



# ESTRATEGIAS INNOVADORAS PARA DESARROLLAR ALIMENTOS MÁS SALUDABLES





# ESTRATEGIAS INNOVADORAS PARA DESARROLLAR ALIMENTOS MÁS SALUDABLES

## FOODSME-HOP TECHNOLOGY BOOK

### EDITORAS

Dra. Elena Fulladosa y Dra. Maria Dolors Guàrdia  
IRTA - Tecnología Alimentaria



## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), a través del Programa de Cooperación Interregional del Espacio Suroeste Europeo (Interreg SUDOE IVB), por la financiación del proyecto FOODSME-HOP (SOE/P1/E299), del cual deriva el presente libro.

Se agradece al conjunto de socios del proyecto FOODSME-HOP que hayan hecho posible la publicación de este documento así como a las empresas por su colaboración en los proyectos de demostración.

Un agradecimiento especial para Catalina Pérez y Sofía Gkika por su ayuda en la edición del libro.

---

### ESTRATEGIAS INNOVADORAS PARA DESARROLLAR ALIMENTOS MÁS SALUDABLES

© 2013 de la edición original:

Capítulo 1: IPVC

Capítulo 2: ITERG

Capítulo 3: IRTA y AINIA

© 2013 de la traducción al español:

Capítulo 1 / Capítulo 2

ADI, AINIA, IPVC, IRTA, ITERG, FUNDECYT-PCTEX, Agencia Andaluza del Conocimiento

**Editado por IRTA:**

Finca Camps i Armet, Edificio A

E-17121 Monells (Girona)

ESPAÑA

Tel: +34 902 789 449 - Fax: +34 972 630 980

**Coordinación editorial:**

blueBOARD

Còrsega 453, 1º 3ª

08037 Barcelona

+34 934 575 832

**Corrección ortotipográfica y de estilo:**

LACÒNIC SANS SCP

**Maquetación:**

Concepte Gràfic

ISBN 13: 978-84-940022-3-6.

Depósito legal: B.8974-2013

**Impreso en España por:**

MEDIAactive

# **CAPÍTULO 1**

## **BIOCONSERVACIÓN DE ALIMENTOS TRADICIONALES POR ADICIÓN DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS Y DE SUS BACTERIOCINAS**

Jácome SL<sup>1</sup>, Todorov SD<sup>2</sup>, Fonseca SC<sup>1</sup>, Pinheiro R<sup>1</sup>, Guerreiro JS<sup>1</sup>, Monteiro V<sup>1</sup>, Fernandes P<sup>1</sup>, Noronha L<sup>3</sup>, Almeida G<sup>3</sup>, Gomes AM<sup>3</sup>, Pintado MM<sup>3</sup>, Silva CLM<sup>3</sup>, Morais AMMB<sup>3</sup>, Silva J<sup>3</sup>, Teixeira P<sup>3</sup>, Vaz Velho M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escola Superior de Tecnologia e Gestão – Instituto Politécnico de Viana do Castelo  
Avenida do Atlântico s/n, 4900-348 Viana do Castelo (Portugal)

<sup>2</sup>Departamento de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 14, 05508-900 São Paulo (Brasil)

<sup>3</sup>Escola Superior de Biotecnologia – Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto (Portugal)

# Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>10</b>
1.1 Productos alimentarios tradicionales y desarrollo rural.....	10
1.2 Conservantes sintéticos en productos ahumados/curados..	10
1.3 Bioconservación de alimentos .....	12
1.3.1 Las bacterias acidolácticas .....	13
1.3.2 Metodologías y requisitos de aplicación de las bacterias acidolácticas .....	14
<b>2. CASO PRÁCTICO: SUSTITUCIÓN DE ADITIVOS POR CULTIVOS DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS EN UN PRODUCTO CURADO/AHUMADO TRADICIONAL.....</b>	<b>16</b>
2.1 Definición del producto.....	16
2.2 Objetivos .....	17
2.3 Desarrollo experimental .....	18
2.4 Resultados.....	19
<b>3. CONCLUSIONES.....</b>	<b>21</b>
<b>4. AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>21</b>
<b>5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>22</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 PRODUCTOS ALIMENTARIOS TRADICIONALES Y DESARROLLO RURAL

“  
En una época en que  
las fronteras políticas  
y económicas se  
han desvanecido,  
los elementos  
que diferencian e  
identifican un alimento  
ganan especial  
importancia tanto para  
productores como para  
consumidores.”

En una época en que las fronteras políticas y económicas se han desvanecido, los elementos que diferencian e identifican un alimento ganan especial importancia tanto para productores como para consumidores. En cada país, los recursos locales, representados en este trabajo por los alimentos tradicionales, pueden tener un impacto económico considerable, aunque para ello es necesario crear unos esquemas de producción y organización específicos que permiten obtener márgenes de beneficio superiores [1].

La definición de producto tradicional no es fácil ni clara, siendo objeto de varias interpretaciones de acuerdo con los diferentes autores [2]. Según algunos autores, los productos tradicionales son productos únicos que resultan de las materias primas y de los conocimientos aplicados, de los usos, de las prácticas de producción, de distribución, de consumo y de las denominaciones de producto local, tradicional, artesanal o regional [2]. En sentido amplio, también se conocen como productos tradicionales aquellos productos que se identifican por su origen geográfico, por el proceso de producción o por las características intrínsecas que los vinculan a una costumbre, modo de hacer o época y que los diferencian de otros productos [3].

Por otro lado, la creciente tendencia hacia el consumo de alimentos saludables y hacia la preferencia de productos con características y orígenes específicos permite una gran revalorización de los productos tradicionales en nichos de consumo urbano. De esta forma, es fundamental que países del Sudoeste europeo que presentan un patrimonio importante de productos agrícolas y agroalimentarios apuesten por la diferenciación de los mismos, por el aumento de su valor, por la preservación de los hábitos y modos de producción originales con la intención de poder transmitirlos a las generaciones futuras y, al mismo tiempo, de obtener aumentos de productividad considerables [4].

Los productos cárnicos ahumados y curados, principalmente los derivados de cerdo, tienen un gran impacto en la economía del Sudoeste europeo. Por lo tanto, es importante que se desarrollen nuevos conceptos y tecnologías que permitan aumentar el valor comercial de estos productos y, a su vez, dinamizar el sector sin descuidar sus procesos típicos de producción, su origen y sus gentes.

A excepción de algunos países en vías de desarrollo, en los cuales la cadena de refrigeración no está establecida, actualmente, ahumar o curar un alimento tiene como principal objetivo conferir al alimento unas características sensoriales diferenciadas según su modo de producción, la cultura gastronómica o el territorio donde éste se elabora. Proporcionar al producto curado/ahumado un sabor característico, que seduzca al consumidor, es hoy uno de los principales objetivos de la industria alimentaria. El efecto conservante de estas técnicas es, en algunos casos, mínimo, por lo que el uso de aditivos químicos, necesario para garantizar la seguridad biótica, puede asimismo afectar la seguridad abiótica del alimento [1].

### 1.2 CONSERVANTES SINTÉTICOS EN PRODUCTOS AHUMADOS/CURADOS

Los aditivos son sustancias que se añaden intencionadamente a los alimentos con un propósito tecnológico, lo que tiene como resultado que tanto el propio aditivo como sus subproductos se van a convertir en un componente de estos alimentos. Los aditivos no se consumen como alimentos ni se usan como ingredientes característicos en la alimentación, independientemente de que tengan o no valor nutritivo. La utilización de estas sustancias es muy antigua. Los egipcios ya usaban colorantes y aromatizantes, y el uso de nitrato potásico y de especias con el objetivo de conservar y mejorar la apariencia de los alimentos se remonta a la antigua Roma.

La utilización de aditivos está reglamentada a nivel europeo. Para que se pueda utilizar un aditivo en la industria alimentaria éste debe formar parte de las listas del Anexo II del Reglamento n.º 1129/2011 de la Comisión [5], que modifica el anexo II del Reglamento 1333/2008 [6]. Estas listas incluyen los aditivos alimentarios autorizados (lista positiva) así como las especificaciones/condiciones de utilización y las cantidades máximas permitidas en cada producto. La autorización para la entrada en el mercado de un nuevo aditivo se hace una vez éste se ha evaluado positivamente y se ha demostrado que es inocuo para la salud del consumidor. El Reglamento (CE) n.º 1331/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, establece un procedimiento de autorización común para los aditivos, las enzimas y los aromas alimentarios. Por lo tanto, todo aquél que desee poner en el mercado un aditivo que no se encuentre autorizado o quiera ampliar las condiciones de un aditivo autorizado deberá presentar una solicitud de conformidad con este Reglamento así como con la correspondiente guía de la EFSA.

Los aditivos alimentarios son agentes importantes para la industria alimentaria ya que contribuyen a mantener la calidad y las características sensoriales de los alimentos, contribuyendo a su seguridad/inocuidad y a un aumento significativo de su vida útil. Se considera que los aditivos alimentarios usados correctamente no ponen en riesgo la salud de los consumidores, pero un uso abusivo de estas sustancias, sea por la utilización de cantidades excesivas o por la inclusión de aditivos no declarados/reglamentados, puede poner en riesgo la seguridad del consumidor.

En el caso de los productos cárnicos curados y ahumados, la industria recurre a la utilización de nitrificantes, durante el curado, para garantizar la seguridad alimentaria del producto y conferir características sensoriales, de predominancia cultural, típicas en estos productos (su aspecto), y para la conservación por la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos, principalmente de *Clostridium botulinum*, y de la formación de su toxina. El color rojo característico de estos productos se origina por la reducción del nitrito mediante agentes reductores a óxido nítrico. El óxido nítrico reacciona con la mioglobina (Mb) de la carne y proporciona el aspecto típico de estos productos cárnicos curados [7]. El nitrito de sodio (E-250), normalmente utilizado junto con el nitrato de potasio, puede presentar ciertos riesgos para la salud del consumidor cuando no se utiliza siguiendo las condiciones de aplicación del Reglamento que así lo regula. Entre los principales riesgos se pueden citar: a) un efecto adverso relacionado con el transporte de oxígeno en sangre, ya que el nitrito es capaz de unirse a la mioglobina y formar metahemoglobina (sustancia que no puede transportar oxígeno [7]), y b) la formación de nitrosaminas, que son sustancias de naturaleza cancerígena. El riesgo se limita a productos que son sometidos a altas temperaturas durante su procesado, como el tocino curado/ahumado, o que son ricos en aminas nitrosables, como el pescado y otros productos fermentados. Las nitrosaminas pueden formarse debido a las condiciones del estómago y a las reacciones entre el NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y las aminas secundarias resultantes de la degradación de la carne [1].

La cantidad inicial de nitritos y/o nitratos añadida durante el proceso no es igual a la cantidad que se encuentra en el producto final puesto que son sustancias reactivas, lo que conduce a una reducción significativa de sus niveles antes del consumo. Para disminuir el riesgo de formación de nitrosaminas, además de la reducción significativa del uso nitritos y nitratos, se utilizan diversas técnicas como, por ejemplo, la adición conjunta de nitratos con agentes que bloquean los mecanismos de formación de las nitrosaminas. Entre estos agentes están el ácido ascórbico (E-300) y sus derivados, y el conjunto de tocoferoles alfa, gama y delta (E-306/E-309), especialmente eficaces en medios acuosos y grasos, respectivamente. En los EE.UU. es obligatorio añadir conjuntamente nitritos y ácido ascórbico o sus sales durante el proceso tecnológico. Con el mismo objetivo, la Unión Europea impuso la obligatoriedad de comercializar los nitritos en mezcla con cloruro de sodio, con el objetivo de evitar intoxicaciones agudas [7].

El uso del azúcar como conservante es también destacable, aunque las concentraciones de utilización en torno al 0,5 a 1,0 % no lleguen a tener esta acción, sino una influencia en



**La utilización de aditivos alimentarios está regulada por legislación de ámbito europeo.**



el sabor, ya que proporciona una combinación de los sabores dulce y salado que suaviza el producto [8]. Además de esta primera función del azúcar, existe una segunda de igual importancia pero que adquiere un significado especial en la producción de embutidos secos: ser fuente de energía para las bacterias responsables de la reducción de los nitratos y el posterior desarrollo de las bacterias acidolácticas responsables de la disminución del pH, lo que indirectamente afecta al proceso de conservación de los embutidos [8].

La adición de nitratos y nitritos a productos cárnicos curados y/o ahumados es una decisión basada en la relación riesgo/beneficio. Si bien puede existir un cierto riesgo de formación de nitrosaminas y de intoxicación por una excesiva ingestión, los riesgos de no controlar el crecimiento de *Clostridium botulinum* y de la formación de la toxina botulínica son muy importantes para garantizar la seguridad alimentaria del producto. Los organismos reguladores aceptan el uso de nitratos y nitritos considerándolos necesarios para garantizar la seguridad microbiológica de ciertos alimentos, pero imponiendo límites de adición y contenidos máximos de estos compuestos y la utilización conjunta de inhibidores de la formación de nitrosaminas.

En Portugal no se incluyen nitratos ni nitritos en la formulación de productos cárnicos con Denominación de Origen Protegida o Indicación Geográfica Protegida. Nuestra opinión es que debería seguir siendo así, pero para ello es fundamental el estudio de tecnologías alternativas que permitan aumentar la seguridad microbiológica, manteniendo las características sensoriales del producto y su modo de producción tradicional.

### 1.3 BIOCONSERVACIÓN DE ALIMENTOS

En las últimas décadas ha surgido una gran demanda de productos naturales y los productos tradicionales, sin aditivos químicos, han visto incrementado su interés y atracción por parte de los consumidores. Los nuevos procesos de elaboración y la constante demanda de productos mínimamente procesados obligan al desarrollo de nuevas estrategias para prolongar la vida útil de los alimentos.

La bioconservación de alimentos, a través de la adición de sustancias naturales, se presenta como una alternativa interesante para aumentar la vida del producto, garantizar la seguridad microbiológica y reducir el uso de conservantes sin modificar las características sensoriales y nutricionales de los productos perecederos.

La bioconservación es una técnica de conservación alimentaria ampliamente utilizada en los EE.UU., donde cuenta con la aprobación de la FDA (Food and Drug Administration), pero no está reglamentada por la legislación europea [9].

Entre las ventajas de la utilización de este tipo de tecnología se pueden citar [9]:

- Se presentan como una solución segura y con menos limitaciones que los conservantes químicos, ya que se producen de forma natural en la matriz de alimentos curados;
- No se conocen resistencias y el impacto medioambiental es mínimo ya que se eliminan rápidamente por la cadena alimentaria;
- Poseen un espectro de acción muy definido; su actividad se ve potenciada por el pH y presentan un efecto sinérgico con otros agentes metabólicos antimicrobianos;
- Su utilización es compatible con el etiquetado de producto ecológico ya que la conservación se obtiene sin conservantes químicos de síntesis.

Entre las desventajas de esta tecnología se pueden citar [9]:

- La inexistencia de una reglamentación común a nivel europeo que la tutele y la dificultad de obtener autorización para su aplicación industrial;

- La posible alteración de las propiedades sensoriales de los alimentos y los elevados costes de producción y desarrollo.

### 1.3.1 Las bacterias acidolácticas

A lo largo de los siglos ha sido común el uso de microorganismos y de sus productos metabólicos para la conservación de alimentos. Las bacterias acidolácticas han sido empírica y artesanalmente utilizadas en la fermentación de leche, carne y vegetales para obtener productos con mayor tiempo de vida útil.

Las bacterias acidolácticas incluyen un gran número de microorganismos grampositivos no esporulados, anaeróbicos, aerotolerantes y acidotolerantes. Presentan una morfología, un metabolismo y una fisiología muy semejantes entre sí. Tienen un metabolismo energético exclusivamente fermentativo, a través de la producción de ácido láctico a partir de hidratos de carbono. Incluyen cocos de los tipos *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y bacilos de los géneros *Lactobacillus* y *Carnobacterium* [10].

Las bacterias acidolácticas son el grupo de bacterias más abundante en la naturaleza, en gran medida debido a la capacidad que poseen para crecer en una gran variedad de sustratos y en condiciones biológicas muy diversas. El grupo *Lactobacillus* es el más importante y heterogéneo (figura 1). Las bacterias lácticas no necesitan oxígeno para crecer, son tolerantes a la presencia de dióxido de carbono, nitritos, humo y concentraciones de sal relativamente elevadas y toleran valores de pH bajos.

Las bacterias acidolácticas forman parte de la flora microbiana típica de los productos curados/ahumados, ya sea por su presencia natural o por su aportación como *starter*. Estas bacterias compiten con otros microorganismos por nutrientes y hábitats y su poder conservante se consigue en gran medida por el efecto antagonista que presentan al generar sustancias antimicrobianas.

Además del papel tecnológico que se les reconoce, las bacterias acidolácticas son también responsables de conferir a los productos fermentados unas características sensoriales y nutricionales apreciadas por el consumidor (color, sabor, textura, digestibilidad y calidad nutricional) en estos productos [11-14].

Las bacterias acidolácticas son uno de los principales responsables del flavor «pungente» de los embutidos y de las pequeñas cantidades de los ácidos acético y propiónico, etanol, acetona, dióxido de carbono y ácido pirúvico que se producen durante la fermentación. La cantidad y los tipos de compuestos formados dependen del *starter* o cultivo iniciador aplicado, de los hidratos de carbono del sustrato, de las fuentes proteicas de la matriz del alimento y de los aditivos utilizados [15].

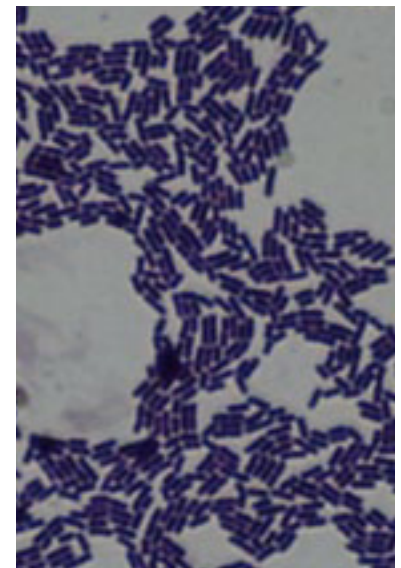
La disminución del pH resulta de la formación del ácido láctico, lo que por sí solo puede ser suficiente para antagonizar muchos microorganismos, incluyendo *Listeria monocytogenes*. Los ácidos acético y propiónico actúan de manera semejante al ácido láctico. Estos ácidos orgánicos desempeñan un papel importante en algunos alimentos fermentados, y se sabe que el ácido acético tiene un efecto antimicrobiano adicional.

Las bacterias lácticas, como se ha indicado anteriormente, son responsables de conferir a los productos fermentados una serie de características químicas, nutricionales y sensoriales únicas. Las bacterias lácticas pueden producir sustancias antagonistas como el diacetilo, el peróxido de hidrógeno, el acetaldehído, compuestos no proteicos de bajo peso molecular como la reuterina, la reutericiлина y el ácido piroglutámico y bacteriocinas que frenan el crecimiento de determinados microorganismos [16-21].

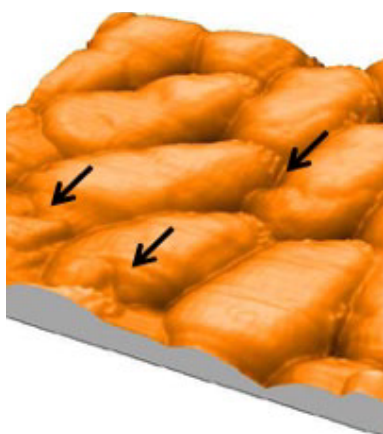
En los últimos años se ha observado un creciente interés por la utilización de bacterias acidolácticas en la conservación de alimentos. Varios estudios demuestran la viabilidad de estos microorganismos en el control del crecimiento de microorganismos patógenos y



**La bioconservación de alimentos, a través de la adición de sustancias naturales, se presenta como una alternativa interesante para aumentar la vida útil del producto, garantizar su seguridad microbiológica y reducir el uso de aditivos sintéticos sin modificar las características sensoriales.**



**Figura 1:** *Lactobacillus plantarum* (microscopía óptica, coloración de gram, ampliación 10 x 100)



**Figura 2:** Visualización por microscopía de fuerza atómica de la deformación celular en *L. ivanovii subsp. ivanovii* ATCC19119 por acción de la bacteriocina ST5Ha [45]

contaminantes. Diversas bacterias lácticas como *Lactobacillus acidophilus* [22], *Lactobacillus gasseri* [23], *Lactobacillus rhamnosus* [24], *Lactobacillus plantarum* [25,26], *Lactobacillus casei* [27] y *Lactobacillus paracasei* [28] han sido citadas por su capacidad de inhibir agentes patógenos. Se han estudiado interacciones *in vitro* contra bacterias enteropatógenas gramnegativas, tales como *Escherichia coli* [23,27,29], *Salmonella entérica* [28,30,31], *Helicobacter pylori* [32] y *Shigella sonnei* [33]. También se han descrito efectos antagónicos de las bacterias lácticas frente a patógenos grampositivos como *Bacillus cereus* [34] y *Listeria monocytogenes* [35].

Estos organismos unicelulares son responsables de la producción de una gran variedad de metabolitos antimicrobianos como el diacetilo (producto de fermentación), o peróxido de hidrógeno, el acetaldehído, los ácidos orgánicos, los compuestos no proteicos de bajo peso molecular (reuterina, reutericina y ácido piroglutámico) y las bacteriocinas, las cuales presentan un gran potencial para la bioconservación de alimentos [18-21].

En la última década se han caracterizado e identificado una gran variedad de bacteriocinas producidas por bacterias acidolácticas, lo que ha supuesto un avance considerable en esta línea de investigación. Varios estudios han evidenciado la capacidad antimicrobiana de diversas bacteriocinas que han sido consideradas como excelentes conservantes cuando se utilizan solas o en combinación [20, 36-44]. En la figura 2 se puede ver la acción bactericida de la bacteriocina ST5Ha de la bacteria acidoláctica *Enterococcus faecium* ST5Ha, que provoca la lisis y destrucción de las células de *L. ivanovii subsp. ivanovii* ATCC19119 [45].

Ruiz-Moyano y otros [46] aislaron 363 cepas de bacterias acidolácticas en lomo ibérico. El 30 % de estas cepas presentaron un potencial tecnológico elevado para ser utilizadas como cultivos probióticos debido a su habilidad para crecer y desarrollarse adecuadamente en pH ácido y en concentraciones elevadas de NaCl. Albano y otros [47] evaluaron el potencial de la bacteriocina PA-1 producida por *Pediococcus acidilactici* como bioconservante en la *alheira* (embutido con carne de ternera, cerdo y aves). Esta bacteria láctica fue capaz de inhibir diversas cepas de *Listeria innocua* durante el proceso de producción y a lo largo de la vida útil del producto, reduciendo el patógeno a niveles de detección inferiores a 1,5 UFC/g sin afectar al correcto desarrollo de la flora microbiana natural ni al pH y sin que el producto sufriera alteraciones sensoriales perceptibles por un panel entrenado de catadores.

Aunque en algunos países la bacteriocina pediocina esté permitida como conservante alimentario, en la Unión Europea y en los EE.UU. la única bacteriocina autorizada para su incorporación en alimentos es la nisina. Descubierta en 1928, la nisina recibió el estatus GRAS ('generalmente reconocido como seguro') en 1988, habiendo sido aprobada por la US Food and Drug Administration (FDA) su aplicación a productos alimentarios [48]. En 1995 se autorizó el uso de la nisina (E-234) en alimentos en la Unión Europea mediante la Directiva 95/2/EC. Actualmente su aplicación está regulada mediante el Reglamento 1129/2011 [5].

Análogamente a la nisina, las demás bacteriocinas estudiadas se degradan rápidamente por las proteasas del tracto gastrointestinal, por lo que se podría extender el estatuto GRAS a otras bacteriocinas ampliamente evaluadas *in vitro*, a través de la promoción de estudios *in vivo* [49].

### 1.3.2 Metodologías y requisitos de aplicación de las bacterias acidolácticas

La bioconservación puede incorporarse a alimentos, concretamente a productos cárnicos curados y/o ahumados, a través de cuatro métodos [50,51]:

1. Adición de un cultivo puro y viable de bacterias lácticas con capacidad comprobada de producción de bacteriocinas. Su éxito depende de la habilidad del cultivo para crecer y producir estos metabolitos en condiciones ambientales y tecnológicas específicas (temperatura, pH,  $a_w$ , aditivos y otros). El cultivo debe ser capaz de competir con la microflora natural, no debe influir en las propiedades físicoquímicas y sensoriales del

alimento, y no debe producir gas ni exopolisacáridos para evitar la hinchazón del envase y la formación de viscosidades.

2. Adición de bacterias lácticas mesófilas, permitiendo así salvaguardar su viabilidad frente a un posible exceso de temperatura durante el proceso de fabricación. La cepa bioprotectora debe ser incorporada a una concentración inicial conocida y en condiciones de refrigeración. Cuando la temperatura del proceso es excesiva, la cepa se desarrollará por competición frente a la bacteria patógena. Puede incluso existir una degradación del producto según la temperatura de almacenado a la que se encuentra, lo que no permitirá el crecimiento del microorganismo patógeno y el consumo del producto por parte del consumidor.
3. Adición de preparaciones de bacteriocinas en extracto crudo, licor fermentado o concentrados obtenidos a partir del crecimiento de las bacterias lácticas. Esta técnica evita el uso de compuestos purificados, los cuales pueden requerir de reglamentación legal y un coste de producción elevado debido a la necesidad de purificación del compuesto.
4. Adición de sustancias antagonistas puras o semipuras como las bacteriocinas. Este método adquiere especial interés porque se conoce de forma precisa la dosis añadida y el resultado puede ser más fiable. Esta técnica de bioconservación está limitada a la legislación aplicable en cada país, concretamente en lo que concierne a la adición de aditivos. Es importante, inicialmente, estandarizar la producción y precipitación de la bacteriocina hasta que sea posible asegurar su reproducibilidad y de esta forma asegurar la cantidad adecuada, cuya adición permitirá un poder de inhibición suficiente.

La aplicación de este tipo de tecnologías obliga indiscutiblemente al control de las variables tecnológicas a que estos cultivos están sujetos. Las dos primeras técnicas de bioconservación se consideran técnicas *in situ* ya que todo el proceso se desarrolla de forma autónoma dentro del alimento. Las dos últimas técnicas están consideradas como técnicas de adición *ex situ* ya que los cultivos protectores se producen en condiciones controladas y sólo después se incorporan al alimento. Para que sea posible ejecutar las técnicas *ex situ* es necesario aislar completamente los microorganismos productores de bacteriocinas, asegurar la existencia de equipamiento y medios de cultivo específicos, garantizar la actividad de cada extracto, determinar la concentración mínima inhibitoria contra patógenos (determinación de curvas de crecimiento e inactivación) y posteriormente estandarizar la técnica para asegurar las cantidades de inóculo y el efecto deseado.



**En los últimos años se ha observado un creciente interés por la utilización de bacterias acidolácticas o bacteriocinas en la conservación de alimentos.**



## 2. CASO PRÁCTICO: SUSTITUCIÓN DE ADITIVOS POR CULTIVOS DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS EN UN PRODUCTO CURADO/ AHUMADO TRADICIONAL

### 2.1 DEFINICIÓN DEL PRODUCTO

Este estudio se basa en los resultados preliminares del proyecto «Biofumados: Tradição vs Qualidade». La utilización de *starters*, en sustitución de las fermentaciones realizadas por la flora autóctona, presenta ventajas, por ejemplo, en términos de aumento de la consistencia del inóculo, de disminución del riesgo de contaminación cruzada, de aumento de la uniformidad en la producción de ácido láctico, de producción de aromas deseables, de la previsión del valor final de pH y de la disminución del riesgo de crecimiento de bacterias patógenas. Otros beneficios incluyen la disminución del tiempo de fermentación, el aumento de la productividad y la reducción de productos con defectos de sabor/flavor y textura, atribuidos al crecimiento de bacterias heterofermentativas.

Así, este proyecto tiene como objetivo la elaboración de embutidos y ahumados tradicionales, más seguros, a través de la utilización de microorganismos autóctonos, aislados de los mismos embutidos y de la aplicación de sus bacteriocinas. La utilización de microorganismos con elevado valor tecnológico y que simultáneamente puedan generar *in situ* condiciones adversas al crecimiento de patógenos es sin duda una línea innovadora en el sector de los embutidos y ahumados tradicionales, objeto de este proyecto.

Se pretende pues seleccionar el método más adecuado de adición de *starters* bioprotectores y de sus bacteriocinas en el procesado de embutidos tradicionales curados y/o ahumados, tanto por incorporación directa al producto como al envase. El método de adición seleccionado será el que demuestre poseer el mayor equilibrio entre la capacidad de conservación y mantenimiento de las características sensoriales propias de estos productos tradicionales. Para este estudio se seleccionó un embutido tradicional del nordeste portugués, la *alheira*.



Figura 3: Alheira

La *alheira* es un embutido tradicional portugués, cocido, curado y ligeramente ahumado. Su origen se remonta a finales del siglo XV y se asocia a la presencia de las comunidades judías en la región de Trás-os-Montes, en el norte de Portugal [52]. Es un producto elaborado con una mezcla de carne de vaca, pollo, cerdo, pan y condimentos. Presenta un color marrón claro y una forma cilíndrica que recuerda una herradura, con una longitud que oscila entre 20 y 25 cm (figura 3). La tripa no debe presentar rupturas y debe estar bien adherida a la pasta. Los extremos se atan con un hilo de algodón [52]. Es un producto alimentario que necesita cocción antes de ser consumido, la cual puede hacerse por fritura en aceite o en horno. El producto presenta una vida útil de 60 días, almacenado a una temperatura entre 0 y 5 °C y envasado en atmósfera modificada (80 % N<sub>2</sub> y 20 % CO<sub>2</sub>). El peso oscila entre 150 y 200 gramos. En cuanto a las características sensoriales, presenta un ligero flavor a humo, con destacadas notas a ajo, aceite y un ligero sabor ácido (típico del producto).

	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
<b>pH</b>	4,5	6,3	5,1	0,5
<b>% NaCl</b>	1,0	1,8	1,3	0,3
<b>% Humedad</b>	43,3	57,2	52,3	4,3
<b>% Grasa</b>	10,9	29,6	18,4	4,7
<b>% Proteína total</b>	6,9	15,5	11,4	2,8
<b>% Carbohidratos</b>	10,2	20,9	15,2	3,6
<b>Energía (kcal/100 g)</b>	220	369	274,4	39,7

*Tabla 1: Mínimo, máximo, media y desviación estándar de algunos parámetros fisicoquímicos y nutricionales de la alheira. Tabla adaptada de Ferreira et al. [53]*

## 2.2 OBJETIVOS

Este proyecto se divide en varias etapas y tiene como objetivo:

1. Desarrollar estudios preliminares y buscar patentes en productos cárnicos curados y ahumados.

Se trata de realizar una investigación de las patentes ya existentes en el mercado internacional relativas a bioconservación de productos cárnicos embutidos y ahumados que se utilizarán posteriormente de base para el desarrollo e innovación previstos en las siguientes tareas.

2. Minimizar los peligros potenciales durante el procesado de productos cárnicos tradicionales portugueses y validación de diagramas de flujo *in situ*.

Se trata de validar el diagrama de flujo de elaboración de productos embutidos y ahumados y la posterior identificación de las variables de proceso y los peligros potenciales. De este modo se podrán identificar las etapas del proceso en las que la utilización de agentes bioprotectores podrá representar una mejora de la calidad y seguridad del producto final.

3. Aislar y seleccionar los *starters* bacteriocinogénicos a aplicar como bioprotectores durante el procesado de productos embutidos y ahumados tradicionales portugueses.

Se trata de aislar las diferentes bacterias acidolácticas de interés y realizar un análisis de su actividad antimicrobiana y bacteriocinogénica en los productos objeto de estudio para evaluar su capacidad contra bacterias patógenas según los peligros identificados en la etapa n.º 2. Se han considerado aspectos como la ausencia de factores intrínsecos de virulencia; los productos de origen; la resistencia a las condiciones del proceso, concretamente al pH, a la temperatura, a la sal y a componentes de la matriz alimentaria.

4. Evaluar los parámetros de calidad de los productos representativos de la tecnología aplicada.

Se trata de caracterizar los embutidos ahumados durante su vida útil, elaborados con y sin la adición de *starters* bioprotectores, de manera que se pueda evaluar el impacto de esta tecnología en la calidad final del producto. Para esta caracterización se ha recurrido a técnicas de análisis fisicoquímico, microbiológico y sensorial de los alimentos.

Posteriormente se estudiará un método innovador de adición de los cultivos bioprotectores que podrá tener lugar durante la fase de preparación y reposo de la pasta, inmediatamente antes del embutido o al final del proceso, ya sea por inmersión o aspersión. En el caso de productos loncheados se evaluará además la adición de cultivos mediante spray, pincelado



**En este estudio se ha evaluado la vida útil de embutidos ahumados elaborados con y sin la adición de *starters* bioprotectores.**



e inmersión antes del cierre del envase. Se realizarán estudios para evaluar el impacto de distintas tecnologías de envasado aisladas y combinadas para desarrollar un envase óptimo para cada tipo de producto y la forma de presentación (por unidad o loncheado), que mantenga la calidad y seguridad del producto, aumentando, cuando sea posible, su vida útil. Las tecnologías a evaluar serán los envases y/o revestimientos bioactivos impregnados con agentes antimicrobianos, el envase en atmósfera modificada y el envase al vacío. Finalmente se aplicarán los *starters* bioprotectores a escala industrial (*scale-up*) para validar la tecnología y ponerla a disposición de la industria.

Los resultados presentados en el subcapítulo siguiente abordan solamente la adición de los *starters* bioprotectores *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus sakei*, aislados de productos curados/ahumados tradicionales (*beloura* y *salpicão*), en el proceso de fabricación de otro embutido tradicional, la *alheira*.

## 2.3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

En el ámbito de la etapa n.º 3 del proyecto, mencionada anteriormente — Aislar y seleccionar los *starters* bacteriocinogénicos a aplicar como bioprotectores en el procesado de productos embutidos y ahumados tradicionales portugueses —, se realizaron diversos ensayos cuyas técnicas y resultados se presentan en el capítulo siguiente.

Se han realizado pruebas de aislamiento de bacterias acidolácticas en productos cárnicos curados y ahumados. Se aislaron 6 cepas, 2 de *Lactobacillus plantarum*, 3 de *Lactobacillus sakei* y 1 de *Enterococcus faecium* con capacidad bacteriocinogénica. Se han publicado los resultados de optimización y producción de bacteriocinas por parte de varias de estas cepas, concretamente sobre optimización de la producción de la bacteriocina ST153ch producida por la cepa *Lactobacillus sakei* y aislada de *salpicão* [36] y *Lactobacillus plantarum* y su bacteriocina ST202ch aislada de *beloura* [54], ambos productos a base de carne curada y ahumada.

Tras los estudios de aislamiento y selección de los cultivos basándose en su poder antimicrobiano se procedió a su aplicación a escala industrial en la empresa Minho Fumeiro— Enchidos e Fumados à Moda de Ponte de Lima Lda. En el proceso de fabricación de *alheira* se incorporó la cepa *Lactobacillus sakei* ST153ch, que fue la que presentó mejores resultados. Tras la incorporación del cultivo a la mezcla de carnes se continuó el proceso habitual de elaboración con sus etapas hasta obtener el producto final envasado al vacío o en atmósfera modificada. El producto fue sometido a las mismas condiciones de curado, ahumado, envasado y temperatura de almacenado que el producto sin la incorporación de *Lactobacillus sakei* ST153ch. Después del envasado, las muestras del producto estándar y aquellas con *Lactobacillus sakei* ST153ch se enviaron al laboratorio para su caracterización microbiológica y sensorial.

El análisis sensorial se realizó mediante un panel entrenado de 9 catadores que habían generado el perfil descriptivo mediante varias sesiones de discusión previas a la ejecución de la caracterización sensorial. El perfil descriptivo contuvo 17 descriptores.

Los datos generados se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando el *software* Statistica (versión 7, Statsoft, Inc.) para estudiar la existencia de diferencias para cada atributo entre las muestras control (muestra comercial) y la *alheira* con la cepa añadida, a tiempo inicial (día cero después de la elaboración). Posteriormente se estudiarán los resultados a 30, 45, 60 y 90 días de conservación para evaluar la persistencia del efecto bactericida y determinar el tiempo de vida útil de estos productos sin que se produzcan alteraciones de sus propiedades sensoriales. Por último, se realizará un estudio de consumidores para evaluar la aceptabilidad de la *alheira*.

## 2.4 RESULTADOS

Los resultados obtenidos muestran una actividad antimicrobiana y bacteriocinogénica evidente de *Lactobacillus plantarum*, productor de la bacteriocina ST202ch, y de *Lactobacillus sakei*, productor de la bacteriocina ST153ch contra *Listeria monocytogenes* B296. Se realizaron estudios que permitieron comparar la eficiencia y el crecimiento de las bacterias acidolácticas directamente en la *alheira* y en competencia con otros microorganismos para simular las condiciones reales del producto y de su flora microbiana. Quedó demostrada la capacidad de crecimiento de las bacterias lácticas objeto de estudio inoculadas con diferentes microorganismos. Posteriormente, se realizó un estudio preliminar en ambiente industrial con la producción de *alheiras* inoculadas con *Lactobacillus sakei*, productor de la bacteriocina ST153ch.

Como se ha indicado, entre las bacterias acidolácticas aisladas se identificaron cepas con actividad antimicrobiana y bacteriocinogénica. Se constató que esta actividad es debida a la competencia directa entre especies o al efecto de la producción de ácido láctico con consiguiente reducción del pH del medio de cultivo.

Tan sólo se utilizaron dos cepas autóctonas bacteriocinogénicas: *Lactobacillus plantarum* ST202ch aislado de *beloura* y *Lactobacillus sakei* ST153 aislado de *salpicão*. La actividad anti-*listeria* de las cepas *Lactobacillus plantarum*, productora de la bacteriocina ST202ch, y *Lactobacillus sakei*, productora de la bacteriocina ST153ch, se evaluó inicialmente en muestras de carne de cerdo esterilizada dado que no se conoce su comportamiento *in situ*.

Se observó una inhibición de *L. monocytogenes* en presencia de ST153ch (halo de inhibición, figura 4) a lo largo de los 10 días de estudio, a una temperatura de incubación de 30 °C. No se observó inhibición del patógeno indicador con la ST202ch durante el tiempo de estudio, sin embargo, se observó un aumento del periodo de latencia (24 horas) (figura 5).

Estos resultados evidencian que la cepa *Lactobacillus sakei*, productora de la bacteriocina ST153ch, fue más efectiva en el control del crecimiento del microorganismo indicador, *Listeria monocytogenes* B296, que la cepa *Lactobacillus plantarum* ST202ch.

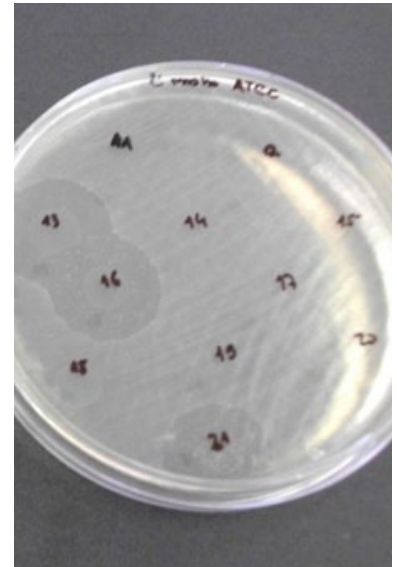


Figura 4: Placa con halo de inhibición por acción de *Lactobacillus sakei* ST153ch frente a *L. monocytogenes*

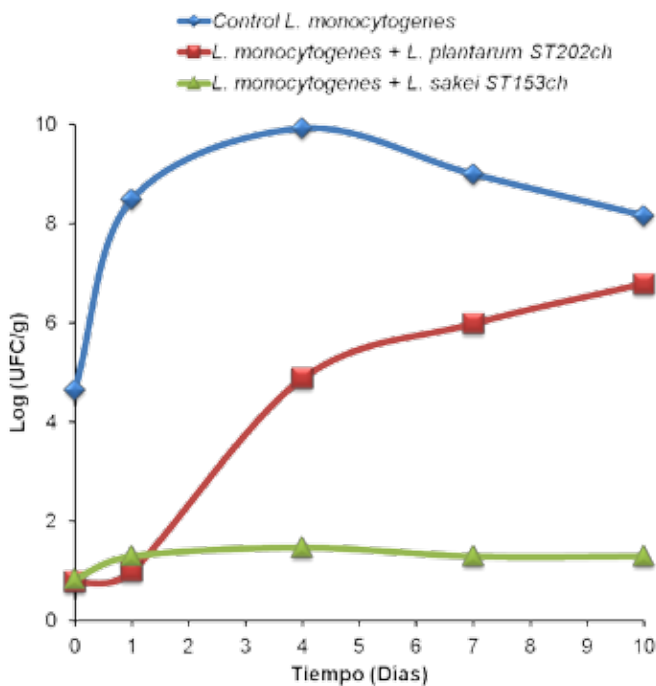


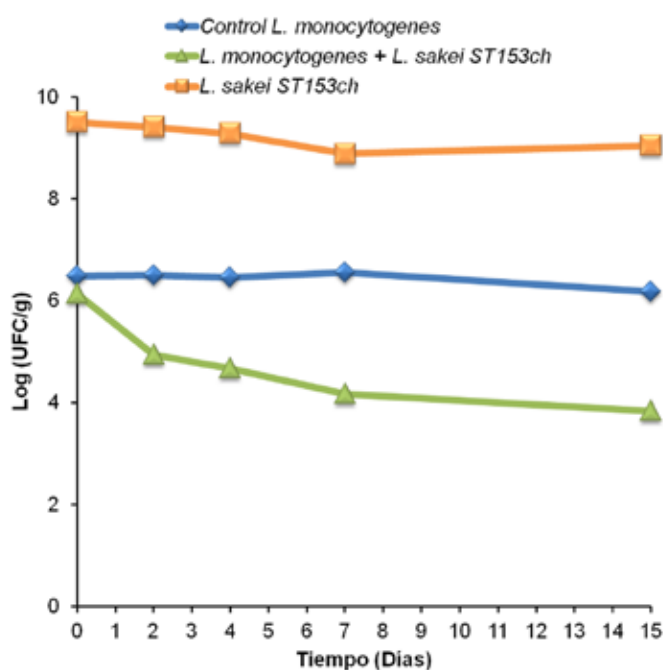
Figura 5: Recuentos de *L. monocytogenes* en la carne estéril en presencia de ST202ch (*L. plantarum* ST202ch) y de ST153ch (*L. sakei* ST153ch) (Control *L. monocytogenes* – crecimiento de *L. monocytogenes* en carne; *L. monocytogenes* + *L. plantarum* ST202ch – crecimiento de *L. monocytogenes* en la carne con mezcla de ST202ch; *L. monocytogenes* + *L. sakei* ST153ch – crecimiento de *L. monocytogenes* en la carne con mezcla de ST153ch)

*Lactobacillus sakei* ST153ch inhibió el crecimiento de *L. monocytogenes*, con una reducción de 2 logarítmicos en relación al control durante los 15 días de conservación a una temperatura de refrigeración de 5 °C (figura 6).

El análisis sensorial, realizado a día cero, reveló que el panel de catadores fue coherente en la respuesta correspondiente a los atributos que presentaron diferencias significativas (el «Olor característico», la «Dureza de la pasta», el «Sabor/flavor característico», el «Sabor ácido» y el «Sabor amargo» ( $p < 5\%$ ). Así pues, el panel detectó diferencias significativas en estos atributos al comparar la *alheira* inoculada y la *alheira* comercial no inoculada.

No se detectaron diferencias significativas en la *alheira* inoculada envasada al vacío y en atmósfera modificada (80 % N<sub>2</sub> y 20 % CO<sub>2</sub>) en ninguno de los atributos evaluados. El análisis posterior de los productos durante el tiempo de conservación permitirá evaluar si el envase afecta significativamente a las características sensoriales.

La adición de una suspensión salina de 500 ml por cada 10 kg de pasta inoculada, que probablemente acidificó la muestra debido a la producción de más ácido láctico, aumentó también la humedad del producto y alteró su textura, y estas dos condiciones son, probablemente, responsables de la dureza, olor y sabor detectados. Más adelante se evaluará también este efecto comparando este producto con un control elaborado mediante la adición de 500 ml de solución salina pero sin inóculo. Se efectuarán también estudios de adición del inóculo, tanto en la pasta como en el envase. Estos análisis sensoriales permitirán conocer el efecto del tipo de envase (en atmósfera modificada-uso comercial y al vacío) influye en las características sensoriales del producto a lo largo de su vida útil y a los 90 días.



**Figura 6:** Recuentos de *L. monocytogenes* en *alheira* en presencia del *L. sakei* ST153ch (Control *L. monocytogenes* – crecimiento de *L. monocytogenes* en *alheira*; *L. monocytogenes* + *L. sakei* ST153ch – crecimiento de *L. monocytogenes* en *alheira* con mezcla de ST153ch; *L. sakei* ST153ch – crecimiento del *L. sakei* ST153ch en *alheira*)

### 3. CONCLUSIONES

Análogamente a los resultados obtenidos en este estudio, diversos autores han demostrado la capacidad de las bacterias acidolácticas para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos en productos cárnicos curados y ahumados [47,54-56].

En el futuro, este tipo de «cultivos funcionales» podrá proteger al consumidor de intoxicaciones alimentarias provocadas por cepas patógenas o por la ingestión de sus toxinas, mediante una acidificación rápida del alimento o por la producción de metabolitos antimicrobianos como las bacteriocinas [49]. No obstante, es importante que, cuando se realicen pruebas para determinar la capacidad antimicrobiana de nuevas cepas, se tengan en cuenta los riesgos asociados, como pueden ser la formación de aminas biógenas y el desarrollo de resistencias por parte de las bacterias a antibióticos [49]. Ciertas cepas pueden incluso actuar como probióticos pudiendo considerarse también que poseen características nutraceuticas [55].

Según Bonomo et al. [57], en este estudio se ha demostrado la alta capacidad antimicrobiana de *Lactobacillus sakei*, en cuanto a estandarizar el proceso, preservar las características sensoriales e incluso mejorarlas, en el sentido de no utilizar conservantes sintéticos, ya que se sustituyen por cultivos vivos autóctonos capaces de garantizar la seguridad biótica y abiótica del producto. Los resultados obtenidos demuestran que la bioconservación a través de la adición de bacterias acidolácticas es una alternativa viable a los conservantes sintéticos que garantiza la seguridad biótica y abiótica del producto manteniendo sus características sensoriales y su modo de producción tradicional, constituyendo un ejemplo de lo que se ha denominado «Innovar la tradición».

Las bacteriocinas son metabolitos secundarios fácilmente degradados por las proteasas, enzimas del tracto gastrointestinal en humanos [42], y por ello, análogamente a la nisina, podrían incluirse como sustancias GRAS con la perspectiva de ofrecer una oportunidad a la bioconservación, ya sea por adición de bacterias acidolácticas o por adición directa de sus bacteriocinas, siempre que existan pruebas y estudios específicos *in vivo* que garanticen sus beneficios [49].



**La bioconservación a través de la adición de bacterias acidolácticas es una alternativa viable a los conservantes sintéticos que garantiza la seguridad biótica y abiótica del producto manteniendo sus características sensoriales.**



### 4. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Programa COMPETE – Programa Operacional Factores de Competitividade del Gobierno de Portugal la financiación del proyecto n.º 13338, «Biofumados: Tradição vs Qualidade», y a la empresa Minhofumeiro – Enchidos e Fumados à Moda de Ponte de Lima Lda, el Instituto Politécnico de Viana do Castelo y la Universidade Católica Portuguesa. Los estudios aquí presentados son el resultado del trabajo de diversos investigadores de las dos últimas instituciones y también de la colaboración del Dr. Svetoslav Todorov, de la Universidad de S. Paulo, Brasil.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Vaz-Velho M. Smoked foods production. En: Caballero B, Trugo L, Finglas PM, editores. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier-Academic Press; 2003. p. 5302-9.
- Ribeiro M, Martins, C. La certificación como estrategia de valorización de productos agroalimentarios tradicionales: la alheira, un embutido tradicional de Trás-os-Montes. Agricultura y Sociedad 1996;80-81:313-34.
- Caldentey P, Gómez, A. Productos típicos, territorio y competitividad. Agricultura y Sociedad 1996;80-81:57-82.
- Soeiro A. Estratégias para a valorização dos produtos tradicionais portugueses: o caso particular das protecções das denominações de origem, das indicações geográficas e dos nomes específicos. 1as Jornadas de Queijos e Enchidos; 3 de abril de 1998; Porto, Portugal. p. 19-22.
- Reglamento (UE) N.º 1129/2011 de la Comisión, de 11 de noviembre de 2011, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) N.º 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. DOUE L295. (12 noviembre 2011).
- Reglamento (CE) N.º 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios. DOUE L354 (31 diciembre 2008) [Internet]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0016:0033:es:PDF>
- Freitas AC, Figueiredo P. Inibidores de Alterações químicas e Biológicas. En: Conservação de Alimentos. Lisboa; 2000. p. 50-2.
- Wirth F. La reducción y el no empleo de las sustancias de curado en los productos cárnicos. Fleischwirtsch 1993;1:3-9.
- Freire R. Informe Bioconservação de Alimentos. Proyecto Bioemprende, financiado por el programa POCTEP (Programa de Cooperação Transfronteiriça Espanha-Portugal 2007-13); 2010.
- Santroch VD. Evaluación de la calidad y composición química de la carne de res proveniente de animales de dos grupos de edad en Puerto Rico [tesis Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos]. Recinto universitario de Mayagüez (Puerto Rico): Univ Puerto Rico; 2006.
- Daeschel MA. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol 1989;43:164-7.
- Klaenhammer TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 1988;70:337-49.
- Schillinger U, Lücke FK. Lactic acid bacteria as protective cultures in meat products. Fleischwirtsch 1990;70:1296-9.
- Smith JL, Palumbo SA. Use of starter cultures in meat. J Food Prot 1983;46:997-1006.
- Aymerich T, Martín B, Garriga M, Hugas, M. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. Appl Environ Microbiol 2003;69:4583-94.
- García T, Martín R, Sanz B, Hernández, PE. Extensión de la vida útil de la carne fresca. En: Envasado en atmósfera modificada y utilización de bacterias acidolácticas y bacteriocinas. Rev Española de Ciencia y Tecnología 1995;35(1):1-18.
- Vignolo G, Fadda S, Kairuz MN, Holgado AR, Oliver G. Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by lactocina 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL705. Int J Food Microbiol 1996;29:397-402.
- Chen H, Hoover DG. Bacteriocins and their food applications. Compr Rev Food Sci Food Saf 2003;22:82-100.
- Leroy F, De Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci Technol 2004;15:67-78.
- Gálvez A, Abriouel H, Lucas López R, Ben Omar N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. Int J Food Microbiol 2007;120:51-70.
- Bello BD, Rantsiou K, Belliob A, Zepppa G, Ambrosolia R, Civerab T et al. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. LWT Food Sci Technol 2010;43:1151-9.
- Sherman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, Ngo PSC, Goulet J, Tomkins TA. Probiotics Reduce Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and Enteropathogenic *E. coli* O127:H6-Induced Changes in Polarized T84 Epithelial Cell Monolayers by Reducing Bacterial Adhesion and Cytoskeletal Rearrangements. Infect Immun 2005;73(8):5183-8.
- Fernández MF, Boris S, Barbés C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. J App Microbiol 2003;94(3):449-55.
- Lee Y-K, Puong K-Y, Ouwehand AC, Salminen SJ. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. J Med Microbiol 2003;52:925-30.
- Hugo AA, Kakisu E, De Antoni GL, Pérez PF. Lactobacilli antagonize biological effects of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in vitro. Lett. J Appl Microbiol 2008;46(6):613-9.
- Ramiah K, Van Reenen CA, Dicks LMT. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. Res Microbiol 2008;159:470-5.
- Ingrassia I, Leplingard A, Darfeuille-Michaud A. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. Appl Environ Microbiol 2005;71(6):2880-7.
- Jankowska A, Laubitz D, Antushevich H, Zabielski R, Grzesiuk E. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. J Biomed Biotechnol 2008;357964.
- Candela M, Perna F, Carnevali P, Vitali B, Ciati R, Gionchetti P et al. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. Int J Food Microbiol

- 2008;125:286-92.
30. Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. Protective action of *Lactobacillus* kefir carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Int J Food Microbiol* 2007;118:264-73.
  31. Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *Int Dairy J* 2006;16:189-99.
  32. Collado MC, González A, González R, Hernández M, Ferrús MA, Sanz Y. Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25:385-91.
  33. Spinler JK, Taweechoitapat M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* 2008;14:166-71.
  34. Yang Y, Tao W-Y, Liu Y-J, Zhu F. Inhibition of *Bacillus cereus* by lactic acid bacteria starter cultures in rice fermentation. *Food Control* 2008;19:159-61.
  35. Ghalfi H, Thonart P, Benkerroum N. Inhibitory activity of *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 against *Listeria monocytogenes* and ST2-verotoxin producing *Escherichia coli* O157. *Afr J Biotechnol* 2006;22:2303-6.
  36. Todorov SD, Ho P, Vaz-Velho M. Optimisation of bacteriocin ST153Ch production by *Lactobacillus sakei* ST153Ch, strain isolated from salpicão, a traditional pork product from the north-west of Portugal. *J Biotechnol* [Internet] 2008;1(136):S735. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1752>
  37. Todorov SD, Vaz-Velho M. Isolation and characterization of plantaricin ST8SH a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH, strain isolated from Bulgarian salami. *J Biotechnol Supplement* [Internet];1(136):S735. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.07.1751>
  38. Todorov SD, Ho P, Franco BDGM, Vaz-Velho M. Effect of medium composition on the production of bacteriocin ST216Ch a strain of *Lactobacillus plantarum* isolated from Portuguese Chouriço. *Higiene Alimentar* 2009;23(170-171):352-3.
  39. Todorov SD, Dicks LMT. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram negative bacteria. *Enz Microbiol Tech* 2005;36:318-26.
  40. Gyol SH, Min CY, Kyoung KH, Chul RY, Hoon LS, Chul KB. Tenderization and fragmentation of myofibrillar proteins in bovine longissimus dorsi muscle using proteolytic extract from *Sarcodon aspratus*. *LWT Food Sci Technol* 2008;41:1389-95.
  41. Oliete B, Moreno T, Carballo JA, Monserrat L, Sánchez L. Estudio de la calidad de la carne de ternera de raza Rubia Gallega a lo largo de la maduración al vacío. *Arch Zootecnia* 2006;55(209):3-14.
  42. Holzapfel WH, Geisen R, Schillinger U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int J Food Microbiol* 1995;24(3):343-62.
  43. Rybka-Rodgers S. Improvement of food safety design of cook-chill foods. *Food Res Int* 2001;34(5):449-55.
  44. Vignolo G, Fadda S. Starter cultures: Bioprotective cultures. En: Toldrá F, Hui Y, Astiasarán I, Nip W, Sebranek J, Silveira E et al, editores. *Handbook of fermented meat and poultry*. Oxford: Blackwell Publishing; 2007. p. 147-57.
  45. Todorov SD, Franco BDGM, Tome E, Vaz-Velho M. Mode of action of bacteriocin ST5Ha on *Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* ATCC19119. CIBIA VII. Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos. Integrando la Ingeniería de Alimentos con el Bienestar; 6-9 de septiembre 2009, Bogotá, Colombia. Comunicación oral. Book of Abstracts, Programa, Sección Biopreservación.
  46. Ruiz-Moyano S, Martín A, Benito MJ, Nevado FP, Córdoba M de G. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Sci* 2008;80:715-21.
  47. Albano H, Pinho C, Leite D, Barbosa J, Silva J, Carneiro L et al. Evaluation of a bacteriocin-producing strain of *Pediococcus acidilactici* as a biopreservative for Alheira a fermented meat sausage. *Food Control* 2009;20:764-70.
  48. Sindt, RH, attorney. GRAS notice-exemption claim for specified uses of nisin [Internet]. Diciembre 2000 [citado 27 julio 2012]. Disponible en: [http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras\\_notices/grno065.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/gras_notices/grno065.pdf)
  49. Todorov SD, Franco BDGM, Vaz-Velho M. Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria From and for Production of Salami-like Products. *International Review of Food Science and Technology* 2009:57-61.
  50. Vásquez SM, Héctor SM, Sandra ZB. Use of Antimicrobial Substances Produced by Acid Lactic Bacterias on Meat Conservation. *Rev Chil Nutr* 2009;36(1):64-71.
  51. Moreira Do S, Wagner L. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producidas por *pediococcus* sp 347 de origen cárnico [tesis doctoral]. Madrid, España: Departamento de Nutrición y Bromatología III, Univ Complutense de Madrid, Facultad de veterinaria; 1993.
  52. Cámara Municipal de Mirandela [Internet]. Mirandela (Portugal): Cámara Municipal de Mirandela; 2012 [citado 22 de junio de 2012]. Disponible en: [www.cm-mirandela.pt](http://www.cm-mirandela.pt)
  53. Ferreira V, Barbosa J, Vendeiro S, Mota A, Silva F, Monteiro MJ et al. Chemical and microbiological characterization of alheira: A typical Portuguese fermented sausage with particular reference to factors relating to food safety. *Meat Sci* 2006;73:570-5.
  54. Todorov SD, Ho P, Vaz-Velho M, Dicks LMT. Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. *Meat Sci* 2010;84:334-43.
  55. Ammor MS, Mayo B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An up-date. *Meat Sci* 2007;76:138-46.
  56. Urso R, Rantsiou K, Cantoni C, Comi G, Cocolin L. Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermentation sausages production. *Int J Food Microbiol* 2006;110:232-9.
  57. Bonomo MG, Ricciardi A, Zotta T, Parente E, Salzano G. Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Sci* 2008;80:1328-48.