 299v (Probi, Suecia), *L. rhamnosus* GG (Valio, Finlandia) y *L. casei* Shirota (Yakult, Japon) (Artículo 2). Estas tres cepas fueron aisladas de la mucosa intestinal humana y son reconocidas por su

historial seguro de uso como probióticos en humanos. *L. rhamnosus* GG es una reconocida cepa probiótica empleada en productos lácteos (Saxelin, 1997) y, en los estudios realizados por Erkkilä *et al.* (2001a,b) se confirmó como cultivo iniciador adecuado en embutidos fermentados ácidos. En otro estudio más reciente realizado por nuestro grupo, Rubio *et al.* (2013a) evaluaron la idoneidad de un EFC tipo salchichón como vehículo alimentario para el suministro de los probióticos comerciales *L. plantarum* 299v y *L. rhamnosus* GG inoculados como cultivos iniciadores a dos concentraciones diferentes (10^5 y 10^7 UFC/g). Los salchichones que contenían como cultivo iniciador *L. rhamnosus* GG (en las dos concentraciones ensayadas) y *L. plantarum* 299v (con un inóculo inicial 10^7 UFC/g), presentaron una mayor y más rápida acidificación del producto, aumentando así la seguridad higiénica del embutido, pero retardando y limitando el crecimiento de la microbiota tecnológica (CGC+), lo cual interfirió en el correcto desarrollo de las características organolépticas propias del embutido. La utilización de un inóculo inicial bajo de *L. plantarum* 299v (10^5 UFC/g), con menos capacidad acidificante que *L. rhamnosus* GG, permitió la evolución de los parámetros físico-químicos (pH y a_w) similar al del salchichón control (sin cultivo iniciador), un mejor equilibrio entre la microbiota tecnológica y microorganismos probióticos y la co-dominancia con otras BAL endógenas, favoreciendo así el correcto desarrollo de las características organolépticas y siendo el lote inoculado con microorganismos probióticos mejor valorado en el análisis sensorial.

Por lo que respecta a la cepa *L. casei* Shirota, ésta se comercializa en una bebida de leche fermentada (Yakult, Japon) y no existen referencias de su uso como cultivo iniciador en EFC.

Un aspecto fundamental en las BAL seleccionadas para su utilización como probióticos es que se adapten a las condiciones de procesado de los EFC y lleguen al momento de su consumo en un número suficiente como para ejercer sus efectos beneficiosos en el huésped. Como se muestra en el Artículo 2, los recuentos de BAL obtenidos en todos los lotes incrementaron de 10^6 UFC/g (inóculo inicial) a niveles superiores a 10^8 UFC/g durante los primeros 6 días de maduración, manteniéndose a estos niveles hasta el final del proceso de maduración (día 14) en los dos experimentos realizados.

6. Discusión General

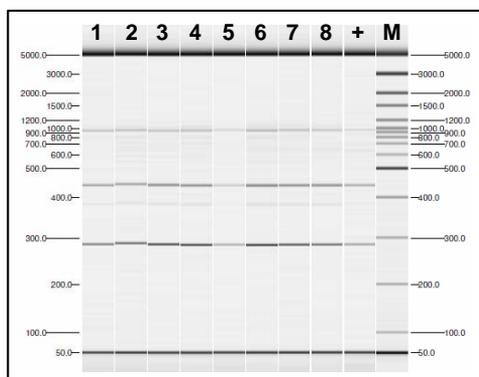


Fig. 5. Perfiles RAPD-PCR (cebador KS) de colonias seleccionadas al azar (1-8) aisladas del lote con *L. rhamnosus* CTC1679. Cepa parental (+), marcador de peso molecular (M).

La competitividad de las cepas inoculadas fue monitorizada, al igual que en el modelo cárnico, mediante el análisis de perfiles de RAPD-PCR (Aymerich *et al.*, 2006) y los resultados demostraron que la cepa *L. rhamnosus* CTC1679 fue la única capaz de alcanzar niveles superiores a 10^8 UFC/g y dominar a la microbiota endógena durante todo el proceso de maduración en los dos experimentos que se realizaron y, en uno de los experimentos, hasta después de dos meses de almacenaje a 4°C (Fig. 5).

La dosis efectiva de ingestión diaria de microorganismos probióticos depende de diversos factores y, aunque no se conoce con exactitud, se estima que son necesarios ca. 10^9 microorganismos viables para conseguir la colonización intestinal temporal (de entre 10^6 - 10^8 microorganismos viables/g de heces) y un efecto en la salud (Työppönen *et al.*, 2003). Por lo tanto, en los fuets que contenían la cepa potencialmente probiótica *L. rhamnosus* CTC1679 a 10^8 UFC/g, la ingesta diaria recomendada se conseguiría consumiendo 10 g de embutido al día, lo cual sería del todo compatible con una dieta variada y equilibrada. Otros estudios han demostrado la idoneidad de cepas de *L. rhamnosus*, *L. plantarum* y *L. paracasei* para su uso como cultivos probióticos en EFC en lo que respecta a su adaptación durante el procesado de estos productos y su rápido crecimiento. Rubio *et al.* (2013a) demostraron una buena implantación de las cepas comerciales *L. rhamnosus* GG y *L. plantarum* 299v a lo largo del proceso de elaboración y almacenaje de salchichones. También Erkkilä *et al.* (2001a,b) mostraron una buena adaptación de las cepas *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* E-97800 y *L. plantarum* E-98098 en EFC nórdicos más ácidos. Coman *et al.* (2012) demostraron que la combinación de *L. rhamnosus* IMC 501 y *L. paracasei* IMC 502 en salami suizo e italiano era

capaz de dominar a la microbiota endógena durante todo el proceso de fabricación, alcanzando niveles de 10^8 UFC/g que se mantuvieron más allá de la fecha de caducidad del producto.

Desde un punto de vista nutricional, la idoneidad de los productos cárnicos fermentados como vehículo de microorganismos probióticos pasa por poderlos integrar en una dieta variada y equilibrada, sin que su consumo represente un aporte excesivo de grasas y calorías, en línea con los objetivos de la Estrategia NAOS (AESAN, 2005). La carne y los productos cárnicos con componentes importantes de la dieta humana (Jiménez-Colmenero, 2000; Kolozyn-Krajewska y Dolatowski, 2012), pero también son una fuente importante de aportación de grasa (Valsta *et al.*, 2005) y de sal (Desmond, 2006) en la dieta, ambas relacionadas con el desarrollo de enfermedades crónicas (FAO/OMS, 2003). Por ello, los fuets fabricados en esta Tesis fueron formulados con menos sal y grasa, constituyendo así una opción más óptima desde el punto de vista nutricional para el aporte de microorganismos probióticos (Artículo 2). Según el Reglamento (CE) No 1924/2006 (CE, 2006) del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, un alimento podrá declararse reducido en sal y/o en grasa solamente si las reducciones en sal y grasa son, como mínimo, un 25% y 30% menores, respectivamente, en comparación con el producto homólogo. En el presente estudio, el contenido en grasa de los fuets fue del 22%, mientras que su contenido habitual es del 42% (BEDCA, 2007), siendo el nivel de reducción conseguido del 52%. En relación al contenido en sal, los fuets fabricados presentaron un contenido del 1,56% en la formulación, el cual se incrementó al 3,13% en el producto final. Teniendo en cuenta que el contenido de sal en un fuet tradicional es del 3,7% (AESAN, 2009), la reducción de sal conseguida fue superior al 25%. Por lo tanto, los fuets fabricados, en línea con la estrategia NAOS y, en concreto con el “fomento de la salida al mercado de gamas de productos bajos en sal y grasa” e “investigación de soluciones tecnológicas que permitan la reducción paulatina del aporte calórico de los productos alimenticios en el mercado (AESAN, 2005), podrían ser etiquetados como “embutidos reducidos en sal y en grasa”, de acuerdo con el Reglamento (CE) No 1924/2006 (CE, 2006) y, por tanto, nutricionalmente mejorados.

6. Discusión General

Es importante garantizar que la incorporación del probiótico y los cambios en la formulación del producto no modifiquen negativamente las propiedades sensoriales del producto final. La evaluación sensorial por un panel de expertos de los fuets fabricados con las cepas potencialmente probióticas caracterizadas en esta Tesis y las cepas probióticas comerciales no evidenció diferencias significativas entre lotes para la mayoría de los atributos ensayados, únicamente en la facilidad de pelar, aunque con diferencias poco importantes (Artículo 2). Se comprobó que la inoculación de cepas de lactobacilos y la reducción de sodio y grasa no tuvo efecto negativo en ninguno de los atributos evaluados y las puntuaciones obtenidas en cada uno de ellos fueron muy similares a las presentadas por Guàrdia *et al.* (2008) en fuets reducidos en sodio. Cabe destacar las buenas puntuaciones obtenidas en todos los lotes para los descriptores de *flavor*, resaltando que no se detectó sabor amargo, relacionado con la sustitución con KCl, coincidiendo con los resultados de Gou *et al.* (1996), Gelabert *et al.* (2003) y Guàrdia *et al.* (2008) con la sustitución del 40% de NaCl por KCl, confirmándose así que dicho reemplazamiento es factible porque no altera las propiedades sensoriales del producto final. La reducción del 25% de NaCl y del 52% de grasa tampoco supuso ninguna connotación sensorial negativa en la calidad global del producto final. Mora-Gallego *et al.* (2013) reportaron que la reducción de un 70% de grasa en fuet mostraba una buena aceptabilidad general del producto. También Mora-Gallego *et al.* (2014), con una reducción del 30% de NaCl y superior al 40% de grasa en el mismo tipo de producto obtuvieron productos con una calidad sensorial aceptable.

La innovación hacia este tipo de productos cárnicos al añadirle propiedades funcionales incrementará el valor nutritivo y funcional de este tipo de embutido. La reducción del contenido de sal y grasa y la incorporación de microorganismos probióticos son valores añadidos a este novedoso producto que, aparte de proporcionar los nutrientes necesarios para mantener una dieta más saludable, permitiría también a aquellas personas que no consumen productos lácticos (la vía de ingestión de probióticos más extendida actualmente) poder ingerir, a través de un producto fermentado, microorganismos potencialmente probióticos.

2.2 Estudio de la seguridad alimentaria del nuevo embutido potencialmente probiótico

Una de las principales funcionalidades de la sal (en forma de NaCl) en los productos está relacionada con su actividad antimicrobiana (Sofos, 1983). Con el objetivo de demostrar la seguridad del nuevo producto potencialmente probiótico reducido en sal y grasa, se estudió la prevalencia de patógenos en el fuet fabricado con la cepa potencialmente probiótica *L. rhamnosus* CTC1679 como cultivo iniciador, inoculando artificialmente una mezcla de cepas de *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* a niveles bajos (<100 UFC/g) para simular una contaminación natural de la masa cárnica inicial (Artículo 4). Finalizado el proceso de maduración de los fuets (14 días), la mitad de ellos fueron presurizados a 600 MPa durante 5 min y, posteriormente, se envasaron en atmósfera modificada (80% N₂:20% CO₂) y se conservaron a 4°C durante 35 días (Artículo 4). El proceso de maduración resultó efectivo no sólo para prevenir el crecimiento sino también para eliminar la población de *Salmonella* spp. (ausencia en 25 g de producto) a partir del día 7 y hasta el final del proceso de maduración (día 14) y almacenaje durante 35 días a 4°C de los fuets tratados y no tratados por alta presión. Las condiciones mínimas de crecimiento para *Salmonella* se sitúan alrededor de valores de pH 3,8 y a_w 0,94 (ICMSF, 1996). Los fuets de este estudio no experimentaron un descenso de los valores de pH por debajo de 5,4. Este hecho, junto con la sensibilidad de este patógeno a la desecación, señala a la reducción de valores de a_w como el principal inhibidor del crecimiento de *Salmonella* en este tipo de embutido poco ácido. Los valores finales de pH y a_w del producto final (5,5 y 0,86, respectivamente) no permitieron el crecimiento del patógeno durante el almacenaje a 4°C. Por lo que respecta a *L. monocytogenes*, durante todo el periodo de maduración (14 días) no se observó crecimiento del patógeno, manteniéndose los niveles en el inóculo inicial (ca. 20 UFC/g). Después de 35 días de almacenaje a 4°C se consiguió ausencia del patógeno en 25 g de producto. El tratamiento con alta presión (600 MPa durante 5 min) después de la maduración, produjo una reducción inmediata del patógeno y se registró ausencia del patógeno en 25 g de producto en dos de los tres replicados. El uso de la alta presión hidrostática como barrera adicional

al crecimiento microbiano resulta útil para mejorar la seguridad alimentaria de los productos cárnicos listos para el consumo (Garriga y Aymerich, 2009). Después 35 días de almacenaje, al igual que en los fuets no presurizados, se observó ausencia del patógeno en 25 g de producto.

Por lo tanto, según los resultados obtenidos, se confirma que a bajos niveles de contaminación de la masa cárnica inicial con los patógenos *L. monocytogenes* y *Salmonella* y bajo las condiciones de fabricación estudiadas, se cumple con los criterios microbiológicos de seguridad alimentaria establecidos en el Reglamento (CE) 2073/2005 (CE, 2005) para este tipo de producto listo para el consumo (<100 ufc/g de *L. monocytogenes* al final de la vida útil y ausencia de *Salmonella* en 25 g de producto), demostrando así la seguridad de los fuets fabricados con la cepa potencialmente probiótica *L. rhamnosus* CTC1679.

3. Estudio sobre la potencialidad de colonización del TGI y ensayo preliminar de intervención en humanos

Para evidenciar efectos beneficiosos a nivel gastrointestinal, es deseable que las bacterias probióticas presenten propiedades tales como capacidad de auto-agregación, co-agregación y/o adhesión a las células epiteliales, propiedades que contribuyen a la colonización del epitelio intestinal y a la competencia con microorganismos patógenos (Del Re *et al.*, 2000; Collado *et al.*, 2008; Espeche y Otero, 2009). Los patógenos también han desarrollado varios mecanismos para asegurar que permanecen asociados con la mucosa intestinal y que resisten ser arrastrados junto con el quimo intestinal. Numerosos experimentos *in vitro* demuestran la capacidad de varias especies de lactobacilos como *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. rhamnosus* o *L. gasseri* para inhibir la adhesión de diversos patógenos como *L. monocytogenes* o *Salmonella* a las líneas celulares intestinales HT29 y Caco-2, que expresan las características morfológicas y fisiológicas de los enterocitos humanos (Servin, 2004; Gueimonde *et al.*, 2006). Por lo tanto, en la presente Tesis, aparte de la capacidad de auto-agregación (explicada en el apartado 1.2.2), también se evaluó la capacidad de co-agregación y adhesión de las tres cepas seleccionadas por su elevado potencial como probiótico y como cultivo iniciador

a partir del ensayo de maduración en un modelo de EFC tradicional (*L. casei/paracasei* CTC1677 y CTC1678 y *L. rhamnosus* CTC1679).

Se estudió la capacidad de adhesión a células epiteliales humanas empleando la línea celular HT29 procedente de adenocarcinoma de colon humano en estado confluyente y diferenciado (monocapa). Además, también se llevaron a cabo estudios de competición, inhibición y desplazamiento de la adhesión del patógeno *L. monocytogenes* a las células de la monocapa de HT29 por parte de las 3 cepas (Artículo 3). Las dos cepas de *L. casei/paracasei* presentaron una buena capacidad de adhesión a la línea celular HT29, con porcentajes similares al de la cepa control *L. rhamnosus* GG (6%), cepa probiótica usada como referencia por sus buenas propiedades adherentes (Lebeer *et al.*, 2007; Vizoso-Pinto *et al.*, 2007). La cepa *L. rhamnosus* CTC1679 presentó un porcentaje de adhesión del 36%, significativamente superior ($p < 0.05$) al de la cepa de referencia (6%). La adherencia de las bacterias al epitelio intestinal es una propiedad que depende de cada cepa (Tuomola y Salminen, 1998; Laparra y Sanz, 2009). Del Re *et al.* (2000) describieron una correlación entre auto-agregación y adhesión, de forma que las cepas que no eran capaces de auto-agregar, tampoco podrían adherirse a las células intestinales, coincidiendo con los resultados obtenidos en esta Tesis, ya que *L. rhamnosus* CTC1679 presentó una mayor capacidad de auto-agregación que las cepas de *L. casei/paracasei* (apartado 1.2.2; Artículo 1). Además, esta cepa también fue capaz de inhibir y de desplazar la adhesión del patógeno *L. monocytogenes* a las células de la monocapa de HT29. En los ensayos de adhesión, *L. monocytogenes* mostró una capacidad de adhesión a la línea celular HT29 (25%) significativamente mayor que la de la cepa de referencia *L. rhamnosus* GG (6%), sugiriendo que podría facilitarse su colonización en el epitelio intestinal. Es por ello, que la selección de cepas que posean la habilidad de prevenir la adhesión de patógenos invasivos es de gran interés. *L. rhamnosus* CTC1679 fue la única cepa de las ensayadas que demostró la capacidad de reducir la adhesión del patógeno en los estudios de inhibición y desplazamiento, confirmando la correlación positiva entre la capacidad de adhesión de la cepa y su habilidad para reducir la invasión del patógeno (Wine *et al.*, 2009). Otro mecanismo que podría estar implicado en la prevención de la adhesión del patógeno a la superficie intestinal podría ser el

6. Discusión General

fenómeno de co-agregación (Ouwehand *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2009). Este fenómeno consiste en la capacidad que presentan las células bacterianas de dos cepas determinadas para interactuar entre sí. De hecho, la cepa *L. rhamnosus* CTC1679, tal y como se demuestra en el Artículo 3, también fue la que mostró mayor capacidad de co-agregación con *L. monocytogenes*, pudiendo interactuar con el patógeno y evitar así la unión de éste a las células de HT29. Por lo tanto, ésta fue la cepa seleccionada para evaluar su supervivencia y persistencia en el TGI mediante un estudio *in vivo* con 5 voluntarios sanos (Artículo 4). *L. rhamnosus* CTC1679 (cepa no productora de tiramina ni de actividades enzimáticas tóxicas y sensible a los antibióticos recomendados por la EFSA) (Artículo 1), además de demostrar el mayor potencial como cultivo iniciador probiótico en un EFC tipo fuet de baja acidez nutricionalmente mejorado (Artículo 2) y seguro desde el punto de vista de seguridad alimentaria (Artículo 4), destacó por su capacidad de adhesión a las células de la línea celular HT29, así como por su habilidad para inhibir la adhesión y desplazar el patógeno *L. monocytogenes* previamente adherido a la monocapa de HT29 (Artículo 3).



Fig. 6. Observación de *L. rhamnosus* CTC1679 al microscopio óptico (contraste de fases) a 1.000 \times .

Puesto que la adhesión a la mucosa intestinal humana es considerada como un factor importante para lograr la colonización del TGI (Alander *et al.*, 1999) la cepa *L. rhamnosus* CTC1679 (Fig. 6) se erigió como la más prometedora para continuar los estudios en esta dirección.

Estudios realizados por Tannock *et al.* (2000) indicaron que algunos lactobacilos como *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum* y *L. fermentum* son habitantes endógenos del intestino, persisten por tiempos limitados, y sólo están presentes a niveles bajos, que suelen

incrementarse en respuesta a factores de la dieta o cambios en las condiciones del huésped.

En la presente Tesis, se fabricaron EFC nutricionalmente mejorados (bajos en sal y en grasa), con *L. rhamnosus* CTC1679 como cultivo iniciador. Para cumplir el rol probiótico, el microorganismo utilizado como tal debe permanecer viable a lo largo de la vida útil del alimento que le sirve como vehículo y, además, tiene que sobrevivir al paso a través del TGI para llegar viable al intestino y realizar así el efecto beneficioso en la salud humana (Holzapfel *et al.*, 1998; Saarela *et al.*, 2000; Dommels *et al.*, 2009). Por lo tanto, después de verificar que *L. rhamnosus* CTC1679 había alcanzado los recuentos esperados (ca. 10^8 UFC/g) en el embutido final, dominando sobre la microbiota endógena a lo largo de todo el proceso de maduración de los fuets (Artículo 2), se constituyó un panel de 5 voluntarios sanos que consumieron durante 21 días 25 g de fuet/día, que correspondía a una cantidad de 6×10^9 UFC de la cepa (Artículo 4). Después de 35 días de almacenaje a 4°C de los fuets, se comprobó que la cepa *L. rhamnosus* CTC1679 mantuvo los niveles obtenidos al final de la maduración (ca. 10^8 UFC/g). Por lo tanto, el probiótico potencial *L. rhamnosus* CTC1679 registró los niveles suficientes durante el periodo de consumo del fuet, requisito indispensable para asegurar que las bacterias lleguen al TGI en cantidades adecuadas.

Los voluntarios participantes en el estudio de intervención no consumieron productos probióticos comerciales ni recibieron tratamiento antibiótico un mes antes ni durante el mismo. Tal y como se detalla en el Artículo 4, se analizaron las heces de los voluntarios antes (día 0), durante (día 10) y al final (día 21) del periodo de ingestión y al cabo de 3, 10 y 39 días después de haber finalizado el periodo de ingestión. La recuperación en heces durante la administración oral de una cepa probiótica es un método estándar para mostrar su supervivencia en el TGI (Mättö *et al.*, 2006; Saxelin *et al.*, 2010). La cepa *L. rhamnosus* CTC1679 fue detectada en las heces de todos los individuos durante la ingesta diaria del fuet y al final del periodo de consumo (21 días) los recuentos de viables oscilaron entre $2,3 \times 10^5$ y $4,3 \times 10^7$ UFC/g de heces, dentro de los niveles recomendados para conseguir la colonización temporal del intestino y ejercer los efectos saludables (Työppönen *et al.*, 2003), sugiriendo así la capacidad de esta

6. Discusión General

cepa potencialmente probiótica para sobrevivir al paso por el TGI durante la ingesta del embutido. Como ya se ha comentado, una de las propiedades más importantes que debe poseer un microorganismo con potencial probiótico es la capacidad de adherirse al tejido epitelial del intestino del huésped, ya que se considera un factor necesario para que pueda producirse la colonización del TGI (Dunne *et al.*, 2001; Gueimonde *et al.*, 2006), hecho que se confirma en la presente Tesis con los resultados de adhesión *in vitro* (Artículo 3) y la colonización *in situ* de la cepa *L. rhamnosus* CTC1679 (Artículo 4). Sin embargo, tras 10 días de no consumir el embutido, la cepa *L. rhamnosus* CTC1679 sólo fue detectada, a niveles muy bajos (1×10^3 UFC/g) en uno de los 5 voluntarios. Treinta y nueve días después de haber finalizado el consumo, se analizaron las heces de este voluntario y la cepa ya no fue detectada en placa (límite de detección: 1×10^2 UCF/g). Estos resultados demuestran que la cepa potencialmente probiótica *L. rhamnosus* CTC1679 tiene la capacidad de colonizar temporalmente el TGI y de persistir durante la ingesta del fuet, coincidiendo con la renovación de las células epiteliales cada 5-7 días (Barker, 2014). Por lo tanto, sería necesario un consumo continuado del fuet que contiene el cultivo potencialmente probiótico para que el microorganismo permaneciera en altas concentraciones en el TGI, de acuerdo con lo reportado en otros estudios (Bouhnik *et al.*, 1992; Fujiwara *et al.*, 2001; Saxelin *et al.*, 2010).

En la presente Tesis se ha demostrado que la cepa potencialmente probiótica *L. rhamnosus* CTC1679, aislada de heces de un lactante, es capaz de liderar la fermentación y mantenerse viable en recuentos del orden de 10^8 UFC/g en un EFC nutricionalmente mejorado y seguro desde el punto de vista de seguridad alimentaria, con las características sensoriales adecuadas, y de sobrevivir al paso a través del TGI, dado que fue recuperada viable en las heces de los voluntarios durante la ingesta diaria de fuet. No obstante, para que un alimento sea aceptado como funcional, sus efectos beneficiosos deben ser confirmados mediante estudios clínicos en humanos. En este contexto, la forma de conseguir evidencias científicas de peso que respalden la utilidad de un alimento funcional ha centrado un importante debate en la industria y la comunidad científica, ya que la EFSA ha señalado que en ningún caso podrán etiquetarse productos que

utilicen como reclamo (“*health claims*”) efectos para la salud que no hayan sido demostrados de manera fehaciente. Según el Reglamento (CE) No 1924/2006 (CE, 2006) del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, cualquier declaración nutricional y de propiedad saludable en el etiquetado y publicidad de un alimento debe basarse en pruebas científicas con el fin de garantizar la protección de los consumidores frente a la publicidad engañosa. En este contexto, la EFSA y, en concreto, el Panel de Productos Dietéticos, Nutrición y Alergias (NDA), se encarga de realizar el proceso de evaluación de estos reclamos y publicó en 2007 una guía de Directrices Científicas y Técnicas para la preparación y presentación de solicitudes de autorización de declaraciones de propiedades saludables, que fue revisada en 2011 (EFSA, 2011a). Sin embargo, hasta el momento, el panel NDA ha denegado todas las solicitudes sobre las propiedades saludables de todos los microorganismos probióticos evaluados, ya que considera que no se han podido establecer las relaciones causa-efecto entre el consumo del probiótico y la declaración de propiedad saludable. Así, teniendo en cuenta el elevado grado de exigencia que impone el panel NDA, es importante que la documentación para la justificación de las alegaciones de salud de los probióticos sea diseñada usando las Directrices proporcionadas por la EFSA y que su eficacia esté avalada por los estudios científicos adecuados, sobretodo de intervención en humanos y, en concreto, los estudios controlados y “randomizados” (*Randomized Controlled Trials-RCT-*), y que su consumo se realice por la población diana a la que se destinan.

4. Perspectivas de futuro

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral representan una gran oportunidad para el desarrollo de productos cárnicos funcionales y como nueva vía de ingestión de probióticos distinta a la tradicional. Sin embargo, como ya se ha comentado anteriormente, para que un alimento sea aceptado como funcional, sus efectos beneficiosos deben ser evaluados experimentalmente mediante estudios de intervención en humanos con alguna patología (p.e. obesidad, hipertensión, gastroenteritis, etc.) para conseguir datos que puedan demostrar los efectos reales de este producto en el tratamiento y/o prevención

6. Discusión General

de dicha patología y su efecto sobre la microbiota intestinal. Así, los futuros estudios deberían estar centrados en ensayos clínicos, determinantes a la hora de la posible aplicación industrial del producto, para correlacionar la presencia de la cepa potencialmente probiótica *L. rhamnosus* CTC1679 y su relación con la salud del consumidor y poder así considerar la presentación al panel de la NDA de una solicitud sobre las propiedades saludables de dicha cepa.

7. CONCLUSIONES

7. Conclusiones

Como **conclusión general** se puede afirmar que a través de la estrategia de reformulación planteada (reducción de sal y de grasa y adición del cultivo iniciador potencialmente probiótico *L. rhamnosus* CTC1679) se ha desarrollado un embutido fermentado-curado de baja acidez con gran potencial funcional, microbiológicamente seguro, y con las características sensoriales adecuadas, respondiendo así al objetivo principal de esta Tesis Doctoral.

A partir de esta conclusión general, se pueden extraer las siguientes conclusiones parciales:

- Las propiedades tecnológicas, funcionales y de seguridad son cepa-dependientes, por lo que la selección de un cultivo iniciador adecuado requiere un estudio exhaustivo de caracterización *in vitro* individual de cada cepa que quiera ser utilizada para tal fin.
- La técnica molecular RAPD-PCR permite, de forma eficiente: 1) la caracterización y discriminación de las cepas de BAL pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Weissella* y confirma la elevada heterogeneidad entre cepas procedentes de diferentes individuos; 2) la evaluación, con el cebador KS, de la capacidad de implantación, supervivencia y dominancia de las cepas de *Lactobacillus* ensayadas en los fuets a lo largo del proceso de elaboración y almacenaje del embutido.
- *L. rhamnosus* CTC1679, cepa de origen intestinal humano, se perfila como:
1) la más idónea para su uso como cultivo iniciador en fuet reducido en sal y grasa, presentando una elevada viabilidad y dominancia en el producto;
2) la más prometedora para la colonización del TGI por su elevada capacidad de adhesión a las células de la monocapa de HT29, inhibición de la adhesión del patógeno *L. monocytogenes* y desplazamiento del patógeno pre-adherido; 3) capaz de colonizar temporalmente y de sobrevivir en el TGI humano durante la ingesta diaria de los fuets elaborados con esta cepa como cultivo iniciador.
- El fuet reducido en sal y grasa elaborado con *L. rhamnosus* CTC1679 como cultivo iniciador: 1) cumple con los criterios de seguridad alimentaria establecidos en el Reglamento (CE) 2073/2005 para este tipo de producto listo para el consumo, demostrando la seguridad del nuevo embutido; 2) presenta unas características sensoriales correctas; 3) vehiculizaría la dosis diaria recomendada de probióticos con una ingesta mínima de 10 g de embutido por día, cantidad compatible con una dieta sana y equilibrada.

8. BIBLIOGRAFÍA

8. Bibliografía

- Adams, M.R. (1986). Fermented flesh foods. *Progress in Industrial Microbiology* 23, 159-198.
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2005). Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y prevención de la Obesidad. Disponible en: http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/publicaciones_estudios/nutricion/maqueta_NAOS1.pdf (Acceso: 08-01-2014).
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2009). Plan de reducción de consumo de sal. En: *Jornadas de debate*. La Granja de San Ildefonso, España. Disponible en: http://www.naos.aesan.msps.es/naos/ficheros/estrategia/Memoria_Plan_de_reduccion_del_consumo_de_sal_-_Jornadas_de_debate.pdf (Acceso: 21-05-2013).
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2011). Encuesta Nacional de Ingesta Dietética Española (ENIDE). Disponible en: http://www.aesan.msc.es/AESAN/docs/docs/notas_prensa/Presentacion_ENIDE.pdf (Acceso: 29-10-2013).
- Ahrné, S., Lönnemark, E., Wold, A.E., Aberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I.L., Molin, G. y Adlerberth, I. (2005). Lactobacilli in the intestinal microbiota of Swedish infants. *Microbes and Infection* 7, 1256-1262.
- Akoh, C.C. (1998). Fat replacers. *Food Technology* 52, 47-53.
- Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T. y Von Wright, A. (1999). Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology* 65(1), 351-354.
- Ammor, M.S., Florez, A.B. y Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology* 24(6), 559-570.
- Ammor, M.S. y Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science* 76(1), 138-146.
- ANICE (Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España) (2013). El sector cárnico. Disponible en: http://www.anice.es/v_portal/informacion/informacionver.asp?cod=9776&te=7&idage=11909&vap=0&npag=1 (Acceso: 08-10-2013).
- Arihara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Science*, 74(1), 219-229.
- Armenteros, M., Aristoy, M.-C., Barat, J.M. y Toldrá, F. (2009). Biochemical and sensory properties of dry-cured loins as affected by partial replacement of sodium by potassium, calcium and magnesium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(20), 9699-9705.
- Arnau, J., Comaposada, J., Serra, S., Bernardo, J. y Lagares, J. (2011). Composición para la sustitución total o parcial del cloruro sódico en la elaboración de productos cárnicos crudos curados parcialmente deshidratados, uso de dicha composición, y

- proceso para la elaboración de productos cárnicos crudos curados parcialmente. Número de patente: P201130575. España. Organizaciones emisoras: IRTA, Casademont, S.A. y Metalquimia, S.A.
- Arnau, J., Serra, X., Comaposada, J., Gou, P. y Garriga, M. (2007). Technologies to shorten the drying period of dry-cured meat products. *Meat Science* 77(1), 81-89.
- Arvanitoyannis, I.S. y van Houwelingen-Koukaliaroglou, M. (2005). Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45(5), 385-404.
- Askar, A., El-Samahy, S.K. y Tawfik, A.F. (1993). Pasterma and beef bouillon. The effect of substituting KCl and K-lactate for sodium chloride. *Fleischwirtschaft* 73(3), 289-292.
- ASTM (American Society for Testing and Materials) (1981). Guidelines for the selection and training of sensor and panel members. *ASTM Special Technical Publication* 758. Filadelfia, EE.UU.
- Aymerich, T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J., Monfort, J.M. y Hugas, M. (2000). Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *Journal of Food Protection* 63(6), 721-726.
- Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M. y Hugas, M. (2003). Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 69(8), 4583-4594.
- Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M.C., Bover-Cid, S. y Hugas, M. (2006). Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 100(1), 40-49.
- Barbuti, S. y Parolari, G. (2002). Validation of manufacturing process to control pathogenic bacteria in typical dry fermented products. *Meat Science* 62(3), 323-329.
- Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 19-33.
- Barrière, C., Montel, M.C. y Talon, R. (1998). Production of catalase and superoxide dismutase by *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus xylosus*. En: *44th International Congress of Meat Science and Technology*, Vol. I, Diestre, A. y Monfort, J.M (Ed.), pp. 794-795. Barcelona, España.
- BEDCA (Base de Datos Española de Composición de Alimentos) (2007). Consorcio RedBEDCA y Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). Disponible en: <http://www.bedca.net/bdpub/index.php> (Acceso: 10-02-2013).
- Ben Amor, K., Vaughan, E.E. y De Vos, W. (2007). Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *Journal of Nutrition* 137(3), 741S-747S.
- Benito, M.J., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., Ruiz-Moyano, S. y Córdoba, M.G. (2007). Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented salchichón and chorizo sausages. *Journal of Food Science* 72(6), 193-201.

8. Bibliografía

- Bidlas, E. y Lambert, R.J.W. (2008). Comparing the antimicrobial effectiveness of NaCl and KCl with a view to salt/sodium replacement. *International Journal of Food Microbiology* 124(1), 98-102.
- Bonomo, M.G., Zotta, T., Parente, E. y Salzano, G. (2008). Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Science* 80(4), 1238-1248.
- Bouhnik, Y., Pouchart, P., Marteau, P., Arlet, G., Goderel, I. y Rambaud, J.C. (1992). Fecal recovery in humans of viable *Bifidobacterium* sp ingested in fermented milk. *Gastroenterology* 102(3), 875-878.
- Bouton, Y., Buchin, S., Duboz, G., Pochet, S. y Beuvie, E. (2009). Effect of mesophilic lactobacilli and enterococci adjunct cultures on the final characteristics of a microfiltered milk Swiss-type cheese. *Food Microbiology* 26(2), 183-191.
- Bover-Cid, S. y Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 53, 33-41.
- Boziaris, I.S., Skandamis, P.N., Anastasiadi, M. y Nychas, G.J.E. (2007). Effect of NaCl and KCl on fate and growth/no growth interfaces of *Listeria monocytogenes* Scott A at different pH and nisin concentrations. *Journal of Applied Microbiology* 102(3), 796-805.
- Brousseau, R., Hill, J.E., Préfontaine, G., Goh, S.H., Harel, J. y Hemmingsen, S.M. (2001). *Streptococcus suis* serotypes characterized by analysis of Chaperonin 60 gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 67(10), 4828-4833.
- Cannon, J.P., Lee, T.A., Bolanos, J.T. y Danziger, L.H. (2005). Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 24(1), 31-40.
- Carbajal, A. (2004). Consumo de carne tendencias: calidad de vida y epidemiología de enfermedades asociadas. En: *La carne y productos cárnicos como alimentos funcionales*, Jiménez-Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F.J. y Olmedilla-Alonso, B. (Ed.), pp. 15-38. Editec@red. Madrid, España.
- Cats, A., Kuipers, E.J., Bosschaert, M.A.R., Pot, R.G.J., Vandenbroucke-Grauls, C. y Kusters, J.G. (2003). Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei*-containing milk drink in *Helicobacter pylori*-colonized subjects. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 17(3), 429-435.
- CE (Comisión Europea) (2005). Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Communities* L338(22.12.2005), 1-26.
- CE (Comisión Europea) (2006). Commission Regulation (EC) No 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods. *Official Journal of the European Communities* L404(30.12.2006), 1-9.

- CE (Comisión Europea) (2009). National Salt Initiatives-implementing the EU Framework for salt reduction initiatives. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/ph_determinants/life_style/nutrition/documents/national_salt_en.pdf (Acceso: 16-01-2014).
- Centeno, J.A., Menéndez, S., Hermida, M.A. y Rodríguez-Otero, J.L. (1999). Effect of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *International Journal of Antimicrobial Agents* 48, 97-101.
- Champagne, C.P., Ross, R.P., Saarela, M., Hansen, K.F. y Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology* 149(3), 185-193.
- Cocconcelli, P.S. (2007). Starter culture: bacteria. En: *Handbook of fermented meat and poultry*, Toldrà, F., Hui, Y.H., Astiasarán, I., Nip, W.K., Sebranek, J.G., Silveira, E.T.F., Stahnke, L.H. y Talon, R. (Ed.), pp. 137-146. Blackwell Publishing. Oxford, Reino Unido.
- Collado, M.C., Meriluoto, J. y Salminen, S. (2007). *In vitro* analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International* 40(5), 629-636.
- Collado, M.C., Meriluoto, J. y Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research Technology* 226, 1065-1073.
- Collins, J.E. (1997). Reducing salt (sodium) levels in processed meat, poultry and fish products. En: *Production and processing of healthy meat, poultry and fish products*, Vol. 14, Pearson, A.M. y Dutson, T.R. (Ed.), pp. 282-287. Blackie Academic and Professional. Londres, Reino Unido.
- Collins, M.D., Phillips, B.A. y Zannoni, P. (1989). Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov. comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39(2), 105-108.
- Coman, M.M., Cecchini, C., Verdenelli, M.C., Silvi, S., Orpianesi, C. y Cresci, A. (2012). Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. *International Journal of Food Microbiology* 157, 346-352.
- Conter, M., Zanardi, E., Ghidini, S., Pennisi, L., Vergara, A., Campanini, G. y Ianieri, A. (2008). Consumers' behaviour toward typical Italian dry sausages. *Food Control* 19, 609-615.
- Conway, P.L., Gorbach, S.L. y Goldin, B.R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science* 70, 1-12.
- Corral, C., Salvador, A. y Flores, M. (2013). Salt reduction in slow fermented sausages affects the generation of aroma active compounds. *Meat Science* 93(3), 776-785.

8. Bibliografía

- Danielsen, M. y Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology* 82, 1-11.
- De Vuyst, L., Falony, G. y Leroy, F. (2008). Probiotics in fermented sausages. *Meat Science* 80(1), 75-78.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M. y Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology* 31(6), 438-442.
- Delgado, S., Flórez, A.B. y Mayo, B. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Current Microbiology* 50, 202-207.
- Dellaglio, F., Giovanna, E.F. y Torriani, S. (2002). The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an Opinion. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 285-287.
- Demeyer, D., Raemaekers, M., Rizzo, A., Holck, A., De Smedt, A., Ten Brink, B., Hagen, B., Montel, C., Zanardi, E., Murbrekk, E., Leroy, F., Vandendriessche, F., Lorentsen, K., Venema, K., Sunesen, L., Stahnke, L.H., De Vuyst, L., Talon, R., Chizzolini, R. y Eerola, S. (2000). Control of bioflavour and safety in fermented sausages: first results of a European project. *Food Research International* 33, 171-180.
- Desmond, E. (2006). Reducing salt: a challenge for the meat industry. *Meat Science* 74(1), 188-196.
- Dicks, L.M.T., Du Plessis, E.M., Dellaglio, F. y Lauer, F. (1996). Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46(1), 337-340.
- Diplock, A.T., Agget, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B. y Roberfroid, M.B. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. *British Journal of Nutrition* 81(Supl. 1), S1-S27.
- Directiva 91/439/EEC. Directive of 22 July 1991 establishing standards to be applied to the production and commercialization of fishery products. *Official Journal of the European Communities* L268,15-34.
- Dommels, Y.E.M., Kemperman, R.A., Zebregs, Y.E.M.P., Draaisma, R.B., Jol, A., Wolvers, D.A.W., Vaughan, E.E. y Albers, R. (2009). Survival of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in the human gastrointestinal tract with daily consumption of a low-fat probiotic spread. *Applied and Environmental Microbiology* 75(19), 6198-6204.
- Doyle, M. E. y Glass, K.A. (2010). Sodium reduction and its effects on food safety, food quality, and human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9(1), 44-56.

- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. y Collins, J.K. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(2), 386-392.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2007). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA Journal* 587, 1-16. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/sc_op_ej587_qps_en.pdf?ssbinary=true (Acceso: 22-12-2013).
- EFSA (European Food Safety Authority) (2008). Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA Journal* 732, 1-15.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2011a). EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific and technical guidance for the preparation and presentation of an application for authorisation of a health claim (revision 1). *EFSA Journal* 9(5), 2170-2205.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2011b). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal* 9(10), 2393-2486.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012). EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal* 10(6), 2740-2749.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2013). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). *EFSA Journal* 11(11), 3449-3556.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2014). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 2(2), 3547-3858. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3547.pdf> (Acceso: 22-04-2014).
- Encinas, J.P., Sanz, J.J., García-López, M.L. y Otero, A. (1999). Behaviour of *Listeria* spp. in naturally contaminated chorizo (Spanish fermented sausage). *International Journal of Food Microbiology* 46(2), 167-171.
- Erkkilä, S., Petäjä, E., Eerola, S., Lilleberg, L., Mattila-Sandholm, T. y Suihko, M.L. (2001a). Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. *Meat Science* 58(2), 111-116.
- Erkkilä, S., Suihko, M.L., Eerola, S., Petäjä, E. y Mattila-Sandholm, T. (2001b). Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *International Journal of Food Microbiology* 64, 205-210.

8. Bibliografía

- Espeche, M.C. y Otero, M.C. (2009). Screening of surface properties and antagonistic substances production by lactic acid bacteria isolated from the mammary gland of healthy and mastitic cows. *Veterinary Microbiology* 135(3-4), 346-357.
- Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P. y Vigi, V. (2003). Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatrica* Supl. 91, 48-55.
- FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura / Organización Mundial de la Salud) (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf?ua=1 (Acceso: 16-10-2013).
- FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura / Organización Mundial de la Salud) (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Londres, Ontario, Canadá. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf (Acceso: 06-02-2013).
- FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura / Organización Mundial de la Salud) (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO Technical Report Series 916. Ginebra, Suiza. Disponible en: http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_916.pdf (Acceso: 16-10-2013).
- FDA (Food and Drug Administration) (1997). Substances Generally Recognized as Safe, proposed rule. *Federal Register* 62(74), 18937-18964.
- Fernández, M.F., Boris, S. y Barbés, C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 94(3), 449-455.
- Forsythe, S. (2010). Foodborne pathogens. En: *The microbiology of safe foods*, Forsythe, S. (Ed.), pp. 141-192. Wiley-Blackwell. Oxford, Reino Unido.
- Franz, C.M., Holzapfel, W. y Stiles, M.E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* 47, 1-24.
- Franz, C.M., Muscholl-Silberhorn, A.B., Yousif, N.M., Vancanneyt, M., Swings, J. y Holzapfel, W.H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology* 67(9), 4385-4389.
- Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleiferc, K.H. y Holzapfel, W.H. (2003). Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 88, 105-122.
- FSIS (Food Safety and Inspection Service) (2002). FSIS Directive 10,240.3: Microbial sampling of ready-to-eat (RTE) products of the FSIS verification testing program. FSIS/USDA, Washington, EE.UU.
- Fujiwara, S., Seto, Y., Kimura, A. y Hashiba, H. (2001). Establishment of orally-administered lactobacillus gasseri SBT2055SR in the gastrointestinal tract of

- humans and its influence on intestinal microflora and metabolism. *Journal of Applied Microbiology* 90, 343-352.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, M.C., Galgano, F., Crudele, M.A., Favati, F., Guerzoni, M.E. y Suzzi, G. (2001). Effects of pH, temperature and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *International Journal of Food Microbiology* 64, 105-117.
- Garriga, M. y Aymerich, T. (2007). The microbiology of fermentation and ripening. En: *Fermented meat and poultry*, Toldra, F. (Ed.), pp. 125-135. Blackwell Publishing. Oxford, Reino Unido.
- Garriga, M. y Aymerich, T. (2009). Advanced decontamination technologies: high hydrostatic pressure on meat products. En: *Safety of meat and processed meat*, Toldra, F. (Ed.), pp. 183-208. Springer Science+Business Media. Nueva York, EE.UU.
- Geisen, R., Lücke, F.K. y Kröckel, L. (1992). Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtschaft* 72(6), 894-898.
- Gelabert, J., Gou, P., Guerrero, L. y Arnau, J. (2003). Effect of sodium chloride replacement on some characteristics of fermented sausages. *Meat Science* 65(2), 833-839.
- Gill, C.I. y Rowland, I.R. (2002). Diet and cancer: assessing the risk. A review. *British Journal of Nutrition* 88(Supl. 1), 73-87.
- Gill, C.O. (1982). Microbial interactions with meats. En: *Meat Microbiology*, Brown, M.H. (Ed.), pp. 225-264. Applied Science Publishers. Londres.
- Gimeno, O., Astiasarán, I. y Bello, J. (1998). A mixture of potassium, magnesium, and calcium chlorides as a partial replacement of sodium chloride in dry fermented sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(10), 4372-4375.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Helwig, U., Venturi, A., Lammers, K.M., Brigidi, P., Vitali, B., Poggioli, G., Miglioli, M. y Campieri, M. (2003). Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: A double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 124(5), 1202-1209.
- Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Brigidi, P., Matteuzzi, D., Bazzochi, G., Poggioli, G., Miglioli, M. y Campieri, M. (2000). Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: A double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 119(2), 305-309.
- Giraffa, G. (2002). Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 163-171.
- Glass, K.A. y Doyle, M.P. (1989). Fate and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beaker sausage and pepperoni. *Journal of Food Protection* 52, 226-231.
- Goldin, B.R. (1996). The metabolic activity of the intestinal microflora and its role in colon cancer: *Lactobacillus* and other factors that alter intestinal metabolic activity. *Nutrition Today* 31(6), 24-27.

8. Bibliografía

- Gorbach, S.L. (2000). Probiotics and gastrointestinal health. *The American Journal of Gastroenterology* 95(Supl. 1), S2-S4.
- Gou, P., Guerrero, L., Gelabert, J. y Arnau, J. (1996). Potassium chloride, potassium lactate and glycine as sodium chloride substitutes in fermented sausages and in dry-cured pork loin. *Meat Science* 42(1), 37-48.
- Guandalini, S., Pensabene, L., Zikri, M.A., Dias, J.A., Casali, L.G., Hoekstra, H., Kolacek, S. y Massar, K. (2000). *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 30(1), 54-60.
- Guàrdia, M.D., Guerrero, L., Gelabert, J., Gou, P. y Arnau, J. (2006). Consumer attitude towards sodium reduction in meat products and acceptability of fermented sausages with reduced sodium content. *Meat Science* 73(3), 484-490.
- Guàrdia, M.D., Guerrero, L., Gelabert, J., Gou, P. y Arnau, J. (2008). Sensory characterisation and consumer acceptability of small calibre fermented sausages with 50% substitution of NaCl by mixtures of KCl and potassium lactate. *Meat Science* 80(4), 1225-1230.
- Guarino, A., Canani, R.B., Spagnuolo, M.I., Albano, F. y di Benedetto, L. (1997). Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and viral excretion in children with mild diarrhoea. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 25(5), 516-519.
- Guarner, F., Requena, T. y Marcos, A. (2010). Consensus statements from the workshop "Probiotics and health: scientific evidence". *Nutrición Hospitalaria* 25(5), 700-704.
- Gueimonde, M., Jalonen, L., He, F., Hiramatsu, M. y Salminen, S. (2006). Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food Research International* 39(4), 467-471.
- Gupta, P., Andrew, H., Kirschner, B.S. y Guandalini, S. (2000). Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 31(4), 453-457.
- Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M. y Testoni, P.A. (2000). *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Digestive Diseases and Sciences* 45(7), 1462-1464.
- Hajmeer, M., Basheer, I. y Cliver, D.O. (2006). Survival curves of *Listeria monocytogenes* in chorizos modeled with artificial neural networks. *Food Microbiology* 23(6), 561-570.
- Hamilton-Miller, J.M.T. (2003). The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22(4), 360-366.
- Hammes, W.P., Bantleon, A. y Min, S. (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Letters* 87(1-2), 165-174.

- Hibberd, P.L. (2009). Probiotics for infectious diarrhea and traveler's diarrhea – What do we really know? En: *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*, Charalampopoulos, D. y Rastall, R.A. (Ed.), pp. 845-899. Springer. Nueva York, EE.UU.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. y Huis in't Veld, J.H.J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 41, 85-101.
- Hoskins, L.C. y Boulding, E.T. (1981). Mucin degradation in human colon ecosystems. Evidence for the existence and role of bacterial subpopulations producing glycosidases as extracellular enzymes. *The Journal of Clinical Investigation* 67(1), 163-172.
- Huang, J.S., Bousvaros, A., Lee, J.W., Díaz, A. y Davidson, E.J. (2002). Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. *Digestive Diseases and Sciences* 47(11), 2625-2634.
- Hugas, M. (2001). Bioconservación de los productos cárnicos. En: *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos*, Vol. 2, Bejarano, M. (Ed.), pp. 1561-1584. Ediciones Martín y Macías. Plasencia, España.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, T. y Monfort, J.M. (1993). Biochemical characterization of lactobacilli from dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 18(2), 107-113.
- Hugas, M. y Monfort, J.M. (1997). Bacterial starter cultures of meat fermentation. *Food Chemistry* 59(4), 547-554.
- Hummel, A., Holzappel, W.H. y Franz, C.M.A.P. (2007). Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology* 30(1), 1-7.
- Husni, R.N., Gordon, S.M., Washington, J.A. y Longworth, D.L. (1997). *Lactobacillus* bacteriemia and endocarditis: review of 45 cases. *Clinical Infectious Diseases* 25(5), 1048-1055.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods) (1996). *Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens*. Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C. y Tompkin, R.B. (Ed.), Blackie Academic & Professional. Londres.
- Ihnot, A.M., Roering, A.M., Wierzba, R.K., Faith, N.G. y Luchansky, J.B. (1998). Behavior of *Salmonella typhimurium* DT104 during the manufacture and storage of pepperoni. *International Journal of Food Microbiology* 40(1-2), 117-121.
- ILSI (International Life Sciences Institute) (2002). Concepts of functional foods. En: *ILSI Europe Concise Monograph Series*. Bruselas, Bélgica. Disponible en: http://www.ilsa.org/Europe/Publications/C2002Con_Food.pdf (Acceso: 29-10-2013).
- Ishibashi, N. y Yamakazi, S. (2001). Probiotic and safety. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73(2), 465S-470S.

8. Bibliografía

- Ishikawa, H., Akedo, I., Umesaki, Y., Tanaka, R., Imaoka, A. y Otani, T. (2003). Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *Journal of the American College of Nutrition* 22(1), 56-63.
- ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- ISO 8586-1 (1993). Sensory analysis. General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Part 1: Selected assessors.
- ISO 8586-2 (1994). Sensory analysis. General guidance for the selection, training and monitoring of assessors. Part 2: Experts.
- ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004 (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*- Part 1: Detection method. Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.
- Jaroni, D., Ravishankar, S. y Juneja, V. (2011). Microbiology of ready-to-eat foods. En: *Ready-to-eat foods. Microbial Concerns and Control Measures*, Hwang, A. y Huang, L. (Ed.), pp. 1-60. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, Florida.
- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K. y Axelsson, L. (2012). *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 153(1-2), 216-222.
- Jernberg, C., Lofmark, S., Edlund, C. y Jansson, J. (2010). Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 156(11), 3216-3223.
- Jiménez-Colmenero, F. (2000). Relevant factors in strategies for fat reduction in meat products. *Trends in Food Science & Technology* 11(2), 56-66.
- Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J. y Cofrades, S. (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science* 59(1), 5-13.
- Johansson, G., Berdagué, J.L., Larsson, M., Tran, N. y Borch, E. (1994). Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures. *Meat Science* 38(2), 203-218.
- Kannel, W.B. (1996). Blood pressure as a cardiovascular risk factor. *Journal of American Association* 275(20), 1571-1576.
- Karppanen, H. y Mervaalaa, E. (2006). Sodium intake and hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases* 49(2), 59-75.
- Kawai, Y., Ishii, Y., Arakawa, K., Uemura, K., Saitoh, B., Nishimura, J., Kitazawa, H., Yamakaki, Y., Tateno, Y., Itoh, T. y Saito, T. (2004). Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology* 70(5), 2906-2911.
- Kayser, F.H. (2003). Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology* 88(2-3), 255-262.

- Kim, D.H. y Jin, Y.H. (2001). Intestinal bacteria beta-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Archives of Pharmacal Research* 24, 564-567.
- Klingberg, T.D., Axelsson, L., Naterstad, K., Elsser, D. y Budde, B.B. (2005). Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 105(3), 419-431.
- Klingberg, T. D. y Budde, B. B. (2006). The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1-2), 157-159.
- Kolozyn-Krajewska, D. y Dolatowski, Z.J. (2012). Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochemistry* 47, 1761-1772.
- Korbekandi, H., Mortazavian, A.M. y Iravani, S. (2010). Technology and stability of probiotic in fermented milks containing probiotics and prebiotic. En: *Probiotic and prebiotic foods: technology, stability and benefits to human health*, Shah, N.P., da Cruz, G.A. y Faria, Jose de A. F. (Ed.), pp. 131-167. Nova Science Pub Inc.
- Korhonen, J.M., Sclivagnotis, Y. y von Wright, A. (2007). Characterization of dominant cultivable lactobacilli and their antibiotic resistance profiles from faecal samples of weaning piglets. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2496-2503.
- Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J. y Matosic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* 94, 981-987.
- Laparra, J.M. y Sanz, Y. (2009). Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Letters in Applied Microbiology* 49, 695-701.
- Law, M.R. (1997). Epidemiologic evidence on salt and blood pressure. *American Journal of Hypertension* 10(Supl. 4), 42S-45S.
- Lebeer, S., Verhoeven, T.L.A., Vélez, M.P., Vanderleyden, J. y De Keersmaecker, S.C.J. (2007). Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6768-6775.
- Lesbros-Pantoflickova, D., Corthésy-Theulaz, I. y Blum, A.L. (2007). *Helicobacter pylori* and probiotics. *The Journal of Nutrition* 137(3), 812S-818S.
- Liepe, H.U. (1983). Starter cultures in meat production. En: *Biotechnology and food Processing*, Kung, S.D., Bills, D.D. y Quatrano, R. (Ed.), pp. 273-286. Butterworths, Boston, MA, EE.UU.
- Lim, S.M. e Im, D.S. (2012). Inhibitory effects of antagonistic compounds produced from *Lactobacillus brevis* MLK27 on adhesion of *Listeria monocytogenes* KCTC3569 to HT-29 cells. *Food Science and Biotechnology* 21(3), 775-784.
- Liong, M.T. (2007). Probiotics: a critical review of their potential role as antihypertensive, immune modulators, hypocholesterolemics and perimenopausal treatments. *Nutrition Reviews* 65(7), 316-328.

8. Bibliografía

- Lorenzo, J.M. y Franco, D. (2012). Fat effect on physico-chemical, microbial and textural changes through the manufactured of dry-cured foal sausage lipolysis, proteolysis and sensory properties. *Meat Science* 92(4), 704-714.
- Lucca, P.A. y Tepper, B.J. (1994). Fat replacers and the functionality of fat in foods. *Trends in Food Science & Technology* 5(1), 12-19.
- Lücke, F.K. (1998). Fermented sausages. En: *Microbiology of Fermented Foods*, Vol. 2, Wood, B.J.B. (Ed.), pp. 441-483. Blackie Academic & Professional. Londres, Reino Unido.
- Lücke, F.K. (2003). Fermented meat products. En: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutricion*, Caballero, B., Trugo, L. y Finglas, P.M. (Ed.), pp. 2338-2344. Academic Press.
- Marteau, P.R., de Vrese, M., Cellier, C.J. y Schrezenmeier, J. (2001). Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 430S-436S.
- Martín, B., Garriga, M., Hugas, M., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T. y Aymerich, T. (2006). Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 107(2), 147-158.
- Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L. y Rodríguez, J.M. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics* 143, 754-758.
- Mattes, R.D. y Donnelly, D. (1991). Relative contribution of dietary sodium sources. *Journal of American College of Nutrition* 10(4), 383-393.
- Mattila-Sandholm, T., Blaut, M., Daly, C., De Vuyst, L., Doré, J., Gibson, G., Goossens, H., Knorr, D., Lucas, J., Lähteenmäki, L., Mercenier, A., Saarela, M., Shanahan, F. y de Vos, W.M. (2002). Food, GI-tract functionality and human health cluster: PROEUHEALTH. *Microbial Ecology in Health and Disease* 14, 65-74.
- Mättö, J., Fondén, R., Tolvanen, T., Von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Satokari, R. y Saarela, M. (2006). Intestinal survival and persistence of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains administered in triple-strain yoghurt. *International Dairy Journal* 16(10), 1174-1180.
- Mendoza, E., García, M.L., Casas, C. y Selgas, M.D. (2001). Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages. *Meat Science* 57(4), 387-393.
- MERCASA (Mercados Centrales de Abastecimiento, S.A.). (2013). Consumo alimentario en 2012. En: *Alimentación en España 2013*, MERCASA-Distribución y Consumo (Ed.), pp. 38-49. Editorial MIC. Madrid, España.
- Disponible en: http://vw15035.dinaser.com/hosting/mercasa-ediciones.es-web/alimentacion_2013/AE2013/#6/z (Acceso: 17-02-2014).
- Mimura, T., Rizzello, F., Helwig, U., Poggioli, G., Schreiber, S., Talbot, I.C., Nicholls, R.J., Gionchetti, P., Campieri, M. y Kamm, M.A. (2004). Once daily high dose probiotic

- therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 53(1), 108-114.
- Montel, M.C., Masson, F. y Talon, R. (1998). Bacterial role in favour development. *Meat Science* 49(Supl. 1), S111-S123.
- Moore, J.E. (2004). Gastrointestinal outbreaks associated with fermented meats. *Meat Science* 67(4), 565-568.
- Mora-Gallego, H., Serra, X., Guàrdia, M.D. y Arnau, J. (2014). Effect of reducing and replacing pork fat on the physicochemical, instrumental and sensory characteristics throughout storage time of small caliber non-acid fermented sausages with reduced sodium content. *Meat Science* 97(1), 62-68.
- Mora-Gallego, H., Serra, X., Guàrdia, M.D., Miklos, R., Latmetsch, R. y Arnau, J. (2013). Effect of the type of fat on the physicochemical, instrumental and sensory characteristics of reduced fat non-acid fermented sausages. *Meat Science* 93(3), 668-674.
- Moroni, O., Kheadr, E., Boutin, Y., Lacroix, C. y Fliss, I. (2006). Inactivation of adhesion and invasion of food-borne *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Bifidobacterium* strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology* 72(11), 6894-6901.
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D. y Astiasarán, I. (2004). New formulations for healthier dry fermented sausages: a review. *Trends in Food Science & Technology* 15(9), 452-457.
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., Bloukas, J.G. y Astiasarán, I. (2001). Effect of replacing pork backfat with pre-emulsified olive oil on lipid fraction and sensory quality of Chorizo de Pamplona - a traditional Spanish fermented sausage. *Meat Science* 59(3), 251-258.
- NACMCF (National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods) (1991). Foodborne listeriosis. *International Journal of Food Microbiology* 14, 185-246.
- Naser, S.M., Thompson, F.L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M. y Swings, J. (2005). Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. *Microbiology* 151, 2141-2150.
- Netherwood, T., Bowden, R., Harrosin, P., O'Donnel, A.G., Parker, D.S. y Gilbert, H.J. (1999). Gene transfer in the gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* 65(11), 5139-5141.
- Newson, R.S., Elmadfa, I., Byro, Gy., Cheng, Y., Prakash, V., Rust, P., Barna, M., Lion, R., Meijer, G.W., Neufingerl, N., Szabolcs, I., van Zweden, R., Yang, Y. y Feunekes, G.I.J. (2013). Barriers for progress in salt reduction in the general population. An international study. *Appetite* 71, 22-31.
- Nightingale, K.K., Thippareddi, H., Phebus, R.K., Marsden, J.L. & Nutsch, A.L. (2006). Validation of a traditional Italian-style salami manufacturing process for control of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 69, 794-800.

8. Bibliografía

- Nobaek, S., Johansson, M.L. y Molin, G. (2000). Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *The American Journal of Gastroenterology* 95(5), 1231-1238.
- Nychas, G.J.E. y Arkoudelos, J.S. (1990). Staphylococci: their role in fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 167S-188S.
- Oakey, H.J., Harty, D.W. y Know, K.W. (1995). Enzyme production by lactobacilli and the potential link with infective endocarditis. *Journal of Applied Bacteriology* 78, 142-148.
- O'Hara, A.M. y Shanahan, F. (2007). Mechanisms of action of probiotics in intestinal diseases. *The Scientific World Journal* 7, 31-46.
- Olivares, A., Navarro, J.L., Salvador, A. y Flores, M. (2010). Sensory acceptability of slow fermented sausages based on fat content and ripening time. *Meat Science* 86(2), 251-257.
- Ordóñez, J.A. y de la Hoz, L. (2001). Embutidos crudos curados. Tipos. Fenómenos madurativos. Alteraciones. En: *Enciclopedia de la carne y los productos cárnicos*, Vol. II, Martín Bejarano, S. (Ed.), pp. 1063-1090. Ediciones Martín & Macías. Plasencia, España.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C. y Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal* 9(1), 43-52.
- Papadima, S.N. y Bloukas, J.G. (1999). Effect of fat level and storage conditions on quality characteristics of traditional Greek sausages. *Meat Science* 51(2), 103-113.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. y Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science* 65(2), 859-867.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G. y Villan, F. (2004). Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science* 67(2), 309-317.
- Pennacchia, C., Vaughan, E.E. y Villani, F. (2006). Potential probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: further investigations on their probiotic properties. *Meat Science* 73(1), 90-101.
- Pidcock, K., Heard, G.M. y Henriksson, A. (2002). Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. *International Journal of Food Microbiology* 76(1-2), 75-81.
- Poyart, C., Quesnes, G. y Trieu-Cuot, P. (2000). Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* 38(1), 415-418.
- Prasad, J., Harsharanjit, G., Smart, J. y Gopal, P.K. (1998). Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *International Dairy Journal* 8, 993-1002.

- Ravishankar, S. y Juneja, V.K. (2000). Sodium chloride. En: *Natural food antimicrobial systems*, Naidu, A.S. (Ed.), pp. 705-723. CRC Press LLC. Florida, EE.UU.
- Reniero, R., Coconcelli, P., Bottazzi, V. y Morelli, L. (1992). High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. *Journal of General Microbiology* 138, 763-768.
- Rivera Tapia, J.A. (2002). Ecología microbiana del tracto digestivo en la etapa neonatal. *Revista Mexicana de Pediatría* 69(6), 257-260.
- Rizzotti, L., Simeoni, D., Coconcelli, P., Gazzola, S., Dellaglio, F. y Torriani, S. (2005). Contribution of enterococci to the spread of antibiotic resistance in the production chain of swine meat commodities. *Journal of Food Protection* 68, 955-965.
- Roca, M. e Incze, K. (1990). Fermented sausages. *Food Reviews International* 6(1), 91-118.
- Rocourt, J. y Buchrieser, C. (2007). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. En: *Listeria, listeriosis and food safety*, Ryser, E.T. y Marth, E.H. (Ed.), pp. 1-20. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Rouhi, M., Sohrabvandi, S. y Mortazavian, A. M. (2013). Probiotic fermented sausage: viability of probiotic microorganisms and sensory characteristics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(4), 331-348.
- Rovira, A., Nieto, J.C., Rodríguez, A., Reguera, J.I. y González, Z. (1997). Characterization and selection of lactobacilli isolated from Spanish fermented sausages. *Microbiología* 13(2), 201-208.
- Rubio, R., Aymerich, T., Bover-Cid, S., Guàrdia, M.D., Arnau, J. y Garriga, M. (2013a). Probiotic strains *Lactobacillus plantarum* 299V and *Lactobacillus rhamnosus* GG as starter cultures for fermented sausages. *LWT-Food Science and Technology* 54(1), 51-56.
- Rubio, R., Bover-Cid, S., Martín, B., Garriga, M. y Aymerich, T. (2013b). Assessment of safe enterococci as bioprotective cultures in low-acid fermented sausages combined with high hydrostatic pressure. *Food Microbiology* 33, 158-165.
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Aranda, E., Casquete, R. y Córdoba, M.G. (2009). Safety and functional aspects of preselected enterococci for probiotic use in iberian dry-fermented sausages. *Journal of Food Science* 74(7), 398-404.
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Aranda, E., Casquete, R. y Córdoba, M.G. (2011a). Implantation ability of the potential probiotic strain, *Lactobacillus reuteri* PL519, in "Salchichón", a traditional Iberian dry fermented sausage. *Journal of Food Science* 76(5), 268-275.
- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Hernández, A., Casquete, R. y Córdoba, M.G. (2011b). Application of *Lactobacillus fermentum* HL57 and *Pediococcus acidilactici* SP979 as potential probiotics in the manufacture of traditional Iberian dry-fermented sausages. *Food Microbiology* 28(5), 839-847.

8. Bibliografía

- Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Pérez Nevado, F. y Córdoba, M.G. (2008). Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science* 80(3), 715-721.
- Ruusunen, M. y Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science* 70(3), 531-541.
- Ruusunen, M., Vainionpaa, J., Lyly, M., Lahteenmaki, L., Niemisto, M., Ahvenainen, R. y Puolanne, E. (2005). Reducing the sodium content in meat products: The effect of the formulation in low-sodium ground meat patties. *Meat Science* 69(1), 53-60.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J. y Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 84(3), 197-215.
- Saavedra, J.M., Bauman, A., Oung, I., Perman, J.A. y Yolken, R.H. (1994). Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *The Lancet* 344(8929), 1046-1049.
- Sakai, T., Oishi, K., Asahara, T., Takada, T., Yuki, N., Matsumoto, K., Nomoto, K. y Kushiro, A. (2010). M-RTL agar, a novel selective medium to distinguish *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* from *Lactobacillus rhamnosus*. *International Journal of Food Microbiology* 139, 154-160.
- Salminen, M.K., Rautelin, H., Tynkkynen, S., Poussa, T., Saxelin, M. y Valtonen, V. (2006). *Lactobacillus* bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. *Clinical Infectious Diseases* 42(5), 35-44.
- Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E. y Moreau, M.C. (1998). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *British Journal of Nutrition* 80(Supl. 1), S147-S171.
- Salminen, S., Deighton, M. y Gorbach, S. (1993). Lactic acid bacteria in health and disease. En: *Lactic Acid Bacteria*, Salminen, S. y Von Wright, A. (Ed.). Marcel Dekker. Nueva York, EE.UU.
- Salminen, S., Isolauri, E. y Salminen, E. (1996). Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* 70(2-4), 347-358.
- Sánchez-Muniz, F.J. (2004). Alimentos funcionales: carne y derivados cárnicos. Presente y perspectivas. En: *Consumo de carne tendencias: calidad de vida y epidemiología de enfermedades asociadas*, Jiménez Colmenero, F., Sánchez-Muniz, F.J. y Omedilla-Alonso, B. (Ed.), pp. 39-58. Editec@red. Madrid, España.
- Sanz, Y., Collado, M.C. y Dalmau, J. (2003). Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española* 61(9), 58-64.

- Sanz, Y., Vila, R., Toldrá, F. y Flores, J. (1998). Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of non-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 42(3), 213-217.
- Saxelin, M. (1997). *Lactobacillus* GG: A human probiotic strain with thorough clinical documentation. *Food Reviews International* 13, 293-313.
- Saxelin, M. (2008). Probiotic formulations and applications, the current probiotics market, and changes in the marketplace: a European perspective. *Clinical Infectious Diseases* 46(Supl. 2), S76-S79.
- Saxelin, M., Lassig, A., karjalainen, H., Tynkkynen, S., Surakka, A., Vapaatalo, H., Järvenpää, S., Korpela, R., Mutanen, M. y Hatakka, K. (2010). Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 144, 293.
- Sazawal, S., Hiremath, G., Dhingra, U., Malik, P., Deb, S. y Black, R.E. (2006). Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. *Lancet Infectious Diseases* 6(6), 374-382.
- Schiffrin, E.J., Brassard, D., Servin, A.L., Rochat, F. y Donnet-Hughes, A. (1997). Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *The American Journal of Clinical Nutrition* 66(2), 515S-520S.
- Schillinger, U., Lücke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology* 55(8), 1901-1906.
- Schultz, M. y Sartor, R.B. (2000). Probiotics and inflammatory bowel diseases. *The American Journal of Gastroenterology* 95(Supl.1), 19S-21S.
- Serafini, F., Strati, F., Ruas-Madiedo, P., Turrone, F., Foroni, E., Duranti, S., Milan, F., Perotti, A., Viappiani, A., Guglielmetti, S., Buschini, A., Margolles, A., van Sinderen, D. y Ventura, M. (2013). Evaluation of adhesion properties and antibacterial activities of the infant gut commensal *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. *Anaerobe* 21, 9-17.
- Servin, A. (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 28, 405-440.
- Sgouras, D.N., Panayotopoulou, E.G., Martinez-Gonzalez, B., Petraki, K., Michopoulos, S. y Mentis, A. (2005). *Lactobacillus johnsonii* La1 attenuates *Helicobacter pylori*-associated gastritis and reduces levels of proinflammatory chemokines in C57BL/6 mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 12(12), 1378-1386.
- Shelef, L.A. y Seiter, J.A. (1993). Indirect antimicrobial. En: *Antimicrobial in food*, Davidson, P.M. y Branen, A.L. (Ed.), pp. 539-569. Marcel Dekker, Inc. Nueva York, EE.UU.
- Sofos, J.N. (1983). Antimicrobial effects of sodium and other ions in foods: a review. *Journal of Food Safety* 6(1), 45-78.

8. Bibliografía

- Solís, G., de Los Reyes-Gavilan, C.G., Fernández, N., Margolles, A. y Gueimonde, M. (2010). Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* 16(3), 307-310.
- Sosvilla, S. (2010). Dinamismo productivo e innovación. *CLM Economía. Revista Económica de Castilla-La Mancha* 16, 119-151.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. y Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews* 40(1), 722-756.
- Talon, R., Lebert, I., Lebert, A., Leroy, S., Garriga, M., Aymerich, T., Drosinos, E.H., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M.J., Patarata, L. y Lauková, A. (2007). Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1; Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Science* 77(4), 570-579.
- Tanner, A.C., Strzempko, M.N., Belsky, C.A. y McKinley, G.A. (1985). API ZYM and API An-Ident reactions of fastidious oral gram-negative species. *Journal of Clinical Microbiology* 22, 333-335.
- Tannock, G.W., Munro, H.J.M., Harmsen, G.W., Welling, J., Gopal, P.K (2000). Analyses of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Applied and Environmental Microbiology* 66(6), 2578-2588.
- Teuber, M., Meile, L. y Schwarz, F. (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 115-137.
- Toba, T., Yoshioka, E. y Itoh, T. (1991). Potential of *Lactobacillus gasseri* isolated from infant faeces to produce bacteriocin. *Letters in Applied Microbiology* 12, 228-231.
- Toldrá, F., Flores, M. y Sanz, Y. (1997). Dry-cured ham flavour: enzymatic generation and process influence. *Food Chemistry* 59(4), 523-530.
- Tuomola, E.M. y Salminen, S.J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology* 41, 45-51.
- Työppönen, S., Petäjä, E. y Mattila-Sandholm, T. (2003). Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology* 83(3), 233-244.
- Valsta, L.M., Tapanainen, H. y Männistö, S. (2005). Meat fats in nutrition. *Meat Science* 70(3), 525-530.
- Vandevoorde, L., Christiaens, H. y Verstraete, W. (1992). Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 72, 214-219.
- Vestergaard, C.S., Schivazappa, C. y Virgili, R. (2000). Lipolysis in dry-cured ham maturation. *Meat Science* 55, 1-5.
- Vizoso-Pinto, M.G., Schuster, T., Briviba, K., Watzl, B., Holzapfel, W.H. y Franz, C.M.A.P. (2007). Adhesive and chemokine stimulatory properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *Journal of Food Protection* 70(1), 125-134.

- Walker, S.J., Archer, P. y Banks, J.G. (1990). Growth of *L. monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology* 68, 157-162.
- Walter, J., Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S. y Loach, D. (2000). Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology* 66(1), 297-303.
- Wang, K.Y., Li, S.N., Liu, C.S., Perng, D.S., Su, Y.C., Wu, D.C., Jan, C.M., Lai, C.H., Wang, T.N. y Wang, W.M. (2004). Effects of ingesting *Lactobacillus* - and *Bifidobacterium*- containing yogurt in subjects with colonized *Helicobacter pylori*. *American Journal of Clinical Nutrition* 80(3), 737-741.
- Weiss, J., Gibis, M., Schuh, V. y Salminen, H. (2010). Advances in ingredient and processing systems for meat and meat products. *Meat Science* 86(1), 196-213.
- Wine, E., Gareau, M.G., Johnson-Henry, K. y Sherman, P.M. (2009). Strain-specific probiotic (*Lactobacillus helveticus*) inhibition of *Campylobacter jejuni* invasion of human intestinal epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters* 300, 146-152.
- Wirth, F. (1989). Reducing the common salt content of meat products: possible methods and their limitations. *Fleischwirtsch* 69(4), 589-593.
- Xu, H., Jeong, H.S., Lee, H.Y. y Ahn, J. (2009). Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in Applied Microbiology* 49(4), 434-442.
- Yalinkiliç, B., Kaban, G. y Kaya, M. (2012). The effects of different levels of orange fiber and fat on microbiological, physical, chemical and sensorial properties of sucuk. *Food Microbiology* 29(2), 255-259.
- Zanardi, E., Ghidini, S., Conter, M. y Ianieri, A. (2010). Mineral composition of Italian salami and effect of NaCl partial replacement on compositional, physico-chemical and sensory parameters. *Meat Science* 86(3), 742-747.
- Zeuthen, P. (1995). Historical aspects of meat fermentations. En: *Fermented meats*, Campbell-Platt, G. y Cook, P.E (Ed.), pp. 53-68. Blackie Academic & Professional. Glasgow, Reino Unido.
- Zurera-Cosano, G., Otero-Carballeira, A., Carrasco-Jiménez, E., Pérez-Rodríguez, F. y Valero-Díaz, A. (2011). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación al efecto de la reducción de la sal en la seguridad microbiológica de los productos cárnicos curados. *Revista del Comité Científico de la AESAN* 13, 59-87.