



# Evaluación del efecto de la combinación de dos pulsos de alta presión hidrostática sobre *Listeria monocytogenes* en jamón ibérico loncheado

A. Gómez-Quintana<sup>1</sup>, J. Rocha-Pimienta<sup>1</sup>,  
S. Martillanes<sup>2</sup>, J. Delgado-Adámez<sup>1</sup>,  
J. García-Parra<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX) Badajoz, España.

<sup>2</sup> Escuela de Ingenierías Agrarias. Universidad de Extremadura Badajoz, España.

El presente estudio pretende desarrollar un modelo de superficie de respuesta que permita predecir el comportamiento de *Listeria monocytogenes* en jamón ibérico loncheado, mediante la combinación de dos pulsos consecutivos de alta presión hidrostática (APH).

**Palabras clave:** tratamiento de altas presiones, *Listeria monocytogenes*, producto cárnico y superficie de respuesta.

## Introducción

*Listeria monocytogenes* es un microorganismo resistente a factores ambientales como las bajas temperaturas o los medios salinos y tolera amplios rangos de pH; por ello, y debido a su ubicuidad, hace que sea uno de los principales patógenos transmitidos por los alimentos (Farber y Peterkin, 1991). La mayoría de los alimentos donde podemos encontrar esta bacteria están dentro de los considerados alimentos listos para el consumo (LPC) o *ready-to-eat* (RTE), definiéndose como “alimentos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado y otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos”. Los alimentos que están más asociados con listeriosis humana están dentro de la categoría de carne, pescado, leche y productos lácteos. Según la

EFSA, en el 2018 se encontró una prevalencia de *L. monocytogenes* en carnes y productos cárnicos de 2,07% (EFSA, 2018). Este microorganismo presenta una gran capacidad de supervivencia y diseminación, lo que puede generar contaminación a través de las superficies de trabajo en la industria, como las máquinas fileteadoras, tablas de corte y utensilios, entre otros. Esto hace que los nuevos formatos de presentación de alimentos, como son los formatos loncheados empleados en productos cárnicos, sean, por tanto, susceptibles de contaminación en la industria. De hecho, los fenómenos de contaminación cruzada posteriores al procesado de los alimentos pueden aumentar su prevalencia a valores considerados suficientes para causar listeriosis humana (De Candia y cols., 2015).

La presentación de estos nuevos formatos de venta (loncheado frente a piezas enteras) están ligados a cambios en los hábitos de consumo, evolución de la gestión del tiempo en las familias modernas, así como la apertura a nuevos mercados fuera de nuestras fronteras. El loncheado de productos cárnicos, constituye una forma de presentar el producto que no se encuentra libre de determinados riesgos que afectan a la vida comercial del mismo y a su seguridad alimentaria. Además, el aumento de exportación de estos productos cárnicos hace que se tenga que incrementar su seguridad alimentaria.

“

***El objetivo de las altas presiones hidrostáticas es inactivar microorganismos patógenos y alterantes sin aumentar la temperatura de los alimentos y evitar los efectos adversos del calor***

”

La Comisión Europea publicó el reglamento (CE) nº 2073/2005 (UE, 2005) relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, estableciendo criterios de seguridad alimentaria y marcando su aceptabilidad. Se limita la cantidad del patógeno a 100 unidades formadoras de colonia (ufc)/g en productos comercializados, y hay que garantizar su ausencia en 25 g del alimento antes de que haya dejado el control inmediato del operador de la empresa alimentaria que lo ha producido. Pero no todos los países toleran estos niveles, como es el caso de EEUU o Canadá, que establecen tolerancia cero para este microorganismo patógeno. Por todo ello, se hace necesaria la búsqueda de métodos que incrementen la seguridad alimentaria y que puedan promover su exportación, así como su vida útil.

En este sentido, los tratamientos de altas presiones hidrostáticas (APH) pueden mejorar



Alimentos más seguros,  
**sin riesgo.**

#### Alargue la vida útil de sus productos envasados.

Nuestro servicio de pasteurización en frío le asegura una mayor calidad y frescura, sin necesidad de grandes inversiones. Consúltenos.

\*La alta presión inactiva patógenos nocivos, como Listeria, Salmonella y E. coli.

[www.idro.es](http://www.idro.es)



HPP FOOD TECHNOLOGY  
**IDRO**  
fresh life!

TABLA 1

**Factores experimentales y valores de respuesta**  
(disminución de *L. monocytogenes* en log ufc)

	Tiempo (min)	Presión (MPa)	Respuesta
1	4,5	200	-0,28
2	2,75	500	-1,21
3	4,5	400	0,26
4	8	400	0,7
5	8	400	0,32
6	8	600	2,18
7	8	200	0,45
8	4,5	600	2,24
9	4,5	400	0,24
10	2,75	300	0,56
11	4,5	400	0,35
12	1	400	0,36
13	1	600	1,49
14	1	200	0,55
15	4,5	600	
16	1	200	0,06
17	6,25	500	1,3
18	8	400	0,86
19	4,5	400	0,14
20	4,5	200	0,26
21	1	400	0,86
22	1	400	0,08
23	8	600	2,01
24	1	600	1,5
25	4,5	400	0
26	6,25	300	0,17
27	4,5	400	0,35
28	4,5	200	0,33
29	8	200	0,35
30	4,5	600	1,4

la seguridad microbiológica de los alimentos. La APH es una tecnología de conservación “no térmica” que consiste en someter a los alimentos a elevados niveles de presión (200 a 600 MPa) mediante agua, de forma continua, durante un cierto tiempo. Su objetivo inicial es inactivar microorganismos patógenos y alterantes sin aumentar la temperatura de los alimentos significativamente, evitando de este modo los efectos adversos del calor. Los productos obtenidos son microbiológicamente más seguros, con una mayor vida útil y con menos impacto en las características nutricionales y organolépticas de los alimentos en comparación con el procesado térmico (Syed y cols. 2016). Para valorar la eficacia de estos tratamientos se utilizan ensayos de desafío o *challenge test* (Bover-Cid y cols. 2015), los cuales consisten en la inoculación artificial de

un alimento con una concentración conocida de un microorganismo patógeno (p. e. *L. monocytogenes*) y, a través de protocolos específicos, seguir su desarrollo. Tras la inoculación, se aplica un tratamiento de APH para así disminuir la carga inicial de microorganismo presente en el alimento y garantizar la seguridad microbiológica de este.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la aplicación de las APH mediante la combinación de dos pulsos consecutivos, en la eliminación de *L. monocytogenes* inoculada en jamón ibérico loncheado.

**Materiales y métodos**

El estudio se realizó siguiendo las indicaciones de la Unión Europea establecidas en el protocolo para llevar a cabo los ensayos de desafío (UE, 2014). Para ello, el jamón ibérico loncheado fue inoculado a una concentración de 10<sup>8</sup> ufc/mL con un cóctel de cepas de *L. monocytogenes* provenientes de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT 933 y 911). Para ello se repartió de forma homogénea el inóculo sobre 30 gramos de muestras de jamón loncheadas repartidas en bandejas y selladas al vacío.

Se realizó el tratamiento de dos pulsos consecutivos de APH (figura 1) a los lotes de jamón inoculado según las condiciones indicadas por un diseño de experimentos personalizado que tiene como variables el tiempo (A; 1 a 8 minutos) y la presión (B; 200 a 600 MPa) (tabla 1). Las muestras tratadas por APH y no tratadas (control) fueron analizadas tras un almacenamiento de 24 horas en refrigeración (4°C) llevado a cabo tras el tratamiento de altas presiones. Para el recuento de *L. monocytogenes* se siguió el protocolo según norma ISO 11290-2:2017. Se tomaron asépticamente 10 g de muestra de jamón inoculado y fueron diluidos con 90 mL de caldo Fraser, homogenizados y mantenidos a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales del homogenizado utilizando agua de peptona tamponada estéril y 0,1 ml de la dilución correspondiente fueron extendidos en placas de medio Cromogénico de *Listeria* suplementado con SR0244E y SR0226E (Oxoid). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24-48 horas.

Los resultados fueron analizados con modelo de superficie de respuesta mediante el software Design Expert v.10

## Resultados y discusión

En la **tabla 1** se muestran los resultados del diseño experimental en función de las condiciones establecidas de presión y tiempo. En ella se especifican las reducciones del contenido de *L. monocytogenes* (respuesta) como disminución expresadas en log ufc para cada una de las condiciones establecidas desde una presión de 200 MPa hasta 600 MPa y unos tiempos de 1 a 8 minutos.

El modelo de superficie obtenido se muestra en la **figura 1**, representando gráficamente la disminución de recuentos de microorganismos (log ufc), el tiempo (min) y la presión (MPa). Los datos fueron ajustados a un modelo cuadrático de superficie de respuesta y analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA).

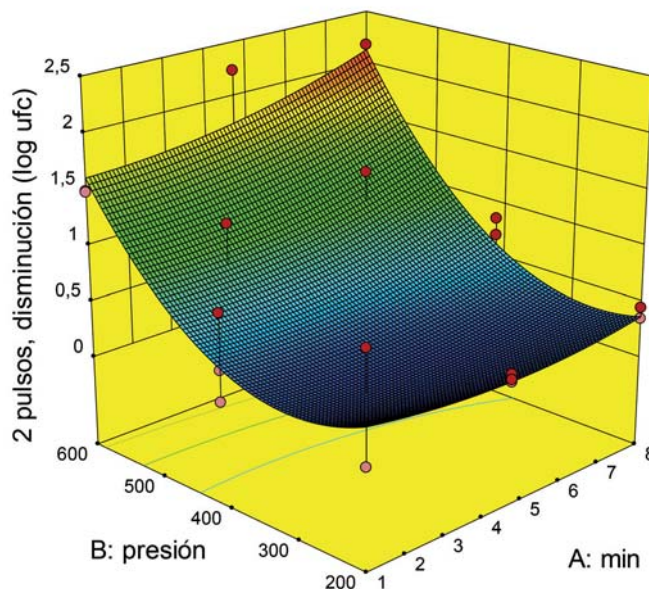
Este análisis mostró que tanto el modelo, como la variable presión (B) y su cuadrado (B<sup>2</sup>) fueron significativos. En la superficie de respuesta así obtenida se puede observar que la reducción del patógeno es mayor a medida que aumenta la presión de los pulsos aplicados, obteniendo un óptimo de efectividad a las condiciones más drásticas ensayadas (600 MPa, durante 8 min).

En este punto, la superficie de respuesta predice una reducción máxima de 2,13 log ufc/g. Estudios de pruebas de desafío, indican que tratamientos de 600 MPa son eficaces para inactivar patógenos (Jofre y cols., 2009). Un comportamiento muy similar al de nuestro estudio fue observado por otros autores, como Bover-Cid y cols. (2011) que indicaron que las reducciones en *L. monocytogenes* inoculada en jamón curado aumentaban con la presión y tiempos de tratamiento, obteniéndose las mayores reducciones a 600 MPa y 9 minutos (2,9 log ufc/g). Aunque en otros productos alimenticios la inactivación de *L. monocytogenes* por APH a 600 MPa son mayores, sus modelos de predicción (Gao y cols. 2006; Koseki y cols.

FIGURA 1

### Gráfica de superficie de respuesta de la aplicación de dos pulsos de APH de reducción de *Listeria monocytogenes*

(Valores de log ufc a las diferentes combinaciones de presión (MPa) y tiempo (min))



2007) no son adecuados para predecir el comportamiento de este patógenos en jamón curado.

En conclusión, las APH reducen las poblaciones de *L. monocytogenes* aunque la aplicación de dos pulsos consecutivos no consigue alcanzar el límite establecido por el test de desafío. Por ello, esta tecnología debe ser combinada con otras técnicas de conservación que permitan garantizar la inocuidad del alimento. Una buena estrategia para mejorar la eficacia de tratamientos de altas presiones y producir LPC libre de patógenos sería el uso de agentes antimicrobianos. En este sentido, Hereu y cols. (2012) sugieren que el empleo de antimicrobianos junto con la presurización y almacenamiento de productos cárnicos curado promueve una mayor seguridad en el control de *L. monocytogenes*.



**Seguridad alimentaria**  
en productos tratados  
con **altas presiones**

664549479 | info@accuahpp.com



Bandeja con lonchas de jamón inoculado.

Por otra parte, diversos estudios indican que la inactivación de este microorganismo por APH se podría mantener durante un almacenamiento en refrigeración, como son los estudios de Pérez-Baltar y cols. (2020) que indicaron que tratamientos de APH (600 MPa 5 min), alcanzaron reducciones de 2 log ufc/g en jamón curado manteniéndose durante 60 días a 4°C.

### Agradecimientos

Este estudio se enmarca en el proyecto IN-NOACE, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) a través del Programa INTERREG V-A España-Portugal (POCTEP) 2014-2020 de la Comisión Europea. Los autores agradecen a la Junta de Extremadura y fondos FEDER la ayuda económica recibida (AGA002/GR18192). J. Rocha-Pimienta agradece a la Junta de Extremadura por el contrato de formación predoctoral concedido (PD18018).

### Referencias

- **Bover-Cid, S., Belletti, N., Aymerich, T., Garriga, M.** (2015). Modeling the protective effect of  $a_w$  and fat content on the high pressure resistance of *Listeria monocytogenes* in dry-cured ham. *Food Research International*, 75, 194-199.
- **Bover-Cid, S., Belletti, N., Garriga, M., Aymerich, T.** (2011). Model for *Listeria monocytogenes* inactivation on dry-cured ham by high hydrostatic pressure processing. *Food Microbiology*, 28(4), 804-809.
- **De Candia, S., Morea, M., Baruzzi, F.** 2015. Eradication of high viable loads of *Listeria*

*monocytogenes* contaminating food-contact surfaces. *Frontiers in microbiology*. 6. 733. 10.3389/fmicb.2015.00733.

- **European Commission (EC)** (2014). EURL Lm technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods.
- **EFSA y ECDC** (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12), e05500.
- **Gao, Y.L., Ju, X.R., Jiang, H.H.**, 2006. Statistical analysis of inactivation of *Listeria monocytogenes* subjected to high hydrostatic pressure and heat in milk buffer. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70, 670e678.
- **Farber, J. M., & Peterkin, P. I.** (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55(3), 476-511.
- **Hereu, A., Bover-Cid, S., Garriga, M., Aymerich, T.** (2012). High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology*, 154(3), 107-112.
- **Jofré, A., Aymerich, T., Grèbol, N., Garriga, M.** (2009). Efficiency of high hydrostatic pressure at 600 MPa against food-borne microorganisms by challenge tests on convenience meat products. *LWT-Food Science and Technology*, 42(5), 924-928.
- **Koseki, S., Mizuno, Y., Yamamoto, K.**, 2007. Predictive modelling of the recovery of *Listeria monocytogenes* on sliced cooked ham after high pressure processing. *Int. J. Food Microbiol.* 119, 300e307.
- **Pérez-Baltar, A., Serrano, A., Montiel, R., Medina, M.** (2020). *Listeria monocytogenes* inactivation in deboned dry-cured hams by high pressure processing. *Meat science*, 160, 107960.
- **Reglamento (CE) n° 2073/2005** de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE) núm. 338, de 22 de diciembre de 2005, páginas 1 a 26.
- **Syed, Q.-A., Buffa, M., Guamis, B., Saldo, J.** (2016). Factors affecting bacterial inactivation during high hydrostatic pressure processing of foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(3), 474-483. e



DISTRIBUIDOR PARA ESPAÑA



Know-how in food processing!

- Descortezadoras
- Desveladoras
- Desmembradoras
- Cortadoras
- Peladoras
- Hielo en escamas



FLEISCHEREIMASCHINEN

- Atadoras
- Afiladoras
- Cosedoras

Atadoras *Rollmatic*<sup>®</sup>



Cosedoras *Hängfix*<sup>®</sup>



Afiladoras





## Review of the effects of multi-pulsed high hydrostatic pressure treatment on *Listeria monocytogenes* in sliced Iberian dry cured ham

A. Gómez Quintana<sup>1</sup>,  
J. Rocha-Pimienta<sup>1</sup>,  
S. Martillanes<sup>2</sup>,  
J. Delgado Adámez<sup>1</sup>,  
J. García Parra<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX). Badajoz, Spain

<sup>2</sup> Escuela de Ingenierías Agrarias y Agroalimentarias. Universidad de Extremadura. Badajoz, Spain.

This study aims to develop a response surface model for predicting the behaviour of *Listeria monocytogenes* in sliced Iberian ham when treated with two consecutive pulses of high hydrostatic pressure (HHP).

### Key words

High-pressure treatment, *Listeria monocytogenes*, meat products, response surface.

### Introduction

*Listeria monocytogenes* is a microorganism that tolerates a wide pH range and is capable of surviving in low temperatures and saline mediums. These aspects, together with the ubiquity of the microorganism, make it one of the primary foodborne pathogens (Farber and Peterkin, 1991). Most of the foods where this bacteria may be present are ready-to-eat (RTE) products. New product formats and presenta-

tions such as sliced meats carry certain risks that may affect the shelf life and food safety of refrigerated products. Increased export of these meat products requires even greater attention to food safety, and in this sense, high hydrostatic pressure (HHP) treatments have been shown to increase microbiological food safety.

HHP is a non-thermal preservation technology that treats foods with very high pressure (200 to 600 MPa) by means of pulses of water for a certain length of time. The initial aim is to inactivate pathogenic and safety-altering microorganisms without significantly increasing the temperature of foods, thus minimising any adverse thermal effects. The resulting products have a safer microbiological profile, a longer shelf life and minimised damage to nutritional and organoleptic qualities as compared to thermal processing (Syed et al., 2016).

### Materials and methods

The sliced Iberian dry cured ham was inoculated at a concentration of 108 cfu/mL with a cocktail of *L. monocytogenes* strains from the Spanish Type Culture Collection (CECT 933 and 911). The inoculated ham was treated with two consecutive pulses of HHP as per the conditions indicated by a personalised experiment design with the variables of time (A: 1 to 8 minutes) and pressure (B: 200 to 600 MPa). The HHP-treated samples and the control samples (not treated) were then analysed after 24 hours of refrigeration (4°C) following the HHP treatment.

### Results and discussion

**Table 1** shows the results of the experimental design according to the established conditions of time and pressure. It reveals the reduction in *L. monocytogenes* (response) as a decrease expressed as log cfu for each of the established conditions, from a time ranging between 1 and 8 minutes and a pressure of between 200 MPa and 600 MPa. The resulting surface model is shown in **figure 1**, which graphs the decrease in microorganism count (log cfu), time (min) and pressure (MPa). The data was adjusted to a quadratic response surface model and analysed using analysis of variance (ANOVA). The resulting response surface shows that the higher the pressure of the pulses, the greater the reduction in the pathogen, with optimum effective-

TABLE 1

**Experimental factors and response values**  
 (decrease of *L. monocytogenes* in log cfu)

	Time (min)	Pressure (MPa)	Response
1	4.5	200	-0.28
2	2.75	500	-1.21
3	4.5	400	0.26
4	8	400	0.7
5	8	400	0.32
6	8	600	2.18
7	8	200	0.45
8	4.5	600	2.24
9	4.5	400	0.24
10	2.75	300	0.56
11	4.5	400	0.35
12	1	400	0.36
13	1	600	1.49
14	1	200	0.55
15	4.5	600	
16	1	200	0.06
17	6.25	500	1.3
18	8	400	0.86
19	4.5	400	0.14
20	4.5	200	0.26
21	1	400	0.86
22	1	400	0.08
23	8	600	2.01
24	1	600	1.5
25	4.5	400	0
26	6.25	300	0.17
27	4.5	400	0.35
28	4.5	200	0.33
29	8	200	0.35
30	4.5	600	1.4

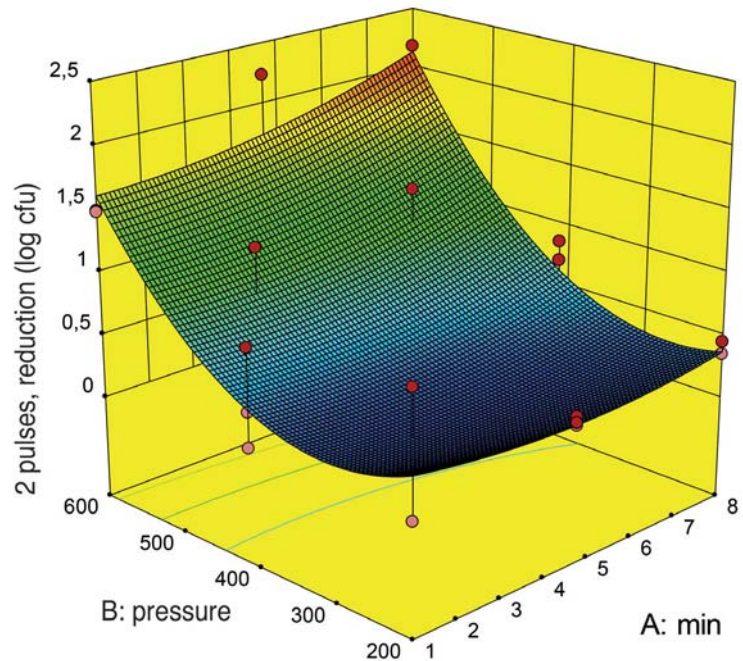
ness deriving from the most extreme conditions applied (600 MPa for 8 minutes). The response surface predicts a maximum reduction at this point of 2.13 log cfu/g. Challenge test studies reveal that treatments of 600 MPa are effective for inactivating pathogens (Jofre et al., 2009).

In conclusion, HHP reduces *L. monocytogenes* populations, although the application of two consecutive pulses does not reach the limit established by the challenge test. This technology must therefore be combined with additional preservation techniques to guarantee the highest level of food safety. A good strategy for improving the efficacy of high-pressure treatments and producing pathogen-free RTEs would be to apply antimicrobial agents. Hereu

FIGURE 1

**Graph of the response surface for reducing *Listeria monocytogenes* through the application of two pulses of HHP**

(Log cfu values for different combinations of pressure (MPa) and time (min))



“

***HHP reduces *L. monocytogenes* populations, although the application of two consecutive pulses does not reach the limit established by the challenge test. This technology must therefore be combined with additional preservation techniques to guarantee the highest level of food safety***

”

et al., (2012) suggest that the combined use of antimicrobials and the pressurisation and storage of dry cured meat products is effective for controlling *L. monocytogenes* to ensure the highest level of food safety. Various other studies indicate that the inactivation of this microorganism by HHP could be maintained in cold storage. Pérez-Baltar et al., (2020) showed that HHP treatments (600 MPa for 5 minutes) reduced microorganisms by 2 log cfu/g in dry cured ham, maintaining this level for 60 days at 4°C. e