



**ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS ALTAS  
PRESIONES HIDROSTÁTICAS EN LA  
REDUCCIÓN DE LISTERIA  
MONOCYTOGENES EN QUESO DE  
MEZCLA PASTEURIZADO**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

Curso: 2016/17

**Alumna: Alda Cristiane de Oliveira Alves**

**Tutora: Marta Hernández Pérez**



## **INDICE**

### **RESUMEN**

### **ABSTRACT**

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>5</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>5</b>
<b>3.1 Cepas</b>	<b>6</b>
<b>3.2 Queso</b>	<b>6</b>
<b>3.3 Preparo del Inóculo</b>	<b>6</b>
<b>3.4 Recuento del Inóculo</b>	<b>7</b>
<b>3.5 Plan de ensayos</b>	<b>7</b>
<b>3.6 Preparación de Muestras: Contaminación Artificial / Inoculación y Envase</b>	<b>8</b>
<b>3.7 Tratamiento de Altas Presiones Hidrostáticas (HHP)</b>	<b>9</b>
<b>3.8 Análisis Microbiológico / Recuento de <i>L. monocytogenes</i></b>	<b>10</b>
<b>3.9 Análisis Estadístico</b>	<b>11</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>12</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>22</b>
<b>6. AGRADECIMIENTOS</b>	<b>23</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>24</b>

## RESUMEN

Ese trabajo de fin de master presenta la investigación que evaluó el efecto de las altas presiones hidrostáticas para inactivación de diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* en queso de mezcla pasteurizado. Se estudiaron 12 cepas que fueron separadamente inoculadas en queso de mezcla pasteurizado y en seguida sometidos a tratamiento por altas presiones hidrostáticas en las condiciones de 600 MPa de presión durante los tiempos de 1, 3, 5 y 10 minutos. Las inactivaciones variaron entre 1,25 y 6,49 log UFC/g. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, fueron seleccionadas como cepas más resistentes los aislados de la colección del Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología LBMM 1175, LBMM 1178, LBMM 1289 y LBMM 1291 y se puede recomendar el tratamiento a 600 MPa en 5 minutos para la efectiva inactivación de *Listeria monocytogenes* en el queso de mezcla pasteurizado.

## ABSTRACT

This master 's work presents the research that evaluated the effect of high pressure processing (HPP) for inactivation of different strains of *Listeria monocytogenes* in pasteurized cheese. We studied 12 strains that were separately inoculated in pasteurized cheese and then subjected to high hydrostatic pressure treatment under the conditions of 600 MPa of pressure during the times of 1, 3, 5 and 10 minutes. The inactivations will vary between 1.25 and 6.49 log CFU / g. Taking into account the results obtained, the most resistant strains LBMM 1175, LBMM 1178, LBMM 1289 and LBMM 1291 were selected and the treatment at 600 MPa in 5 minutes could be recommended for the effective inactivation of *Listeria monocytogenes* in the pasteurized cheese.

## 1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el Real Decreto 1113/2006, el queso de mezcla pasteurizado es el producto obtenido de la mezcla de leche pasteurizado de dos o más especies, ese producto debe satisfacer a los criterios microbiológicos del Reglamento 2073/2005 modificado por el Reglamento 1441/2007, este establece que el producto que no puede favorecer el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, deberá presentarse dentro del límite máximo de 100 UFC/g durante su vida útil, mientras en Los Estados Unidos no se admite su presencia en los productos listos para consumo.

*Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, que no forma esporas y produce la enfermedad denominada listeriosis, una de las principales enfermedades transmitidas por los alimentos, con una de las tasas más altas de mortalidad (30%) (EFSA, 2015). Frecuentemente presente en el medio ambiente, en el suelo, la vegetación y las heces de los animales, tiene mayor capacidad de crecer o sobrevivir en un ambiente refrigerado en comparación con la mayoría de los otros microorganismos, lo que hace de *L. monocytogenes* un reto importante en la producción de alimentos, especialmente el caso de los alimentos listos para el consumo (CDC, 2015).

El serotipado es potencialmente útil para definir subtipos y grupos clonales de *L. monocytogenes*. Los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b son responsables del 96 - 98% de los casos de listeriosis humana, siendo el 4b el principal responsable de brotes de listeriosis, mientras que el 4a y 4c son raramente asociados a brotes de la enfermedad (WIEDMANN et al., 1996; LIANOU et al., 2013). Los factores de virulencia de *Listeria* son los genes Inl A, inlC e inl J, que se relacionan con la producción de internalina (proteína responsable de la adhesión celular), es decir, las cepas con estos genes serán más virulentas que aquellas que no los poseen (DONGYOU et al., 2007).

Algunos investigadores propusieron la agrupación de cepas de *L. monocytogenes* en tres linajes distintos, basándose en características obtenidas por el ribotipado y el polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción de los genes de virulencia hly, inlA y actA, combinados con el origen de los aislados (humano o animal) y sus serotipos, resulta que el linaje I agrupó las cepas implicadas en brotes de listeriosis (1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e) las que deberían ser consideradas de importancia para la salud pública

(WIEDMANN et al., 1997), pero en países con sistemas de vigilancia actuantes todas las cepas de *L. monocytogenes* se consideran igualmente patógenas, ya que faltan marcadores fenotípicos y/o genotípicos para la determinación de la virulencia (JACQUET, et al., 2004).

El tratamiento por Altas Presiones Hidrostáticas (del inglés High Pressure Processing – HPP) ha sido demostrado como un método eficaz para la inactivación de patógenos, tales como *L. monocytogenes* y organismos deteriorados bajo condiciones de temperatura ambiente, en una variedad de productos alimenticios tales como carnes y mariscos, además de alimentos listos para el consumo como guacamole, salsa, fruta, jugos, y quesos (SANDRA et al., 2004; RASTOGI et al., 2007; HEREU et al., 2012), especialmente el queso, que posee alto contenido de grasa y sal, constituye una de las matrices de interés para la inactivación por HPP (GEORGET et al., 2015). La aplicación de presión a una muestra a través de un fluido presurizado a través de HPP se demostró por primera vez en 1914 en frutas por Bert Hite quien había diseñado en 1899 la primera unidad de alta presión y en 1990 surge el primer producto comercializado con el uso de altas presiones en Japón

TAY et al. (2003) investigaron la resistencia de nueve cepas de *L. monocytogenes* y una cepa de *L. innocua* a la presión y demostraron una variabilidad significativa entre las cepas, con la disminución en el log UFC/ml durante el tratamiento de presión de 1,4 a 4,3 a 400MPa y de 3,9 a más de 8,0 a 500 MPa. CHEN et al. (2009) examinaron la tolerancia a la presión de 100 MPa en 30 cepas de *L. monocytogenes*, y obtuvieron reducciones que van de 1,9 a 7,1 log UFC/ml.

Por eso la selección de la cepa es una decisión de vital importancia al diseñar y realizar estudios con el reto de evaluar el comportamiento de patógenos bacterianos en productos alimenticios o en sistemas simulando ambientes relacionados con alimentos (LIANOU & KOUTSOUMANIS, 2013). Otro parámetro que debe tenerse en cuenta al caracterizar y seleccionar las cepas es el origen de su aislamiento y su fuente, más específicamente, la investigación sobre un tipo específico de producto alimenticio que puede incluir aislamientos del producto específico y de su entorno de procesamiento (SCOTT et al., 2005).

La mayoría de los casos de listeriosis reportados por el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC) en 2014 fueron en personas mayores de 64 años, especialmente varones, pero se considera los grupos de riesgo además de las personas de edad avanzada, las personas inmunodeprimidas, así como las mujeres embarazadas y los lactantes. Se ha constatado que la tasa de casos de listeriosis ha ido en aumento en la UE en los últimos años lo que es preocupante y requiere más atención a la prevención y control de la enfermedad.

Los quesos son los productos lácteos con los que tradicionalmente se ha asociado la aparición de brotes de listeriosis, uno de los que ocurrió en la Unión Europea, en 2011 (11 casos de listeriosis, con 4 muertes), el alimento identificado como causante fue queso de elaboración casera, aunque sin información sobre el tratamiento térmico o sobre cualquier proceso de curación del queso (EFSA/ECDC, 2013).

Como se ha dicho anteriormente, una de las tecnologías alternativas actuales para obtener alimentos seguros son las altas presiones hidrostáticas - HPP, que es capaz de inactivar enzimas y destruir los microorganismos patógenos sin causar una pérdida sensorial y/o nutricional significativa en los alimentos (BUCKOW, et al., 2009; DARYAEI & BALASUBRAMANIAN, 2012; TAO et al., 2014), aunque la estructura de moléculas de alto peso molecular tales como proteínas y carbohidratos pueda ser alterada, las moléculas más pequeñas tales como compuestos volátiles, pigmentos, vitaminas y otros compuestos relacionados aspectos nutricionales y de promoción de la salud son menos afectados (MUJICA-PAZ et al., 2011) y por eso recibe una gran atención en las industrias de alimentos, recientemente, aunque la primera investigación utilizando ese proceso para la preservación de la leche data a finales del siglo XIX en los Estados Unidos (HITE, 1899).

Actualmente, el tratamiento por HPP funciona por sistemas discontinuos, por lotes, los alimentos deben estar en envase flexible o semi-flexible, lo cual se coloca en una cámara y se sumerge en agua o algún otro fluido de presurización, para sufrir presión durante un tiempo de 1 a 20 minutos, a temperatura controlada, al final la cámara se despresuriza y se retira el producto (HOGAN et al., 2005; BALASUBRAMANIAM et al., 2015).

Existen dos principios científicos relevantes para revelar como actúa las altas presiones en los alimentos, uno es el principio de Le Chatelier, que se aplica a todos los procesos físicos y afirma que cuando el equilibrio de un sistema es perturbado, el sistema responde de una manera que tiende a minimizar la perturbación, o sea, la alta presión estimula reacciones que resultan en una disminución en el volumen, por ejemplo, transición de fase, cambio en la configuración molecular, reacción química que se acompaña de una disminución del volumen se potenciará mediante la presión.

Otro es el principio isostática (Ley de Pascal) que establece que la presión se transmite instantánea y uniformemente a través de una muestra bajo presión, si la muestra está en contacto directo con el medio de presión o herméticamente sellada en un recipiente flexible que transmite presión (TRUJILLO et al., 2000; NORTON & SUN, 2008), es decir, la presión producida en la cámara de tratamiento es rápida y uniformemente transferida al producto alimenticio y no se ve afectada por el tamaño del producto o su forma externa, de manera que todas las partes del producto reciben la misma presión (RASTOGI et al., 2007; MUJICA-PAZ et al., 2011).

Sobre los efectos en los microorganismos, en la literatura hay registros de que 50 MPa de presión pueden inhibir la síntesis de proteínas y reducir el número de ribosomas, 100 MPa puede inducir una desnaturalización parcial de la proteína, y 200 MPa causa daño a la membrana celular y a la estructura celular interna, mientras que a partir de 300 MPa ocurre desnaturalización irreversible de enzimas y proteínas, lo que provoca la ruptura de la membrana celular y la excreción de sustancias internas, o sea la muerte bacteriana (ABE, 2007).

Los efectos que tiene la alta presión sobre las proteínas están relacionados con la ruptura de los enlaces no covalentes en las moléculas de proteínas, en general, la alta presión no tiene efecto sobre las estructuras primarias, hay pocos efectos sobre las estructuras secundarias y efectos significativos sobre las estructuras terciarias y cuaternarias de la proteína. El grado de desnaturalización se basa en el tipo de proteína, la magnitud de la presión y el tiempo de interacción, entre 100 y 300 MPa la reacción es reversible, ya cuando la presión es superior a 300 MPa, la reacción es irreversible (YALDAGARD et al., 2008).



En los Estados Unidos está establecido (por directiva del FSIS - Food Safety and Inspection Service) que el establecimiento que utiliza el HPP como tratamiento posletal para reducir o eliminar la *L. monocytogenes* en su producto debe tener en cuenta determinados criterios científicos al validar la eficacia de su proceso de HPP en cuanto a la eliminación y la reducción del peligro biológico específico para la inocuidad de los alimentos hasta un nivel aceptable. En el caso de establecimiento que realiza el reprocesamiento de un producto listo para consumo contaminado por *L. monocytogenes* debe lograr una reducción mínima de 5 log (USD, 2012). Es decir, ese límite establecido para un producto alterado puede ser tomado como referencia de máxima exigencia de seguridad en se tratando un alimento dicho normal (no adulterado).

## **2 OBJETIVOS**

El objetivo principal es investigar la variabilidad de inactivación de diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* en queso de mezcla pasteurizado semicurado frente al tratamiento por altas presiones hidrostáticas.

Los objetivos generales desarrollados para cumplir el objetivo principal son: aislar y cultivar 12 cepas distintas de *L. monocytogenes*; contaminar el queso; tratar el queso contaminado con altas presiones a diferentes tiempos; evaluar la inactivación de las cepas; identificar la cepa más resistente a los tratamientos empleados; establecer las condiciones ideales de tiempo y presión para la inactivación de la(s) cepa(s) más resistentes al tratamiento por altas presiones hidrostáticas.

## **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

La investigación fue conducida durante 6 ensayos, dirigidos para establecer la eficacia del tratamiento de HHP sobre la contaminación artificial del queso.

### 3.1 Cepas

Se utilizaron 12 cepas de *Listeria monocytogenes* (Tabla 1) proporcionadas por el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), que forman parte de la colección de aislados del Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología, que fueron aisladas de quesos de una industria quesera que por motivos de confidencialidad no se menciona. Los cultivos stock se conservaron a -80 °C en una solución de glicerol.

Tabla 1. Características de las cepas de *L. monocytogenes* empleadas en este estudio.

<b>Cepa</b>	<b>Serogrupo</b>	<b>Origen</b>
LBMM 1109	1/2c	Empresa
LBMM 1163	1/2a	Empresa
LBMM 1172	4b	Empresa
LBMM 1175	1/2a	Empresa
LBMM 1178	4b	Empresa
LBMM 1181	4b	Empresa
LBMM 1187	4b	Empresa
LBMM 1289		Empresa
LBMM 1290		Empresa
LBMM 1291		Empresa
LBMM 1294		Empresa
LBMM 1371	1/2b	Empresa

### 3.2 Queso

En el estudio se utilizó queso de mezcla pasteurizado procedente de un solo productor.

### 3.3 Preparo del Inóculo

A partir de los cultivos stock, se prepararon los inóculos de cada una de las cepas, se aisló cada cepa empleando un asa de siembra de 10 µl en placas de Chromogenic *Listeria* Agar - ALOA (OXOID) y se incubó durante 48 a 72 horas a 37°C. Seguidamente

se transfirieron las colonias aisladas con asas estériles de las placas de ALOA a tubos con 5 ml de Brain Heart Infusion - BHI (BD BIOSCIENCES) y se cultivó durante 16 a 18 horas a 37°C, después fueron conservados a 4°C hasta su utilización.

### 3.4 Recuento del Inóculo

Se realizó un recuento inicial de la concentración del cultivo 24 horas antes del ensayo, a partir de la siembra de 0,1 ml de las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  del inóculo en superficie en Brain Heart Infusión Agar - BHIA, incubado a 37°C. La concentración del inóculo era ajustada a  $2,5 \times 10^8$  UFC/ml (para contaminar 25 g de queso con 0,1 ml de inóculo).

### 3.5 Plan de ensayos

Los ensayos fueron planeados de forma a ejecutar el estudio de 2 cepas a la vez, preparándose las muestras para ser sometidas a los cuatro tratamientos definidos (Tabla 2), con tres replicas (más una reserva) y más dos controles, por ejemplo: Ensayo 1 (Tabla 4) con las cepas LBMM1109 y LBMM1163, cada cepa debe tener los tratamientos T1, T2, T3 y T4, cada uno con sus réplicas más reserva; más los controles C1 y C2, cada uno con sus 3 réplicas y reserva (las muestras reserva eran para el caso de ocurrir algún problema con alguna de las 3 réplicas y tener una muestra para sustituir).

Tabla 2. Los parámetros de tratamiento de los ensayos.

Tratamientos	Presión (Mpa)	Tiempo (minutos)
T1	600	1
T2	600	3
T3	600	5
T4	600	10

C1: Porciones de queso inoculadas no sometidas a tratamiento. Control para determinar el recuento real, teniendo en cuenta la matriz (Control Matriz/Inóculo), analizada el día del tratamiento por HPP.

**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos**  
 E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)  
 Universidad de Valladolid

C2: Porciones de queso inoculadas no sometidas a tratamiento. Control para determinar el recuento real, que se analiza en el momento de hacer los recuentos después del tratamiento HPP.

Tabla 3. Plan de ensayos.

Ensayos	Cepas	Tratamientos				
1	1109	T1.1	T2.1	T3.1	T4.1	
		T1.2	T2.2	T3.2	T4.2	
		T1.3	T2.3	T3.3	T4.3	
		T1 Reserva	T2 Reserva	T3 Reserva	T4 Reserva	
		Controles	C1.1	C1.2	C1.3	-
		1109	C2.1	C2.2	C2.3	-
		1163	T1.1	T2.1	T3.1	T4.1
	1163	T1.2	T2.2	T3.2	T4.2	
		T1.3	T2.3	T3.3	T4.3	
		T1 Reserva	T2 Reserva	T3 Reserva	T4 Reserva	
		Controles	C1.1	C1.2	C1.3	-
		1163	C2.1	C2.2	C2.3	-

### 3.6 Preparo de Muestras: Contaminación Artificial / Inoculación y Envase

El queso fue lonchado y colocado en bolsas de envasado en porciones de 25 g (tomando al menos 2 lonchas) para hacer sándwich. Para realizar la contaminación artificial, fue inoculado 0,1 ml del inóculo preparado entre dos lonchas de queso intentando situarlo en cinco puntos diferentes, dejando reposar las muestras (manteniendo las muestras tumbadas) unos 5 minutos hasta el envase a vacío.

Las muestras fueron envasadas en bolsas de polipropileno, con triple protección (para asegurarse de no contaminar el equipo por rotura del envase), en el envase primario contenía las lonchas contaminadas, en el segundo envase contenía las bolsas con las tres réplicas y el tercero envase contenía las bolsas deberían sufrir el mismo tratamiento. Al final teníamos 4 bolsas (una referente a cada tratamiento).

### **3.7 Tratamiento con Altas Presiones Hidrostáticas (HHP)**

El tratamiento a altas presiones fue realizado inmediatamente después de la inoculación, empleando el equipo Hiperbaric 135 (Hiperbaric S.A., Burgos) fijando una temperatura de procesado de 10°C, utilizando la presión de 600 MPa a diferentes tiempos (1, 3, 5 y 10 minutos).

Cada bolsa referente a cada tratamiento era colocada individualmente en el equipo (Figura 1) y era realizado el ciclo de tiempo y presión determinado para cada tratamiento. El tiempo de tratamiento de mantenimiento de la presión en este estudio no incluyó el tiempo de aumento de presión o el tiempo de descompresión, bien como se consideró insignificante la contribución del cambio de temperatura a la destrucción de microorganismos por HHP.

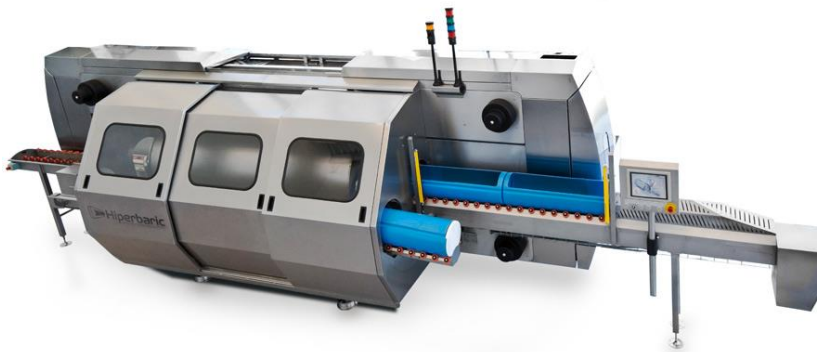


Figura 1. Equipo utilizado en los experimentos (Hiperbaric 135) (ITACyL).

En el equipo se produce un aumento de la presión hasta que llega a la presión determinada para el tratamiento, en la cual se mantiene el tiempo fijado y finalmente despresuriza muy rápidamente, cómo ilustrado en la Figura 2. Después de tratadas, las muestras fueron conservadas a una temperatura de 4°C hasta la realización la detección de células supervivientes de *L. monocytogenes* en un plazo máximo de 24 horas después del tratamiento.

Durante el procesamiento de HPP se produce una variación de temperatura durante el período de compresión (calentamiento de hasta  $\pm 3$  ° C por cada 100 MPa) y descompresión (enfriamiento) del equipo en el fluido y del producto que se está

procesando, fenómeno conocido como calentamiento o enfriamiento adiabático (KNORR, 1993), pero esa pequeña variación de temperatura no suele ser considerada como siendo una variable de influencia del proceso, así que fue desconsiderada en esa investigación.

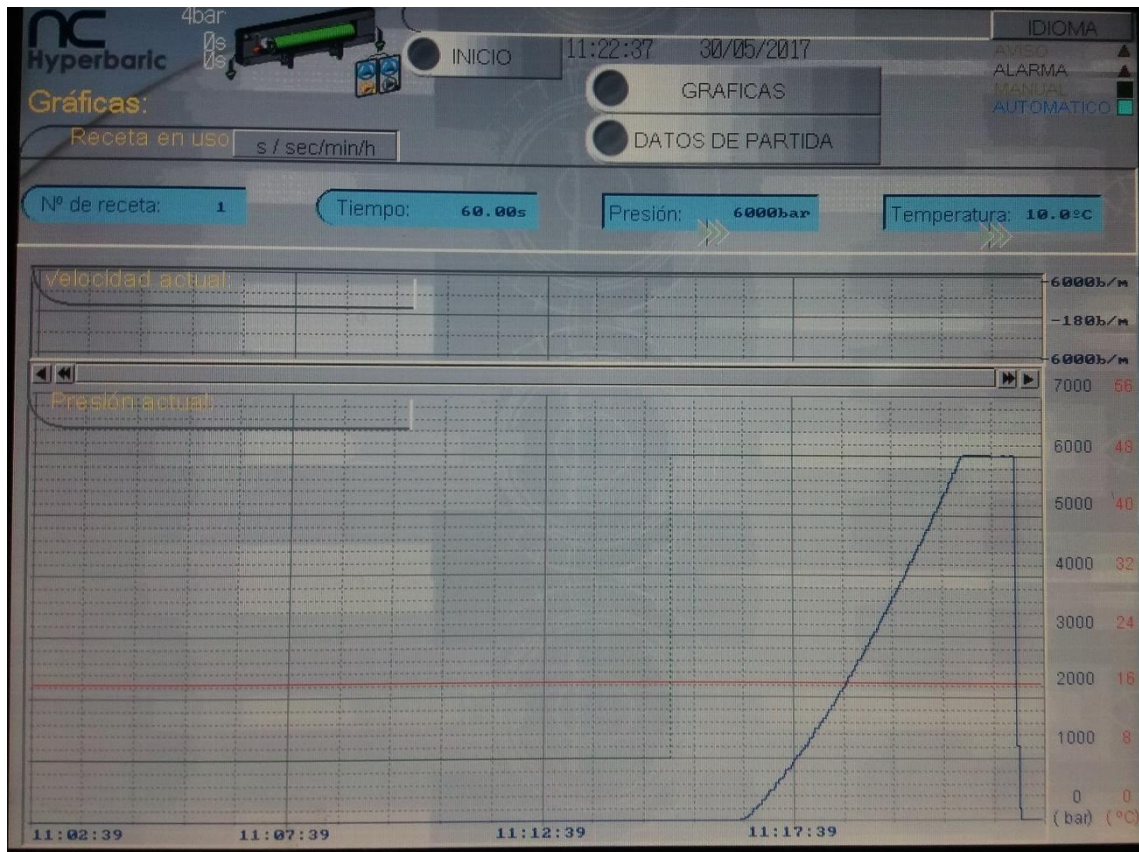


Figura 2. Gráfica de Tratamiento T1, 6000 Bares (1 atmósfera= 1.013 bares = 0.1 Mega Pascales) por 60 segundos (pantalla del equipo).

### 3.8 Análisis Microbiológico / Recuento de *L. Monocytogenes*

Cada muestra envasada al vacío fue abierta después de la esterilización de la superficie del embalaje con etanol, y conteniendo ya aproximadamente 25 g, fue diluida en aproximadamente 250 ml (dilución  $10^{-1}$ ) en Agua de Peptona (MERK) siguiendo todo el procedimiento del método de análisis según la norma UNE-EN ISO 11290-1:1997/A1:2005 Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria*

*monocytogenes*. Parte 1: Método de detección. Modificación 1: Modificación del medio de aislamiento y de la prueba de la hemólisis e inclusión de los datos de precisión (ISO, 2004).

Para el análisis microbiológico por recuento en placas, fueron sembradas diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  (1 mL en 2 placas) para cada muestra, es decir, 1 cepa x 4 tratamientos x 3 réplicas x 3 diluciones x 2 placas de cada dilución = 72 placas de las muestras tratadas, además de los 2 controles x 3 réplicas x 3 diluciones x 2 placas para cada dilución = 36 placas de control, sumando un total de 108 placas de recuento para cada cepa estudiada. Todas las placas se incubaron a 37 ° C durante 48 h y para la enumeración de *L. monocytogenes* las colonias típicas se contaron manualmente.

Para expresar los recuentos como logaritmos de unidades formadoras de colonia (log UFC/g) se empleó la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

N: número de microorganismos por gramo ou mililitro.

$\sum c$ : Suma de las colonias de microorganismos de todas las placas seleccionadas para el recuento.

V: Volumen de inóculo aplicado a cada placa.

$n_1$ : número de placas seleccionadas en la primera dilución retenida para el recuento.

$n_2$ : número de placas seleccionadas en la segunda dilución retenida para el recuento

d: tasa de dilución correspondiente a la primera dilución seleccionada.

### 3.9 Análisis Estadístico

Los experimentos fueron conducidos con 3 repeticiones y fueron calculados las medias y desvíos patrón en el software Excel 2016. Algunos resultados estuvieron por debajo del límite de detección, es decir, recuento <10 UFC/g, es decir, menor que 1 log, imposibilitando los cálculos de Medias (M) y desvíos patrón (SD) en el primero momento.

Para realizar análisis estadístico fue considerado un valor de log UFC/g de 0,5 para esos recuento que resultaron en <10 UFC/g y los datos fueron estadísticamente evaluados

en el software Statgrafics Centurion XVII, utilizando un análisis de varianza de los factores (cepa y tratamiento) para los resultados de recuentos logarítmicos de Listeria.

En la etapa de verificación del efecto de diferentes tiempos, la misma presión, sobre los microorganismos, fueron consideradas como factores o variables independientes las distintas cepas y los distintos tiempos de tratamientos de HPP mientras la variable dependiente son los valores registrados de log UFC de Listeria.

Se realizó varias pruebas y gráficas para determinar que los factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre los recuentos de listeria, también se evaluó la significancia de las interacciones entre los factores.

#### **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se realizó el estudio para determinar la combinación óptima de tiempo y presión para inactivar una concentración inicial entre 6-7 log UFC/g de *L. monocytogenes* en queso de mezcla pasteurizado. La presión de trabajo fue de 600 MPa y los tiempos de 1, 3, 5 y 10 minutos. Los resultados demostraron la efectiva reducción (entre 5 a 6 log UFC/g de *L. monocytogenes*) en por lo menos uno de los 4 tratamientos, resultado similar obtenido previamente para diferentes tipos de alimentos, tales como guacamole, salsa, jugos de frutas, carnes, mariscos y queso (SANDRA et al., 2004, RASTOGI et al., 2007). En ese estudio las cepas más resistentes tuvieron una reducción de por lo menos 4.3 log UFC/g de *L. monocytogenes*.

Como mencionado anteriormente, en los análisis de detección y recuento algunas placas presentaron como resultado un conteo menor que 10 UFC/g, así que no fue posible hacer el cálculo de medias y desvío patrón pues presentó resultado abajo del límite de detección de 10 UFC/g y están representados con un asterisco (\*) en la Tabla 4.

En la Tabla 4 se presentan los resultados de los ensayos con los recuentos en UFC/g y log UFC/g, así como las medias y desvíos patrón entre las réplicas. La identificación de las muestras está hecha por cepas y por tratamientos, los quesos sin tratamiento (T0),



**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos**  
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)  
Universidad de Valladolid

las muestras tratadas a 600 MPa de presión en los tiempos de 1 (T1), 3 (T2), 5 (T3) y 10 (T4) minutos.

Tabla 4. Resultados de los ensayos.

<b>CEPA LBMM 1109</b>								
Tratamiento	1		2		3		M	SD
	CFU/g	log UFC/g	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC/g	log UFC/g	log UFC/g
Control T0	8,2E+05	5,91	9,0E+05	5,95	1,8E+05	5,26	<b>5,71</b>	0,39
Control T1-T4	5,9E+05	5,77	7,5E+05	5,88	5,4E+05	5,73	<b>5,79</b>	0,07
T1	1,6E+03	3,20	2,3E+02	2,36	4,7E+02	2,67	<b>2,75</b>	0,43
T2	< 10	< 1	< 10	< 1	1,3E+02	2,11	*	*
T3	6,0E+02	2,78	1,8E+02	2,26	< 10	< 1	*	*
T4	3,4E+02	2,53	2,0E+02	2,30	1,0E+01	1,00	<b>1,94</b>	0,83

<b>CEPA LBMM 1163</b>								
Tratamiento	1		2		3		M	SD
	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC/g	log UFC/g	log UFC/g
Control T0	4,1E+06	6,61	5,0E+06	6,70	3,8E+06	6,58	<b>6,63</b>	0,06
Control T1-T4	4,5E+03	3,65	3,8E+06	6,58	2,5E+06	6,40	<b>5,54</b>	1,64
T1	8,3E+04	4,92	3,4E+04	4,53	2,7E+03	3,43	<b>4,29</b>	0,77
T2	1,4E+03	3,15	3,9E+03	3,59	2,2E+04	4,34	<b>3,69</b>	0,60
T3	3,5E+02	2,54	< 10	< 1	< 10	< 1	*	*
T4	3,0E+01	1,48	< 10	< 1	< 10	< 1	*	*

<b>CEPA LBMM 1172</b>								
Tratamiento	1		2		3		M	SD
	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC/g	log UFC/g	log UFC/g
Control T0	1,0E+07	7,00	5,3E+06	6,72	*	*	<b>6,86</b>	0,19
Control T1-T2	4,7E+06	6,67	5,3E+06	6,72	4,2E+06	6,62	<b>6,67</b>	0,05
T1	4,5E+02	2,65	3,0E+02	2,48	4,5E+02	2,65	<b>2,59</b>	0,10
T2	1,2E+03	3,08	1,0E+01	< 1	5,0E+01	1,70	<b>2,39</b>	0,98
T3	5,0E+01	1,70	1,0E+01	1,00	4,5E+01	1,65	<b>1,45</b>	0,39
T4	2,0E+01	1,30	< 10	< 1	< 10	< 1	*	*

<b>CEPA LBMM 1175</b>								
Tratamiento	1		2		3		M	SD
	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC/g	log UFC/g	log UFC/g
Control T0	6,7E+06	6,83	5,9E+06	6,77	1,0E+07	7,00	<b>6,87</b>	0,12
Control T1-T4	3,3E+06	6,52	4,7E+06	6,67	6,1E+06	6,79	<b>6,66</b>	0,13

**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos**  
 E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)  
 Universidad de Valladolid

T1	2,9E+03	3,46	1,7E+03	3,23	1,5E+04	4,18	<b>3,62</b>	0,49
T2	1,3E+03	3,11	6,4E+02	2,81	8,8E+03	3,94	<b>3,29</b>	0,59
T3	3,7E+02	2,57	5,7E+02	2,76	1,5E+02	2,18	<b>2,50</b>	0,30
T4	1,0E+01	1,00	9,0E+02	2,95	1,2E+03	3,08	<b>2,34</b>	1,17

**CEPA LBMM 1178**

Tratamiento	1		2		3		M	SD
	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC/g	log UFC/g	log UFC/g
Control T0	7,9E+06	6,90	1,0E+07	7,00	9,7E+06	6,99	<b>6,96</b>	0,06
Control T1-T4	8,9E+06	6,95	8,9E+06	6,95	7,5E+06	6,88	<b>6,92</b>	0,04
T1	1,9E+04	4,28	8,5E+03	3,93	3,8E+03	3,58	<b>3,93</b>	0,35
T2	3,5E+02	2,54	5,4E+02	2,73	3,3E+02	2,52	<b>2,60</b>	0,12
T3	1,9E+02	2,28	2,0E+01	1,30	3,3E+03	3,52	<b>2,37</b>	1,11
T4	3,0E+03	3,48	6,0E+01	1,78	6,6E+02	2,82	<b>2,69</b>	0,86

**CEPA LBMM 1181**

Tratamiento	1		2		3		M	SD
	CFU/g	log UFC /g	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC/g	log UFC/g	log UFC/g
Control T0	2,6E+06	6,41	5,6E+06	6,75	4,2E+06	6,62	<b>6,60</b>	0,17
Control T1-T4	4,8E+06	6,68	4,0E+06	6,60	3,7E+06	6,57	<b>6,62</b>	0,06
T1	8,3E+02	2,92	7,0E+02	2,85	5,1E+03	3,71	<b>3,16</b>	0,48
T2	1,0E+01	1,00	8,0E+01	1,90	4,0E+01	1,60	<b>1,50</b>	0,46
T3	5,0E+01	1,70	< 10	< 1	8,1E+02	2,91	*	*
T4	1,0E+01	1,00	< 10	< 1	< 10	< 1	*	*

**CEPA LBMM 1187**

Tratamiento	1		2		3		M	SD
	CFU/g	log UFC /g	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC/g	log UFC/g	log UFC/g
Control T0	6,2E+06	6,79	6,7E+08	8,83	7,4E+06	6,87	<b>7,50</b>	1,15
Control T1-T4	5,7E+06	6,76	5,4E+06	6,73	6,4E+06	6,81	<b>6,76</b>	0,04
T1	9,1E+03	3,96	1,5E+04	4,18	1,8E+04	4,26	<b>4,13</b>	0,15
T2	8,0E+01	1,90	< 10	< 1	< 10	< 1	*	*
T3	2,0E+01	1,30	1,0E+01	1,00	2,5E+02	2,40	<b>1,57</b>	0,74
T4	4,5E+01	1,65	2,0E+01	1,30	< 10	< 1	*	*

**CEPA LBMM 1289**

Tratamiento	1		2		3		M	SD
	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC/g	log UFC/g	log UFC/g
Control T0	6,2E+06	6,79	6,7E+06	6,83	4,5E+06	6,65	<b>6,76</b>	0,09
Control T1-T4	6,2E+06	6,79	6,7E+06	6,83	4,5E+06	6,65	<b>6,76</b>	0,09
T1	1,5E+02	2,18	3,5E+02	2,54	2,7E+02	2,43	<b>2,38</b>	0,19

**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos**  
**E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)**  
**Universidad de Valladolid**

T2	3,5E+02	2,54	2,0E+01	1,30	2,7E+01	1,43	<b>1,76</b>	0,68
T3	6,8E+02	2,83	1,9E+02	2,28	2,7E+02	2,43	<b>2,51</b>	0,29
T4	1,6E+02	2,20	2,0E+02	2,30	2,5E+02	2,40	<b>2,30</b>	0,10

**CEPA LBMM 1290**

Tratamiento	1		2		3		M	SD
	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC/g	log UFC/g	log UFC/g
Control T0	7,5E+06	6,88	6,7E+06	6,83	8,4E+06	6,92	<b>6,88</b>	0,05
Control T1-T4	7,5E+06	6,88	6,7E+06	6,83	8,4E+06	6,92	<b>6,88</b>	0,05
T1	1,5E+04	4,18	2,7E+03	3,43	5,6E+04	4,75	<b>4,12</b>	0,66
T2	9,8E+02	2,99	2,9E+02	2,46	3,6E+03	3,56	<b>3,00</b>	0,55
T3	2,4E+02	2,38	< 10	< 1	< 10	< 1	*	*
T4	1,0E+01	1,00	< 10	< 1	3,2E+02	2,51	<b>1,75</b>	1,06

**CEPA LBMM 1291**

Tratamiento	1		2		3		M	SD
	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC /g	UFC/g	log UFC/g	log UFC/g	log UFC/g
Control T0	8,2E+06	6,91	6,8E+06	6,83	4,8E+06	6,68	<b>6,81</b>	0,12
Control T1-T4	8,2E+06	6,91	6,8E+06	6,83	4,8E+06	6,68	<b>6,81</b>	0,12
T1	2,8E+04	4,45	4,5E+04	4,65	2,8E+04	4,45	<b>4,52</b>	0,12
T2	1,3E+03	3,11	1,1E+03	3,04	1,9E+03	3,28	<b>3,14</b>	0,12
T3	2,6E+02	2,41	1,3E+03	3,11	5,4E+02	2,73	<b>2,75</b>	0,35
T4	< 10	< 1	< 10	< 1	< 10	< 1	*	*

**CEPA LBMM 1294**

Tratamiento	1		2		3		M	SD
	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC/g	log UFC/g	log UFC/g
Control T0	5,9E+06	6,77	1,1E+07	7,04	1,0E+07	7,00	<b>6,94</b>	0,15
Control T1-T4	5,9E+06	6,77	1,1E+07	7,04	1,0E+07	7,00	<b>6,94</b>	0,15
T1	< 10	< 1	1,0E+01	1,00	1,0E+01	1,00	*	*
T2	1,5E+02	2,18	1,1E+03	3,04	2,0E+01	1,30	<b>2,17</b>	0,87
T3	1,0E+01	1,00	< 10	< 1	< 10	< 1	*	*
T4	1,0E+01	1,00	5,5E+01	1,74	< 10	< 1	*	*

**CEPA LBMM 1371**

Tratamiento	1		2		3		M	SD
	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC /g	UFC /g	log UFC/g	log UFC/g	log UFC/g
Control T0	8,7E+06	6,94	1,1E+07	7,04	9,5E+06	6,98	<b>6,99</b>	0,05
Control T1-T4	8,7E+06	6,94	1,1E+07	7,04	9,5E+06	6,98	<b>6,99</b>	0,05
T1	< 10	< 1	< 10	< 1	< 10	< 1	*	*
T2	2,0E+01	1,30	1,1E+02	2,04	3,6E+02	2,56	<b>1,97</b>	0,63

**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos**  
 E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)  
 Universidad de Valladolid

T3	< 10	< 1	< 10	< 1	< 10	< 1	*	*
T4	2,5E+02	2,40	< 10	< 1	< 10	< 1	*	*

(\*) resultados por debajo del límite de detección.

Los resultados presentados en la Tabla 3 demuestran que los ensayos fueron bien conducidos de manera que los resultados de las réplicas tuvieran buena reproductibilidad y desvíos patrón pequeños, con excepción de las muestras del tratamiento T4 de la cepa LBMM 1175, T3 de la cepa LBMM 1178 y T4 de la cepa LBMM 1290 que presentaron desvío patrón mayor que 1 log UFC/g.

Se puede observar que, con excepción de las cepas LBMM 1175 y LBMM 1189, todas las otras cepas fueron sensibles al tratamiento de altas presiones al lograr un recuento menor que 2 log UFC/g en por lo menos alguno de los tratamientos. Es decir, las cepas LBMM 1175 e LBMM 1178 son las cepas que presentaron mayor resistencia a los tratamientos al presentaren Log UFC/g > 2.

Para efecto de cálculos y gráficas, se consideró un número estimativo de Log UFC/g igual a 0,5 para aquellos que estaban presentados por (\*) en la Tabla 3, así se pudo calcular los promedios de los recuentos *L. monocytogenes* de las muestras de quesos sin tratamiento (T0), y tratadas a 600 MPa de presión en los tiempos de 1 (T1), 3 (T2), 5 (T3) y 10 (T4) minutos, inoculadas con las 12 cepas estudiadas, que están presentados en la Tabla 5.

Tabla 5. Recuentos en log UFC/g de *L. monocytogenes*.

Cepa	Recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> (Log UFC/g)				
	T0	T1	T2	T3	T4
LBMM 1109	5,79	2,75	1,04	1,84	1,94
LBMM 1163	5,54	4,29	3,69	1,18	0,83
LBMM 1172	6,67	2,59	1,76	1,45	0,77
LBMM 1175	6,66	3,62	3,29	2,50	2,34
LBMM 1178	6,92	3,93	2,60	2,37	2,69

LBMM 1181	6,62	3,16	1,50	1,70	0,67
LBMM 1187	6,76	4,13	0,97	1,57	1,15
LBMM 1289	6,76	2,38	1,76	2,51	2,30
LBMM 1290	6,88	4,12	3,00	1,13	1,34
LBMM 1291	6,81	4,52	3,14	2,75	0,50
LBMM 1294	6,94	0,83	2,17	0,67	1,08
LBMM 1371	6,99	0,50	1,97	0,50	1,13

Con esos valores se pudo graficar el efecto de la presión sobre la reducción logarítmica de *Listeria monocytogenes* representadas presentado en una misma gráfica en la Figura 3 y separadamente en la Figura 4.

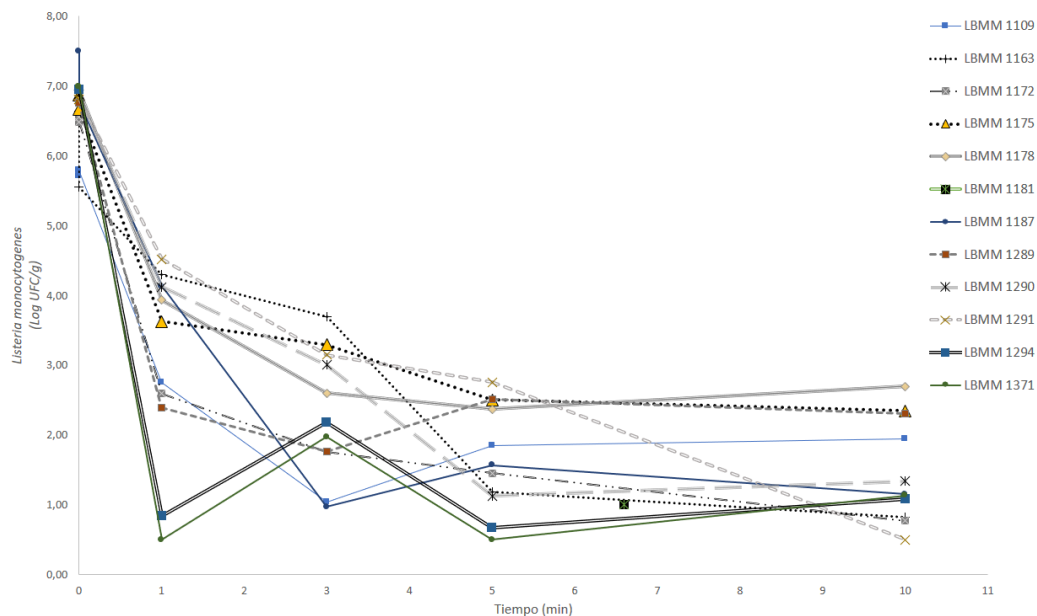


Figura 3. Efecto de la presión de 600 MPa sobre la reducción logarítmica de *Listeria monocytogenes* en los tiempos de 1, 3, 5 y 10 minutos en temperatura constante de 10°C.

El gráfico de la Figura 3 muestra que generalmente el conteo decrece con el aumento del tiempo de tratamiento, con excepción de las cepas LBMM 1109, LBMM 1187, LBMM 1294 y LBMM 1371. Otra vez se debe tener en cuenta que las respuestas de cada cepa en cada condición de tratamiento varían y que ni siempre el tratamiento con mayor

tiempo tuvo la mayor reducción como respuesta. Las cepas LBMM 1187 y LBMM 1189 presentaran un comportamiento parecido, al tener mayor reducción en el tratamiento T2. Las cepas LBMM 1187 y LBMM 1189 presentaran un comportamiento parecido, al tener mayor reducción en el tratamiento T2.

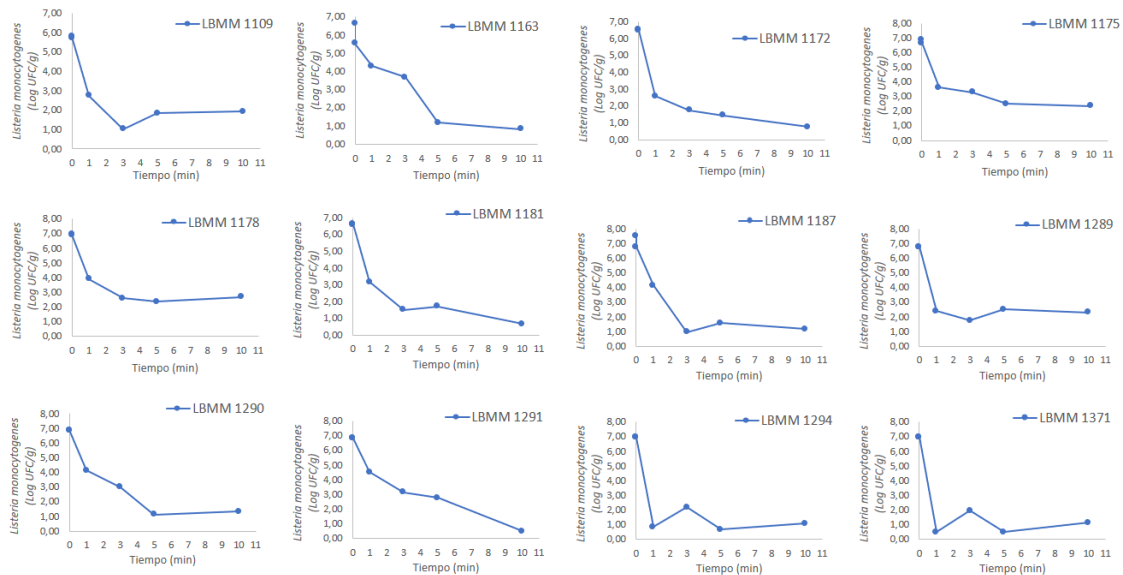


Figura 4. Efecto de la presión de 600 MPa sobre la reducción logarítmica de *Listeria monocytogenes* en los tiempos de 1, 3, 5 y 10 minutos en temperatura constante de 10°C.

En la Figuras 3 y 4 se puede notar la diversidad de comportamiento de las cepas a los tratamientos y se confirma la importancia del aislado sobre el efecto que ejercen las altas presiones. Hay aislados más resistentes que otros, por eso es importante determinar qué tipo de aislado tiene el alimento para aplicar el tratamiento adecuado y no pueden extrapolarse los resultados, si bien se pueden efectuar unas recomendaciones. Es importante caracterizar el aislado para definir los parámetros de tratamiento. Tampoco se puede atribuir la resistencia a un determinado serotipo porque dichas cepas pertenecen a serotipos distintos 1/2a y 4b. Además hay cepas extremadamente sensibles que con un tiempo de inactivación de 1 minuto ya se consigue la reducción deseada.

**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos**  
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)  
Universidad de Valladolid

Fueron realizadas las Pruebas de Múltiple Rangos (Tabla 6) para valores de Log UFC/g por Tratamientos, para discriminar si hay diferencia mínima significativa por el test de Fisher (LSD) entre las medias con nivel de 95% de confianza.

Tabla 6. Prueba de Múltiple Rangos para los tratamientos.

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
T0 - T1	*	3,69528	0,293923
T0 - T2	*	4,52417	0,293923
T0 - T3	*	5,08333	0,293923
T0 - T4	*	5,36944	0,293923
T1 - T2	*	0,828889	0,293923
T1 - T3	*	1,38806	0,293923
T1 - T4	*	1,67417	0,293923
T2 - T3	*	0,559167	0,293923
T2 - T4	*	0,845278	0,293923
T3 - T4		0,286111	0,293923

\* indica una diferencia significativa.

Los resultados demostraron que hay diferencias significativas entre todos los tratamientos con excepción de los Tratamientos T3 y T4, lo que se confirma en la gráfica de la Figura 5.

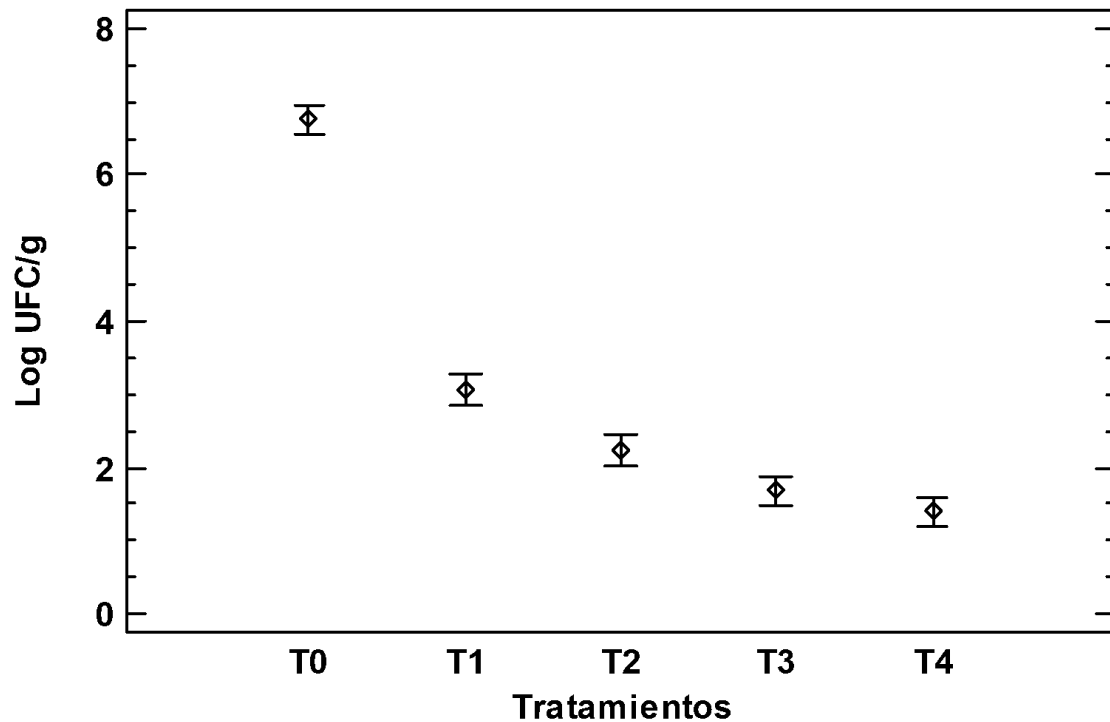


Figura 5. Promedios de los resultados tratamientos.

Ya era esperado una diferencia significativa entre los tratamientos y resulta curioso no haber diferencia significativa entre los tratamientos T3 y T4, con los tiempos de 5 y 10 minutos respectivamente, eso podría hacer pensar que con presión de 600 MPa a una temperatura de 10°C, el aumento del tiempo de tratamiento además de los 5 minutos ya no resultaría en aumento de la efectividad del tratamiento, podría se considerar investigar cambios de la temperatura de trabajo, así como TOMASULA et al. (2014) que empleó la presión de 600 MPa en temperaturas de 20°C y 40°C y logró la reducciones logarítmicas de 4,6 y 3,5 (respectivamente) de *L. monocytogenes* en queso fresco, llegando al nivel mínimo de detección en tan sólo 5 minutos de tratamiento.

Es necesario resaltar, que considerando trabajar con el tratamiento T3, además de las cepas LBMM 1175 y LBMM 1178, deberán ser consideradas también las cepas LBMM 1289 y LBMM 1291 dentro de las más resistentes pues presentarán contaje superior a 2 log UFC/g para ese tratamiento.



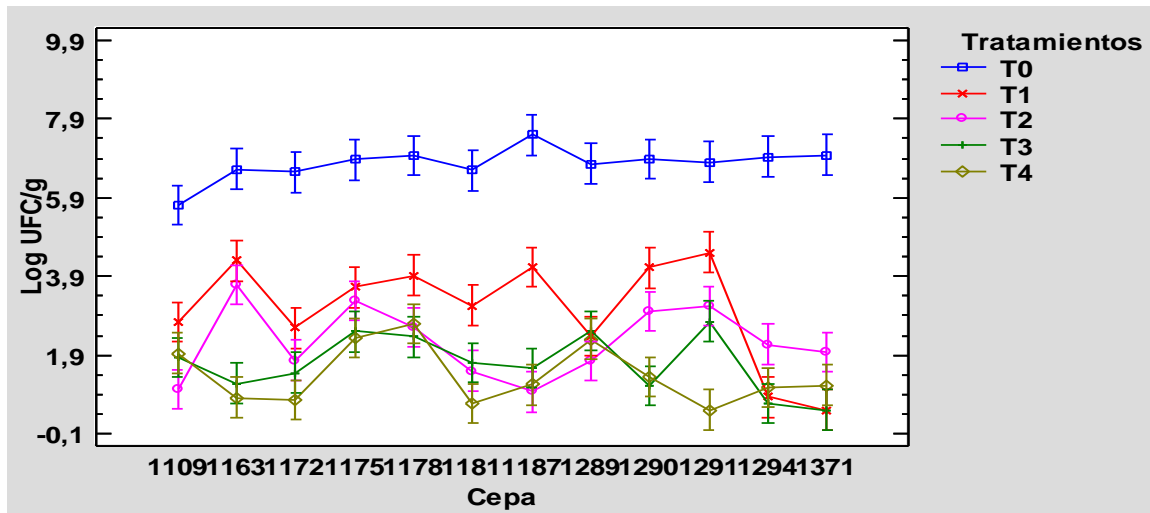


Figura 6. Interacciones entre los factores (cepa y tratamiento) para la reducción de *Listeria*.

En la Figura 6 se puede observar el comportamiento de cada cepa con relación a cada tratamiento, considerando los promedios y errores. Una vez más se percibe que en casi toda la extensión de las curvas de los tratamientos T3 y T4 se sobrepone, demostrando que no hay diferencias significativas entre los dos tratamientos, excepto para la cepa LBMM 1291.

Teniendo en cuenta que los criterios microbiológicos de la Unión Europea en relación con *L. monocytogenes*, admite una tolerancia máxima de 100 UFC/g siempre y cuando el alimento no soporte el crecimiento de *Listeria* durante su vida útil y que generalmente los productos listos para consumir tienen baja concentración de *L. monocytogenes* (CASADEI et al., 2004; EFSA, 2013), se puede afirmar que el tratamiento HHP puede contribuir en gran medida a reducir o eliminar el riesgo para los consumidores.

Considerando los aspectos discutidos anteriormente, se puede aconsejar la utilización de las cepas LBMM 1175, LBMM 1178, LBMM 1289 y LBMM 1291 como referencias para la validación de la eficacia del tratamiento por altas presiones, utilizándose la presión de 600 MPa con un tiempo de 5 minutos. La validación será aprobada si comprobada la reducción de la cepa de referencia hasta los valores recomendados por ley (Log UFC/g < 2).

## **5 CONCLUSIONES**

Existe una gran variabilidad entre las cepas estudiadas con respecto a su comportamiento frente a los tratamientos ejecutados, es decir, la eficacia del procesamiento HPP, además de sus parámetros, depende de la cepa y del alimento.

No obstante, los resultados de este estudio indican que las HHP pueden ser aplicadas a los quesos tipo mezcla pasteurizados con el fin de reducir la contaminación por *L. monocytogenes* como se demuestra en gran parte para muchos otros productos alimenticios.

Se puede concluir que los tratamientos T3 y T4 fueron los más eficaces, pero, sin diferencia significativa entre ellos, se puede elegir el tratamiento T3 (600 MPa, 5 min), por tener menor tiempo y así influir menos en las características sensoriales del producto.

Las cepas más resistentes al tratamiento a 600 MPa durante 5 minutos fueron LBMM 1175, LBMM 1178, LBMM 1289 y LBMM 1291. Entre todas las cepas estudiadas fue el tratamiento que logró la reducción de contaminación alcanzando un recuento final menor que 2 log UFC/g, con excepción de las cepas consideradas más resistentes.

En conclusión, considerando que las industrias deben contar con Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos y no deben tener al final del proceso una contaminación en la orden de 6 a 7 log (similar a los casos estudiados), se puede aconsejar el HPP para el control de la *Listeria monocytogenes*.

De todos modos, merece destacarse que los resultados de este estudio deben ser confirmados en diferentes productos y en función del aislado.

## **6 AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, he de dar las gracias a Dios por el don de la vida.

Agradezco a mi familia por la presencia y el apoyo incondicional hoy y siempre.

Agradezco también al Gobierno estatal de Pará, que, por intermedio de la Secretaría de Estado de Ciencia y Tecnología, me concedió el derecho de ausentarme del trabajo para dedicarme a los estudios.

Debo agradecer también a todos y cada uno de mis profesores de este máster que, sin duda alguna, me han hecho crecer intelectualmente. Especialmente Marta Hernandez que, además de profesora, fue mi tutora en ese trabajo fin de master juntamente con Narciso Martín Quijada que debo agradecimiento por asumir la responsabilidad de ser mi tutor en la Empresa.

Y por fin, agradezco al Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACYL), especialmente el equipo del Laboratorio de Biología Molecular y Microbiología que me permitieron hacer parte de la rutina del laboratorio y compartieron sus conocimientos y su trabajo, colaborando inmensamente para la realización de ese trabajo fin de master.

## **7 BIBLIOGRAFÍA**

Abe, F. (2007). Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology, and survival: perspectives from piezophysiology. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71, 2347e2357.

Balasubramaniam, V. M., Martínez-Monteagudo, S. I., & Gupta, R. (2015). Principles and application of high pressure-based technologies in the food industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6, 435e462

Buckow, R., Weiss, U., Knorr, D. (2009). Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure–temperature domains. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 441–448.

Casadei, L., Merialdi, G., Bonilauri, P., Palomba, A., Bergomi, S., Rosi, M., Dottori, D. (2004). Contaminazione da *Listeria monocytogenes* in alimenti di origine animale e prevalenza dei diversi sierotipi. *L'igiene moderna* 122:71-85.

Centers for Disease Control and Prevention - CDC (2015). Multistate outbreak of listeriosis linked to soft cheeses distributed by Karoun Dairies. Disponible em: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheeses-09-15/index.html>

Chen, H.Q., Neetoo, H., Ye, M., Joerger, R.D. (2009). Differences in pressure tolerance of *Listeria monocytogenes* strains are not correlated with other stress tolerances and are not based on differences in CtsR. *Food Microbiology*. 26, 404–408.

Daryaei, H & Balasubramaniam, V.M. (2012). Microbial decontamination of food by high pressure processing. *Microbial Decontamination in the Food Industry: Novel Methods and Applications*. 370-406.

European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2016 – Listeriosis. Disponible en : <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/listeriosis/Pages/Annualepidemiologicalreport-2016.aspx>

**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos**  
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)  
Universidad de Valladolid

European Food Safety Authority/European Centre for Disease Prevention and Control - EFSA/ECDC (2013). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. The EFSA Journal, 11, 3129.

European Food Safety Authority – EFSA (2013). Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010–2011. Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. EFSA Journal 11, 3241.

European Food Safety Authority - EFSA. (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA Journal, 13, 4329.

Gallot-lavallée, T. (1998). Effectiveness of high pressure treatment for destruction of *Listeria monocytogenes* in raw milk goat cheese. *Sciences des Aliments*, 6, 647-655.

Georget, E., Sevenich, R., Reineke K., Mathys, A., Heinz, V., Callanan, M., Rauh, C., Knorr, D. (2015). Inactivation of microorganisms by high isostatic pressure processing in complex matrices: A review, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 1-14.

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

Hite, B. (1899) The effect of pressure in the preservation of milk (Vol. 58) (pp. 15e35). Bull West Virginia University, Agricultural Experiment Station.

Hogan, Eamonn, Kelly, Allan L., Sun, Da-Wen. (2005) High-pressure processing of foods: An overview. In: *Emerging technologies for food processing*, edited by Da-Wen Sun, 3-32. London: Elsevier Academic Press.

International Organization for Standardization - ISO. (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method; Amendment 1: Modification of the isolation

media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. ISO Norm 11290-1:1996/AM1:2004. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Jacquet, C. et al. (2004). A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *Journal of Infectious Diseases*, 11, 2094-2100.

Knorr, D. (1993). Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technology*, 6, 158-161.

Lianou, A. & Koutsoumanis, K. P. (2013). Strain variability of the behavior of foodborne bacterial pathogens: A review, *International Journal of Food Microbiology*, 3, 310-321.

Mújica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Samson, C. T., Welte-Chanes, J., & Torres, J. A. (2011). High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. *Food Bioprocess and Technology*, 4.

Norton, T. & Sun, D.-W., 2008. Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology* 1, 2-34.

Rastogi N.K., Raghavarao K.S.M.S., Balasubramaniam V.M., Niranjan K., Knorr D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47, 69-112.

Real Decreto 1113/2006 de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos. BOE núm. 239, de 6 de octubre de 2006, páginas 34717 a 34720.

Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DOUE núm. 338, de 22 de diciembre de 2005, páginas 1 a 26.

Reglamento (CE) nº 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DOUE núm. 195, de 20 de julio de 2016, páginas 82 a 82.

**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos**  
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)  
Universidad de Valladolid

Sandra, S., Stanford M.A., Meunier Goddik L. (2004). The use of high-pressure processing in the production of Queso Fresco cheese. *Journal of Food Science*, 69, 153-8.

Scott, V.N., Swanson, K.M.J., Freier, T.A., Pruett Jr., W.P., Sveum, W.H., Hall, P.A., Smoot, L.A., Brown, D.G. (2005). Guidelines for conducting *Listeria monocytogenes* challenge testing of foods. *Food Protection Trends*, 25, 818–825.

SZCZAWIŃSKI, J. et al. (1997). Effect of high pressure on survival of *Listeria monocytogenes* in ripened, sliced cheeses at ambient temperature. In: HEREMANS, K. (Ed.) *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*. Leuven: University Press, 295-298.

Tao, Y., Sun, D.W., Hogan, E., Kelly, A.L. (2014). Chapter 1 - High-Pressure Processing of Foods: An Overview. In: *Emerging Technologies for Food Processing (Second Edition)*. Sun, Da-Wen edition, 3-24.

Tay, A., Shellhammer, T.H., Yousef, A.E., Chism, G.W., (2003). Pressure death and tailing behavior of *Listeria monocytogenes* strains having different barotolerances. *Journal of Food Protection*, 66, 2057–2061.

Tomasula, P.M., Renye, J.A., Van Hekken, D.L., Tunick, M.H., Kwoczak, R., Toht, M., Leggett, L.N., Phillips, J.G. (2014). Effect of high-pressure processing on reduction of *Listeria monocytogenes* in packaged Queso Fresco. *Journal of Dairy Science*, 97, 1281-1295.

Trujillo, A. J., Capellas, M., Buffa, M., Royo, C., Gervilla, R., Felipe, X., Sendra, E., Saldo, J., Ferragut, V., Guamis, B. (2000). Application of high-pressure treatment for cheese production. *Food Research International*, 33, 311–316.

United States Department of Agriculture - USDA. (2012). High pressure processing (HPP) and inspection program personnel (IPP) verification responsibilities. FSIS Directive 6120.1.

**Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos**  
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)  
Universidad de Valladolid

Wiedmann, M., et al. (1996). Ribotype diversity of *Listeria monocytogenes* strains associated with outbreaks of listeriosis in Ruminants. *Journal of Clinical Microbiology*, 5, 1086-1090.

Wiedmann, M. et al. (1997). A. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infection and Immunity*, 7, 2707-2716.

Yaldagard, M., Mortazavi, S. A., Tabatabaie, F. (2008). The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects. *African Journal of Biotechnology*, 7, 2739-2767.