

# Inhibición de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* mediante alta presión hidrostática en un producto listo para el consumo como el *bloc de foie gras*

Nicoletta Belletti, Brigitte Martínez, Teresa Aymerich y Margarita Garriga

IRTA  
Finca Camps i Armet s/n  
17121 Monells (Girona)

Se presenta la aplicación de la alta presión hidrostática (APH) como tratamiento post-ensado de bloc de *foie gras* cortado y envasado al vacío con el objetivo de mejorar la estabilidad del mismo y asegurar el cumplimiento de los criterios de seguridad alimentaria (Reglamento 2073/2005) para productos listos para el consumo.



## Introducción

### El bloc de foie gras

La definición de *foie gras* (palabra francesa que significa hígado graso y que está recogida como tal en el diccionario de la Real Academia Española), es el hígado de ganso o de pato hipertrofiado a propósito como

consecuencia de la sobrealimentación a la que se somete al animal. Se consigue así un hígado graso, pero en ningún caso enfermo o insalubre (Bonnaure A., 2006).

En España y en otros países de la Unión Europea, el *foie gras* carece de normas de calidad que regulen su producción y su comercialización. Por ello, los productores se remiten a la normativa francesa donde las preparaciones elaboradas se clasifican en función de su composición. El Decreto nº 93-999 del 9 de agosto (J.O.R.F, 1993), al cual se remiten estas empresas, está en vigor desde el 1 de enero de 1994.

Entre los varios tipos de denominaciones que contempla dicha normativa, existe la del *bloc de foie gras* (con o sin trozos). Se trata de un producto reconstituido a partir del 100% de *foie gras* y, en el caso que la etiqueta indique la presencia de trozos, la masa total de estos debe representar al menos el 30% del producto final.

Después de la homogenización de la masa, esta es envasada y tratada por calor (aproximadamente 90 minutos hasta alcanzar una temperatura de corazón de 80°C (Boucher y Fromentier, 1999)). Los objetivos de esta cocción son: mejorar las características organolépticas y garantizar la seguridad del producto acabado.

El 60% de la producción de *bloc de foie gras* se vende en su envase original, y su vida útil es superior a 6 meses a 4°C (Matamoros y col., 2010). En cambio, el 40% restante se corta y se re-ensava, normalmente al vacío.

Durante esta última fase, el producto puede sufrir una re-contaminación por bacterias deteriorantes (mayoritariamente bacterias ácido lácticas- BAL) y patógenas (ej. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp.). En el *foie gras* re-ensavado al vacío, las BAL se desarrollan y causan principalmente una disminución de pH, lo que implica un importante cambio en las características sensoriales (Bjorkroth y col., 2005; Vasilopoulos y col., 2007) y la posible re-contaminación por bacterias patógenas representaría un peligro para la salud del consumidor.

### Criterios microbiológicos

Con la finalidad de garantizar la salud del consumidor, el Reglamento (CE) 2073/2005 define los criterios microbiológicos aplicables, entre otros, a los productos listos para el consumo (RTE, *ready to eat*). Para cumplir con estos criterios, las empresas alimentarias, responsables de garantizar la seguridad alimentaria de los productos que elaboran a lo largo de toda su vida útil, deben realizar los controles de prevención (planes APPCC, etc.) y además pueden, facultativamente, realizar estudios complementarios. El Reglamento 2073/2005 considera estudios complementarios los modelos matemáticos predictivos y la ejecución de un *challenge test*, definido como “pruebas para investigar la capacidad que tiene un microorganismo inoculado, para crecer o sobrevivir en un determinado producto en

diferentes condiciones de almacenamiento razonablemente previsibles”.

### Las nuevas tecnologías y el procesado por alta presión hidrostática

En los últimos años, las tecnologías no térmicas de conservación se están considerando a nivel industrial como un tratamiento de descontaminación alternativo al tratamiento por calor. El procesado por alta presión hidrostática (APH) representa una de las tecnologías más prometedoras. Hoy en día la aplicación de dicha tecnología tanto en productos frescos (ostras, langostas) como en productos envasados (listos para el consumo), empieza a ser común en todo el mundo (Japón, USA, Italia, Alemania y Australia). La aplicación a nivel industrial del tratamiento de pasteurización para la inactivación de las células vegetativas normalmente está comprendido entre 300-600 MPa por tiempos entre algunos segundos hasta varios minutos (Aymerich y col., 2008).

La APH permite la inactivación de microorganismos patógenos y deteriorantes de alimentos con cambios mínimos en su textura, color y sabor (Torres y Velázquez, 2005; Velázquez y col., 2002; Cheftel, 1995).

La magnitud del efecto de inhibición de las células microbianas depende de numerosos factores relacionados tanto con las actividades celulares (fase de crecimiento), como en las características intrínsecas de un alimento (pH, actividad de agua, porcentaje de grasa, sal, etc.) (Tewari y col., 1999) y las condiciones de proceso adoptadas (presión, tiempo de tratamiento, temperatura de tratamiento).



Las células que sobreviven a un tratamiento por APH, en algunas condiciones, pueden reparar el daño sufrido y volver a crecer en el alimento a lo largo de la vida útil del producto (Chen y Hoover, 2003; Garriga y col., 2002).

## *La altas presiones hidrostáticas permiten inactivar microorganismos patógenos y deteriorantes de alimentos con cambios mínimos en su textura, color y sabor*

### Objetivos

El *bloc* de *foie gras*, objeto del presente estudio y dadas sus características de composición, pH, y actividad de agua, se coloca entre los alimentos RTE que permiten el desarrollo tanto de *L. monocytogenes* como de otros microorganismos.

Con el objetivo de mejorar la calidad sensorial y microbiológica del *bloc* de *foie gras* (Mas Parés-Sant Martí Sapresa), se realizó una optimización del proceso por APH sobre su producto cortado y envasado al vacío.

Aplicando las condiciones de proceso por APH optimizadas (datos confidenciales), se realizó un estudio de *challenge test* inoculando el producto con *L. monocytogenes* y *Salmonella enterica* con el objetivo de investigar si el tratamiento contribuye a garantizar la seguridad microbiológica del producto acabado.

### Métodos y equipamiento

El *bloc* de *foie gras* fue cortado de forma estéril en lonchas de  $60 \pm 2$  g. Se inoculó cada loncha de *bloc* de *foie gras* con 160  $\mu$ l de suspensión microbiana (cóctel de 3 cepas de *L. monocytogenes* y 3 cepas de *S. enterica*) para obtener en cada muestra un nivel por debajo de 100 ufc/g y de 40 ufc/g para *L. monocytogenes* y *S. enterica*, respectivamente.

Las muestras se envasaron al vacío, la mitad de ellas se presurizaron con la combinación más óptima de temperatura, presión y tiempo (muestras APH+). La otra mitad de las muestras inoculadas no se presurizaron (muestras control). Se incluyeron en el estudio muestras no inoculadas y no tratadas por alta presión (definidas como blanco), para investigar la presencia o ausencia de ambos patógenos en el producto original.

La presurización se realizó en un equipo industrial Hyperbaric NC Wave 6000/120 de 100-120 litros y de 30 cm de diámetro interno que alcanza un máximo de 600 MPa y que está en las instalaciones que IRTA-CENTA dispone en Monells.

El control microbiológico de las muestras se realizó a través del recuento en placa de medios selectivos: ALOA para *L. monocytogenes*, ChromAgar para *Salmonella*, y MRS para BAL. Se utilizó la técnica de PCR a tiempo real para investigar presencia o ausencia de patógenos para aquellas muestras que se encontraron por debajo del límite de detección (<4 ufc/g) en recuento en placa.

Tanto las muestras APH+ como las control, y las blanco se analizaron a lo largo de 120 días alternando 3 temperaturas de conservación: 4°C (primera semana de almacenamiento), 12°C (desde día 8 hasta día 63) y 8°C (desde día 64 hasta día 120). Las condiciones de preparación de los inóculos, el número de muestras para controlar y el perfil de la temperatura de almacenamiento a lo largo de este tiempo de conservación se establecieron según la guía *Technical Guidance Document* (Beaufort y col., 2008).

### Resultados

#### Resultados de inactivación de *Listeria monocytogenes*

En la **figura 1** se observa el comportamiento de *L. monocytogenes* en las muestras APH+ y en las control, junto al perfil de temperatura de almacenamiento utilizado. En las muestras blanco no se detectó presencia de *L. monocytogenes*.

El nivel inicial de células inoculadas fue de 78 ufc/g de producto. Como se esperaba y dada la composición del producto y de sus características fisicoquímicas, *L. monocytogenes* demostró un buen potencial de crecimiento en las muestras control. A pesar de las condiciones de almacenamiento, que fueron de 4°C en los primeros 7 días, este microorganismo alcanzó valores de  $10^4$  ufc/g.

A los 30 días llegó a los  $10^8$  ufc/g y posteriormente se mantuvo en este orden hasta los 120 días de conservación, con una temperatura de almacenamiento que pasó inicialmente de 4°C a 12°C y terminó a 8°C a los 120 días.

Por el contrario, el tratamiento de alta presión hidrostática realizado sobre las muestras APH+ ejerció un efecto bactericida inmediato. *L. monocytogenes* permaneció por debajo del límite de detección de < 4 ufc/g (representado como 0 en la **figura 1**) tanto en las muestras analizadas inmediatamente después del tratamiento por APH, como en las analizadas a lo largo de los

120 días de almacenamiento. Esporádicamente, y a lo largo de todo el tiempo de almacenamiento, algunas células sobrevivieron al tratamiento de APH (presencia en 25 g). Este dato indica que, en las condiciones experimentales de presurización, estos productos difícilmente significarían un riesgo para el consumidor.

Estos resultados evidencian claramente la potencialidad del tratamiento de presurización utilizado. Se demuestra, que las condiciones experimentales de presión y tiempo adoptadas en el presente estudio inhiben de forma inmediata el crecimiento y no permiten la recuperación de *L. monocytogenes*. Por tanto, el producto tratado por alta presión hidrostática aseguraría el cumplimiento de los criterios de seguridad alimentaria establecidos en el Reglamento n° 2073/2005 que es de 100 ufc/g para *L. monocytogenes* a lo largo de la vida útil.

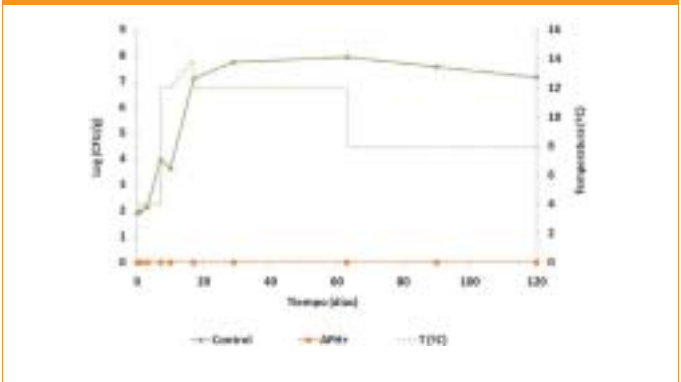
### Resultados de inactivación de *Salmonella*

En la **figura 2** se presentan los resultados de las muestras presurizadas (APH+), las control y el perfil de temperatura de almacenamiento. Las condiciones de temperatura se definieron, igual que se hizo para *L. monocytogenes*, según la guía *Technical Guidance Document* (Beaufort y col., 2008).

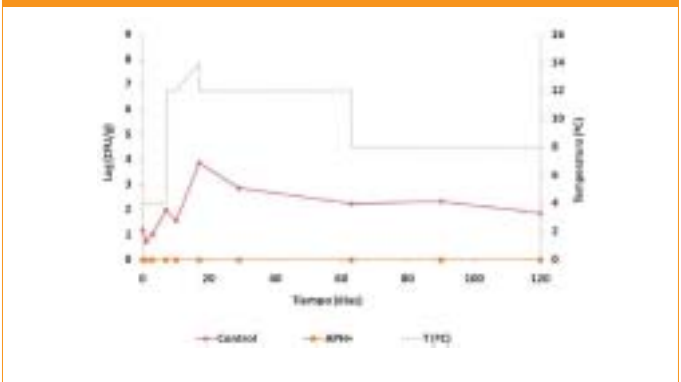
El nivel inicial de inóculo para las muestras inoculadas con *S. enterica* fue de 16 ufc/g. Este patógeno fue capaz de crecer en las muestras control, al incrementar de la temperatura de conservación a 12°C, aunque a un nivel más bajo que el registrado para *L. monocytogenes*. A los 20 días de almacenamiento, las muestras control alcanzaron los valores máximos de 10<sup>4</sup> ufc/g, mientras que para las muestras APH+, la presurización provocó un efecto bactericida inmediato que se mantuvo a lo largo de todo el estudio de vida útil. Los niveles de *Salmonella* en las muestras APH+, fueron inferiores al nivel de detección (<4 ufc/g, representado como 0 en la **figura 2**) durante los 120 días. También para *Salmonella*, esporádicamente, y a lo largo de todo el tiempo de almacenamiento, algunas células sobrevivieron al tratamiento de APH (presencia en 25 g).

Paralelamente a la detección de patógenos, se evaluó la evolución de las bacterias del ácido láctico (BAL) tanto para las muestras APH+ como para las control. El desarrollo de este tipo de microorganismos afecta negativamente a las características sensoriales del producto, causando por una parte, la disminución del pH y por otra, la disminución de la aceptabilidad del producto. En la **figura 3** se muestra que el pH de las control disminuyó de 6,0 a 5,0 en los primeros 30 días y que éste permaneció alrededor de 5,0 a lo largo de los 120 días.

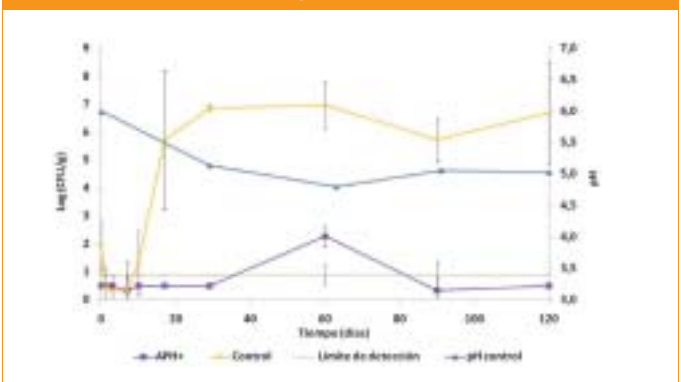
**Figura 1. Evolución de *L. monocytogenes* en bloc de foie gras tratado (APH+) o no tratado (control) por APH y perfil de temperatura a lo largo del estudio de challenge test**



**Figura 2. Evolución de *Salmonella* en bloc de foie gras tratado (APH+) o no tratado (control) por APH y perfil de temperatura a lo largo del estudio de challenge test**



**Figura 3. Evolución de BAL en bloc de foie gras tratado (APH+) o no tratado (control) por APH y perfil de pH de las muestras control a lo largo del estudio de challenge test**



En las muestras no procesadas por APH las BAL se desarrollaron más o menos a la misma velocidad que *L. monocytogenes*, alcanzando la fase estacionaria ( $10^7$  ufc/g) a día 30. En las muestras APH+, las BAL se mantuvieron por debajo del límite de detección de 10 ufc/g en, prácticamente, todos los puntos de muestreo.

## El desarrollo de bacterias del ácido láctico afecta a las características sensoriales, disminuyendo el pH y la aceptabilidad del producto

### Conclusiones

Gracias al tratamiento por altas presiones hidrostáticas aplicado durante la realización del *challenge test* y desarrollado durante el proyecto FUTURAL, la calidad microbiológica del *bloc* de *foie gras* cortado y envasado al vacío mejora significativamente. Se ha logrado la estabilidad microbiológica del producto como resultado de la inhibición de las BAL responsables del deterioro de esta categoría de productos.

El resultado de inhibición obtenido frente a las cepas patógenas inoculadas demuestra que la correcta combinación de presión/tiempo aplicado, se puede incluir como “tratamiento post-letalidad” para incrementar la seguridad del *bloc* de *foie gras* frente a una contaminación accidental por *Listeria monocytogenes* y/o *Salmonella*.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto FUTURAL (CEN 20072016) ([www.cenitfutural.org](http://www.cenitfutural.org)). Las autoras agradecen la colaboración de Elvira Tenorio en el análisis de las muestras, al CENTA por la disponibilidad de las instalaciones y a la empresa Mas Parés por el suministro de las muestras.

### Referencias

- Aymerich T., Picouet P.A., Monfort J.M. (2008). Decontamination technologies for meat products. *Meat Science*, 78, 114–129.
- Beaufort A., Cornu, M., Bergis, H., Lardeux, A.-L., Lombard, B. (2008). *Technical guidance document on*

*shelf-life studies for Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods*. Community Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*.

- Bjorkroth J., Ristiniemi M., Vandamme P., Korkeala, H. (2005). *Enterococcus* species dominating in fresh modified-atmosphere-packaged, marinated broiler legs are overgrown by *Carnobacterium* and *Lactobacillus* species during storage at 6 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 267–276.
- Bonnaure André. *Foie Gras*. Editado por Montagut Editores. 2006.
- Boucher L., Fromentier D. (1999). Valeurs pasteurisatrices des foies gras. *CT Infos Hors Série 1999 “Foie Gras”*. pp. 31–34.
- Cheftel J. C. (1995). High pressure, microbial inactivation and food preservation. *Comptes Rendus de l’Académie d’Agriculture de France* 81 (1), 13-38.
- Chen H., Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 81-100.
- European Commission (2005a). Commission Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance). *Official Journal*, L338, 1–26.
- Garriga M., Aymerich M.T., Costa S., Monfort J.M., Hugas M. (2002). Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage. *Food Microbiology*, 19, 509–518.
- Matamoros S., André S., Hue I., Prévost H., Pilet M.F. (2010). Identification of lactic acid bacteria involved in the spoilage of pasteurized “foie gras” products. *Meat Science*, 85, 467-471.
- European Community (EC). (2008). Guidance document on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under regulation (EC) n° 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Brussels: *European Commission*. [http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/guidoc\\_listeria\\_monocytogenes\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/guidoc_listeria_monocytogenes_en.pdf).
- Tewari G., Jayas D.S., Holley R.A. (1999). High pressure processing of foods: An overview. *Sciences des Aliments*, 19, 619–661.
- Vasilopoulos C., Ravyts F., De Maere H., De Mey E., Paelinck H., De Vuyst L., Leroy F. (2008). Evaluation of the spoilage lactic acid bacteria in modified-atmosphere-packaged artisan-type cooked ham using culture-dependent and culture independent approaches. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1341–1353.
- Velázquez, G., Gandhi, K., Torres, J.A. (2002). Hydrostatic pressure processing: a review. *Biotam* 12(2), 71-78. ■