



---

**Universidad de Valladolid**

Facultad de Medicina

Universidad de Valladolid

Trabajo Fin de Grado

Grado en Nutrición Humana y Dietética

Curso 2018/2019

Estudio de la población de bacterias ácido lácticas de un embutido cárnico mediante MALDI TOF.

---

Study of the lactic acid bacteria population of a meat sausage using MALDI TOF.



Realizado por el alumno: Irene Mirás Vázquez.

Tutorizado por la Profesora: Dra. Dña. Irma Caro Canales.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mi familia y compañeros de carrera por el apoyo recibido durante estos años haciendo posible mis estudios en el Grado de Nutrición Humana y Dietética.

También agradecer la ayuda proporcionada por mi tutora Irma Caro Canales y el grupo de investigación del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León liderado por Javier Mateo Oyagüe. Ha sido un placer y gran aprendizaje poder formar parte del equipo.

Finalmente agradecer al Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de Valladolid, más concretamente a Javier Gutiérrez, por su ayuda y conocimiento aportado.



## ÍNDICE

RESUMEN.....	6
PALABRAS CLAVE.....	6
ABSTRACT.....	7
KEYWORDS.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Justificación.....	8
1.2 Importancia de la carne y productos cárnicos en la nutrición humana.....	9
1.3 Relevancia y tendencias en la industria cárnica española.....	13
1.4 Estabilidad de los productos cárnicos. Principales microorganismos alterantes.....	14
1.6 Técnicas de identificación microbiana.....	18
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo general.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1 Obtención de muestras.....	22
3.2 Recuentos bacterianos.....	22
3.3 Aislamiento de bacterias.....	23
3.4 Recuperación de los aislamientos.....	23
3.5 Análisis mediante Espectrometría de Masas MALDI TOF.....	26
4. RESULTADOS Y DISCURSIÓN.....	27
5. CONCLUSIÓN.....	39
6. BIBLIOGRAFÍA.....	40
7. ANEXOS.....	47



## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1 . Interpretación del Biotyper log ( <i>score</i> ) generado por el equipo MALDI Biotyper (Bruker Daltonik).....	27
Tabla 2 . Valores medios y desviación estándar de los recuentos de bacterias ácido lácticas (BAL) realizados en el día 0 y 35 en un producto cárnico fresco. Los recuentos se realizaron en todos los tratamientos: control, lúpulo, aceite esencial y una combinación de ambos (lúpulo + aceite esencial). .....	28
Tabla 3 . Métodos de preparación de muestras utilizados para la identificación de las colonias aisladas de Agar MRS usando la Espectrometría de Masas MALDI TOF y con ayuda del sistema Biotyper (Bruker Daltonik) al día 0 de muestras provenientes de un embutido cárnico fresco.....	33
Tabla 4 . Métodos de preparación de muestra utilizados para la identificación de los aislamientos obtenidos a partir de Agar MRS al día 35, mediante Espectrometría de Masas MALDI TOF y con ayuda del sistema Biotyper (Bruker Daltonik) con las muestras de bacterias ácido lácticas a día 35 del experimento obtenidas a partir de un embutido cárnico fresco.....	35



## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1 . Clasificación de los derivados cárnicos. ....	10
Figura 2 . Tipos de derivados cárnicos en función de los tratamientos a los que han sido sometidos. ....	11
Figura 3 . Distribución del volumen de consumo de carne (kg/persona/año) para las diferentes categorías establecidas por MAPAMA.....	14
Figura 4 . Fundamento del método Espectrometría de Masas MALDI TOF.....	21
Figura 5 . Protocolos estándar de preparación de muestras de bacterias para el análisis mediante MALDI Biotyper (Bruker Daltonik).....	25
Figura 6 . Flujo de trabajo para la identificación bacteriana de las colonias puras aisladas a partir de un embutido cárnico desarrollado en la Universidad de León....	26
Figura 7 . Recuentos de bacterias ácido lácticas de un embutido cárnico conservado a 4°C en una atmósfera modificada previamente tratado con antimicrobianos naturales: lúpulo, aceite esencial, y una combinación de ambos, así como, de un control sin antimicrobianos.....	29
Figura 8 . Principales especies microbianas identificadas por Espectrometría de Masas MALDI TOF mediante el sistema Biotyper, aisladas a partir de Agar MRS de muestras al día 0, teniendo en consideración los mejores resultados obtenidos en la identificación.....	36
Figura 9 . Porcentajes de las principales especies microbianas identificadas por Espectrometría de Masas MALDI TOF con ayuda del programa Biotyper, aisladas a partir de Agar MRS en el día 35, según el tipo de tratamiento.....	37
Figura 10 . Distribución de las especies identificadas a los 35 días de almacenamiento.....	38



## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 . Resultados de la identificación por Espectrometría de Masas MALDI TOF mediante el sistema Biotyper, de las muestras al día 0 aisladas a partir de Agar MRS, teniendo en consideración los mejores resultados obtenidos para cada cepa..... 48

Anexo 2 . Resultados de la identificación por Espectrometría de Masas MALDI TOF mediante el sistema Biotyper, de las muestras al día 35 aisladas a partir de Agar MRS, teniendo en consideración los mejores resultados obtenidos para cada cepa..... 49



## RESUMEN

La carne y los derivados cárnicos son alimentos muy perecederos por su propia composición nutricional y propiedades físico-químicas. Entre los principales grupos microbianos responsables de su alteración se encuentran las bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus* spp. y *Leuconostoc* spp. los cuales producen cambios en las propiedades organolépticas del producto. El uso de antimicrobianos químicos como los nitritos ha sido una técnica ampliamente utilizada para evitar la alteración de la carne y productos cárnicos. La creciente demanda por parte del consumidor de productos naturales y más saludables ha impulsado el estudio de antimicrobianos naturales como los aceites esenciales. El presente trabajo estudia los cambios en la población bacteriana aislada en Agar MRS procedente de un embutido cárnico fresco a día 0 y 35 de su almacenamiento en condiciones anaerobias en función del uso de dos antimicrobianos naturales: aceite esencial, lúpulo y una combinación de ambos. Se identificaron 104 aislados (49 del día 0 y 55 del día 35) mediante Espectrometría de Masas MALDI TOF. Inicialmente la población microbiana fue más heterogénea compuesta por 10 especies dominadas por *Staphylococcus* spp. y *Lactobacillus sakei* spp. En el día 35, el número de especies microbianas disminuyó a 4 siendo *Lactobacillus sakei* spp. el microorganismo predominante. Con respecto a los tratamientos antimicrobianos, el aceite esencial mostró los menores recuentos de bacterias ácido lácticas a día 14 y 21.

## PALABRAS CLAVE

Bacterias ácido lácticas, MALDI TOF, embutido cárnico, antimicrobianos naturales.



## ABSTRACT

Meat and fresh meat products are very perishable foods due to their own nutritional composition and physical-chemical properties. Among the main microbial groups responsible for the alteration of anaerobic stored meat are the lactic acid bacteria such as *Lactobacillus* spp. and *Leuconostoc* spp. which produce sensory changes resulting in spoilage. The use of chemical antimicrobials has been a widely used technique to avoid the spoilage of meat and meat products. Increasing demand from the consumer for natural and healthier products has driven the study of natural antimicrobials such as essential oils. The present work studies the changes in the bacterial population isolated in MRS agar from a fresh sausage at day 0 and 35 of storage under anaerobic conditions as a function of the use of two natural antimicrobials: essential oil and hop, and a combination of both. 104 isolates (49 day 0 and y 55 day 35) were identified by MALDI TOF mass spectrometry. Initially the population was heterogeneous and composed of 10 species dominated by *Staphylococcus* spp. and *Lactobacillus sakei* spp. At day 35, the number of identified species were four and the predominant microorganism was *Lactobacillus sakei* spp. Regarding the antimicrobial treatments essential oil showed the lowest counts of lactic acid bacteria at day 14 and day 21.

## KEYWORDS

Lactic acid bacteria, MALDI TOF, meat sausage, natural antimicrobials.



## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1 Justificación.

La alta competitividad del sector agroalimentario, el aumento de la exigencia de los consumidores y los problemas emergentes de salud, han supuesto un impulso en el desarrollo e innovación de la industria cárnica española. En respuesta a ello, surgen numerosas ramas de investigación a nivel nacional con el objetivo de ofrecer derivados cárnicos más saludables y satisfactorios para el consumidor. Dentro de este contexto, el estudio de la sustitución de los antimicrobianos químicos por naturales adquiere cada vez más importancia.

Por otro lado, el uso de nuevas metodologías para el estudio de la microbiología de los alimentos requiere la evaluación de la efectividad y rapidez de esas técnicas en la identificación microbiana. El interés del empleo del método Espectrometría de Masas MALDI TOF reside en su reciente inclusión como técnica de identificación microbiana reportando una buena relación coste - efectividad.

Así mismo, el papel fundamental ejercido por las bacterias ácido lácticas en la carne y sus derivados, por un lado como alterantes cárnicos y por otro como responsables de los procesos fermentativos, hacen de este grupo de bacterias uno de los más interesantes para su identificación microbiana.

A nivel personal la elección del tema se encontró motivada por la posibilidad de participar en una investigación enmarcada dentro de las líneas punteras de desarrollo e innovación de la industria cárnica, así como, por la ampliación de los conocimientos en la microbiología de los alimentos.



## 1.2 Importancia de la carne y productos cárnicos en la nutrición humana.

La carne<sup>1</sup> y los derivados cárnicos<sup>2</sup> han formado parte de la alimentación humana desde hace muchos años. España es uno de los países con mayor tradición de elaboración y uso culinario de carne y sus derivados.

El consumo de productos cárnicos está condicionado por diversos factores como los socioeconómicos, éticos, religiosos y tradicionales. Dentro de estos, las características organolépticas (color, sabor, textura, olor, flavor) de los alimentos juegan un papel muy importante en su aceptación. La salud es uno de los elementos más valorados por parte del consumidor (1). Según el Grupo de Revisión, Estudio y Posicionamiento de la Asociación Española de Dietistas-Nutricionista (GRAP-AEDN) una alimentación saludable debe ser satisfactoria, suficiente, completa, equilibrada, armónica, segura, adaptada, sostenible y asequible (2).

A pesar de haber diferentes alternativas para obtener una dieta saludable, la inclusión de carne dentro de esta ejerce un papel importante en la nutrición y desarrollo humano. Desde el punto de vista nutricional aporta una buena cantidad de proteínas, vitaminas, minerales y lípidos (3).

En referencia a los macronutrientes destaca por ser una excelente fuente proteica, conteniendo entre 15-23g de proteína por cada ración de carne en crudo (100g) (4). Es importante resaltar, la elevada calidad de dichas proteínas siendo de alto valor biológico, es decir, aquellas que contienen todos los aminoácidos esenciales para el ser humano. Adicionalmente, presentan una alta digestibilidad. Esta ha sido valorada por el sistema de *score* de aminoácidos corregidos por digestibilidad (por sus siglas en inglés, PDCAAS), como 0,92. El valor 1 se ha descrito como el más alto del *score*, perteneciendo a la caseína y clara de huevo. Con respecto a las vitaminas y minerales, se caracteriza por ser rica en hierro, zinc, selenio, fósforo, potasio y vitaminas del grupo B (cianocobalamina, ácido fólico, tiamina, riboflavina etc.).

La composición nutricional específica de la carne estará condicionada por la especie, corte, origen y forma de cría (5).

---

<sup>1</sup> Carne: es definida por el Código Alimentario español como la parte comestible de los músculos de bóvidos, óvidos, suidos (jabalí), cápridos, équidos y camélidos sanos sacrificados en condiciones higiénicas. Por extensión, animales de corral, caza de pelo u pluma y mamíferos marinos.

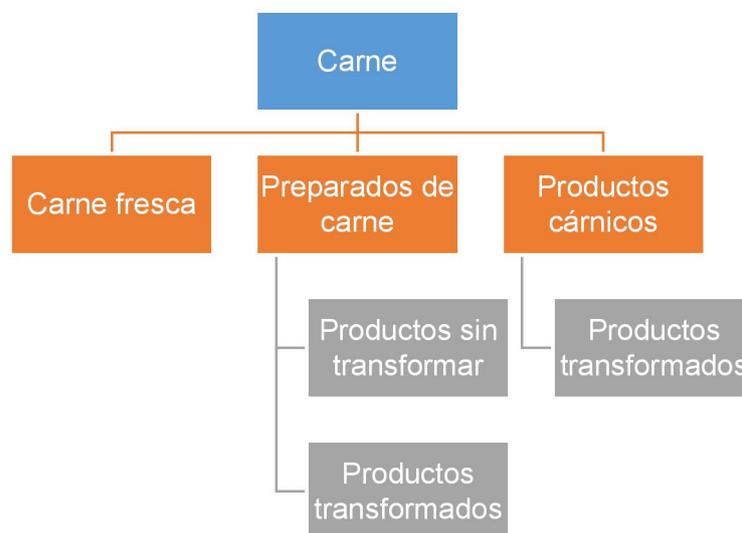
<sup>2</sup> Derivados cárnicos: son definidos por el Código Alimentario español como productos alimenticios preparados total o parcialmente con carnes o despojos de las especies autorizadas para tal fin.



Además de los nutrientes esenciales tradicionales, la carne y en especial carne roja, contiene un gran número de sustancias bioactivas que están siendo estudiadas por sus posibles beneficios para la salud: capacidad antioxidante, inmunomoduladoras etc. Ejemplo de ello son la taurina, creatina, ácido linoleico conjugado o los antioxidantes endógenos (6).

Por las razones comentadas anteriormente, su inclusión en la dieta facilita el cumplimiento de las recomendaciones diarias de energía, proteínas y micronutrientes en las diferentes etapas de la vida (7,8).

En referencia a los derivados cárnicos estos son diversos (ver Figura 1 y 2) presentando una composición y calidad nutricional heterogénea. Factores como el tipo de derivado cárnico, propiedades de la carne empleada e ingredientes adicionados condicionan su calidad nutritiva. Los valores nutricionales de estos productos difieren de la carne fresca. Generalmente presentan un mayor contenido en grasas, sal y energía (9). La Sociedad Española de Nutrición Comunitaria (SENC) clasifica a este grupo de alimentos dentro de consumo ocasional (SENC, 2005). Consciente de ello, la innovación en la industria alimentaria se ha centrado en la búsqueda de derivados y preparados cárnicos de alta calidad (10).



**Figura 1.** Clasificación de los derivados cárnicos.

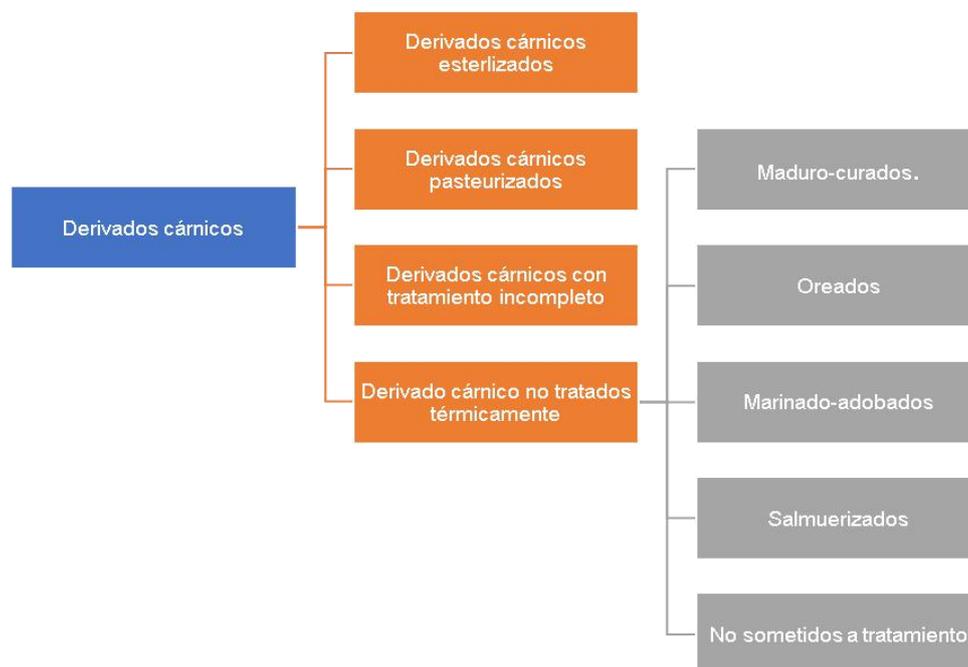
*Fuente:* elaboración propia de acuerdo al *Reglamento (CE) 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios* (11).



Como se puede observar en la Figura 1 la clasificación establece una diferencia entre preparado cárnico y producto cárnico:

- ❖ **Preparados de carne:** son carne fresca, incluida la carne que ha sido troceada, es aquella a la que se ha añadido productos alimentarios, condimentos o aditivos, o que ha sido sometida a transformaciones que no son suficientes para alterar la estructura de la fibra muscular ni, por lo tanto, para eliminar las características fisiológicas de la carne fresca.
- ❖ **Productos cárnicos:** son productos transformados que resultan de la transformación de la carne o de la nueva transformación de estos productos transformados, de manera que la superficie del corte muestre que el producto ha dejado de poseer las características de la carne fresca.

Así mismo, los derivados cárnicos variarán su composición físico-química y nutricional en función de los tratamientos a los que se han sometido durante su elaboración, debido a esto el *Real Decreto 474/2014* establece la siguiente clasificación recogida en la Figura 2.



**Figura 2.** Tipos de derivados cárnicos en función de los tratamientos a los que han sido sometidos.

*Fuente:* elaboración propia a partir de lo establecido por el *Real Decreto 474/2014*, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos (12).



Por otro lado, la carne y derivados cárnicos han sido alimentos muy cuestionados por su posible relación con enfermedades crónicas (ej. Cardiovasculares, cáncer...).

En 2015 la Agencia de Investigación contra el Cáncer (IARC) y la Organización Mundial para la Salud (OMS) especializados en cáncer, emitían un informe en el que la carne roja<sup>3</sup> fue clasificada como “probablemente cancerígeno para el ser humano” (grupo 2A) y la carne procesada<sup>4</sup> como “cancerígeno para los humanos” (grupo 1) (13,14).

Los compuestos derivados de los procesos de cocinado y de conservación han sido señalados como posibles responsables de la relación entre el cáncer y los productos cárnicos. Entre ellos se encuentran las aminas heterocíclicas e hidrocarburos aromáticos policíclicos formadas durante el cocinado con calor seco (15), o las nitrosaminas derivadas de los nitritos y nitratos utilizados en los productos cárnicos para evitar el crecimiento de *Clostridium botulinum* (16, 17, 18, 19).

De acuerdo con los resultados mostrados en el informe de la IARC, se ha observado que el consumo de 100 g por día de carne roja y 50 g por día de carne procesada puede incrementar el riesgo de padecer cáncer en un 17% y un 18%, respectivamente. Según datos publicados por la Agencia Española de Consumo Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN), recogidos en la encuesta ENIDE (20), la ingesta de carne roja en España, se encuentra entre 50 a 100 g persona día, hallándose lejos de los 200g carne roja/por/día que el IARC considera como elevado consumo.

En 2015 la Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN) y la Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD) emitieron su posicionamiento al respecto. Afirmaron la importancia e interés nutricional de la carne y los derivados cárnicos, consumidos en las cantidades recomendadas, y su intención de mantener las actuales recomendaciones de salud. Dichas directrices están basadas en un consumo de carnes magras moderado (3 veces/semana) y

---

<sup>3</sup> Carne roja según la IARC: carne de músculo de mamíferos sin procesar (ej. carne de vaca, ternera, cerdo, cordero, caballo, cabra), incluyendo la carne picada o congelada.

<sup>4</sup> Carne procesada según la IARC: carne que ha sido transformada mediante salazón, curado, fermentación, ahumado u otros procesos con el objetivo de para aumentar el sabor o mejorar su conservación.



consumo ocasional de carne procesada. Todo ello enmarcado dentro de un patrón dietético adecuado, como la dieta mediterránea, rica en alimentos de origen vegetal (frutas, verduras, hortalizas, aceite de oliva, cereales integrales, legumbres, frutos secos...) y un estilo de vida activo (21, 22).

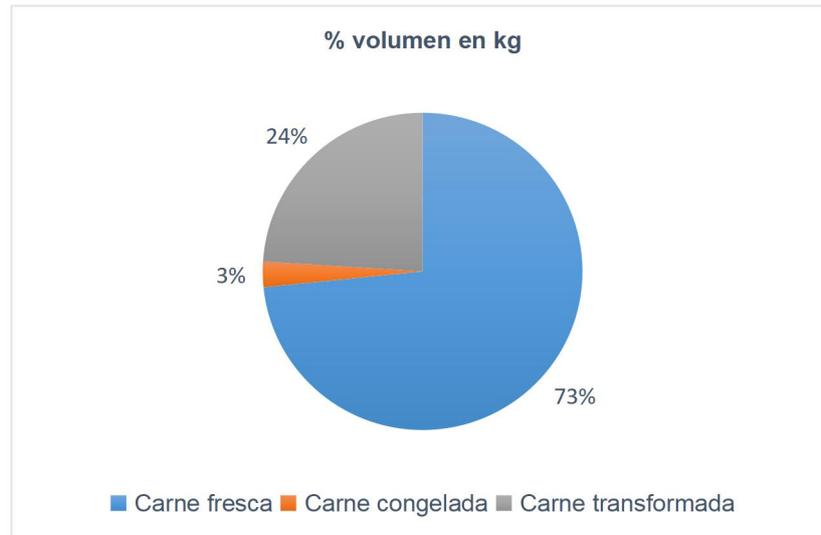
Así mismo, la modificación de técnicas culinarias permite la reducción de la formación de compuestos carcinogénicos. Las altas temperaturas se definen como superiores a 150°C, considerándose un rango entre 150-300°C peligroso por su alta formación de compuestos como las aminas heterocíclicas e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Técnicas culinarias como la cocción, vapor u horno presentarán una menor formación de estos compuestos, así como, con un menor tiempo de exposición a las altas temperaturas (23)

### 1.3 Relevancia y tendencias en la industria cárnica española.

La industria cárnica se sitúa como cuarto sector industrial más importante de nuestro país, sólo por detrás de la industria automovilística, la petrolera y de combustibles y la de producción y distribución de energía eléctrica.

Según los datos del Informe de Consumo de Alimentos en España elaborado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPAMA) el consumo de carne per cápita (kg/persona/año) en 2017 se estimó en 42,6kg para la carne fresca y de 3,3kg para las carnes transformadas. El consumo de carnes frescas en los hogares durante este año sufrió un descenso del 2,2% en volumen respecto al año anterior. La simplificación del menú y mayor consumo de platos preparados se describen como posibles responsables. Acorde a ello, la carne transformada experimentó un crecimiento del 1% en volumen, al igual que las carnes congeladas aumentaron un 1,3% (24).

Como se puede observar en la Figura 3 la carne transformada tiene un gran peso en el consumo de los españoles suponiendo un 24% del total de kg consumidos en 2017. Dentro de esta categoría los dos mayores impulsores de su crecimiento son el lomo embuchado y las salchichas. De acuerdo con la FAO, el consumo de carne sigue una tendencia similar en 2018 estimándose un consumo per cápita mundial de 43,9kg al año (25).



**Figura 3.** Distribución del volumen de consumo de carne (kg/persona/año) para las diferentes categorías establecidas por MAPAMA.

*Fuente:* elaboración propia a partir de los datos aportados por el informe de Consumo de Alimentos en España elaborado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPAMA) en 2017 (24).

#### 1.4 Estabilidad de los productos cárnicos. Principales microorganismos alterantes.

La carne y los derivados cárnicos son alimentos fácilmente alterables<sup>5</sup>. Su propia naturaleza y composición los hace productos muy susceptibles a la contaminación microbiana. Factores intrínsecos como la alta  $a_w$  superior a 0,85 y valores de pH neutro son condiciones favorables de crecimiento para un gran número de microorganismos.

Su composición nutricional influye de forma crucial en la estabilidad. La carne y los derivados cárnicos son altamente susceptibles a sufrir cambios debidos a la oxidación. Su alto contenido en lípidos y proteínas (principalmente), así como, en carbohidratos, moléculas bioactivas y metales pro-oxidantes (Fe, Cu) hace que sea una diana fácil para los radicales libres (26).

<sup>5</sup> Producto alterado: aquel que durante su obtención, preparación, manipulación, transporte, almacenamiento o tenencia, y por causas no provocadas deliberadamente, sufre variaciones en sus caracteres organolépticos, composición química o valor nutritivo de tal forma que la aptitud para el consumo queda anulada o disminuida, aunque permanezca inocuo.



Adicionalmente, las condiciones de almacenamiento tales como: temperatura, condiciones de envasado y adición de conservantes han demostrado influir en la población bacteriana responsable del proceso deteriorativo. Los principales grupos microbianos que pueden alterar la carne son mayormente bacterias ácido lácticas, *Brochothrix* spp., *Pseudomonas* spp., enterobacterias y micrococcos causando defectos como pérdida del color, odor etc. En referencia a las bacterias ácido lácticas, los *Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp. y *Leuconostoc* spp. han sido asociadas a la alteración de la carne refrigerada. Así mismo, pueden ser las especies predominantes en atmósferas reducidas en oxígeno. En carne envasada al vacío, la población bacteriana para este grupo de bacterias se vió liderada por *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* y *Leuconostoc* spp. (27).

Por otro lado, los microorganismos patógenos son capaces de desarrollar una enfermedad en el ser humano produciendo múltiples hospitalizaciones e incluso muertes. En la carne estos episodios se han visto asociados de forma común con *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* y *Aeromonas hydrophila* entre otros (28).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) ejercen un papel importante en los productos cárnicos fermentados funcionando como cultivo iniciador, aportando una mejora en la calidad de estos. Los ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno y las bacteriocinas producidas durante la fermentación dan lugar a una disminución del pH, y como consecuencia, una inhibición del crecimiento de microorganismos esporulados. Por otro lado, cabe resaltar su ayuda en el control de la flora microbiana endógena durante los procesos tecnológicos.

En las salchichas crudas los cultivos iniciadores de bacterias ácido lácticas más usados proceden de *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella*, *Pediococcus*, y *Lactococcus*. En las salchichas fermentadas tradicionales europeas *Lactobacillus sakei* y/o *Lactobacillus curvatus* dominan el proceso fermentativo (29).

El rol de las bacterias ácido lácticas cambia sustancialmente en los productos cárnicos envasados en atmósferas protectoras al ser los principales microorganismos alterantes (30). Se ha reportado una diversidad de bacterias ácido lácticas responsables de la alteración, entre las cuales se encuentran *Lactobacillus* spp. o *Leuconostoc* spp. Las principales alteraciones microbianas producidas por este tipo



de bacterias son la pérdida de flavor y olor, decoloración, generación de gas, producción de película (film) y disminución del pH.

En los productos cárnicos envasados en películas permeables al oxígeno también se pueden desarrollar sabores ácidos y olores rancios siendo responsables microorganismos como *Brochothrix Thermosphacta*, *Lactobacillus* spp. y *Carnobacterium* spp.

La descoloración de la carne a un tono verde es producida por bacterias como *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. y *Carnobacterium divergens*. Así mismo, la producción de gas está relacionada con el crecimiento bacteriano de *Leuconostoc mesenteroides* y *Leuconostoc carnosus* (30).

Finalmente, la formación de una película (film) durante su crecimiento se asocia a la presencia de bacterias tales como *Lactobacillus sakei*, otros *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc carnosus*, *Leuconostoc* spp., *Leuconostoc mesenteroides* subp. *mesenteroides* entre otros (30).

### 1.5 Uso de antimicrobianos tradicionales y naturales.

Con el fin de incrementar su conservación, garantizar la seguridad microbiológica<sup>6</sup> y conseguir las propiedades organolépticas deseadas, en la industria alimentaria se llevan utilizando durante años diferentes aditivos alimentarios<sup>7</sup>.

Recientemente se ha incrementado el interés por antimicrobianos naturales procedentes de extractos de plantas, hongos, algas y productos animales. Además, estas alternativas naturales pueden suponer una solución a los problemas emergentes de resistencia antimicrobiana y a los posibles efectos secundarios de los compuestos sintéticos (31).

Los aditivos químicos, en especial los nitritos y nitratos, han sido ampliamente utilizados en numerosos productos cárnicos con el fin de evitar la oxidación lipídica, realzar y fijar el color de la carne, destacar el sabor y evitar el crecimiento microbiano

---

<sup>6</sup> Alimento seguro: aquel que está libre de contaminación por bacterias, virus, parásitos, sustancias químicas y agentes físicos externos.

<sup>7</sup> Aditivo alimentario: sustancias que no constituyen por sí mismos un alimento y no poseen un valor nutritivo, agregándose con el fin de modificar los caracteres organolépticos de las comidas o facilitar su proceso de elaboración y conservación artificiales.



sobre todo de patógenos como el *Clostridium botulinum* (32,33). Sin embargo, durante los últimos años han surgido múltiples estudios epidemiológicos que ponían en duda su seguridad al vincularlos con diferentes problemas de salud como los procesos cancerígenos. En especial los nitritos han sido relacionados en varios estudios con una posible implicación en los procesos cancerígenos al contribuir a la producción de nitrosaminas (34).

Además, se ha asociado la transformación de nitratos en nitritos, debida a las enzimas presentes en nuestra saliva y estómago, con el desarrollo de metahemoglobinemia. Ante este escenario de dudas, la EFSA reevaluó el papel de ambos aditivos alimentarios en 2017 descartando la relación entre cáncer y nitritos según la evidencia científica disponible. Así mismo, comunicó la adecuación de la actual ingesta diaria admitida (ADI) para los nitratos. A este respecto, refirió también la posibilidad de verse excedida si se tienen en cuenta todas las fuentes dietéticas (aditivos alimentarios, contaminación y fuentes naturales), siendo la aportación por parte de los aditivos alimentarios un porcentaje muy pequeño del 5% (35). También apuntó que, la cantidad de nitritos necesarios para inhibir el crecimiento microbiano dependerá de cada tipo de producto cárnico. Si se aplican buenas prácticas de higiene, un correcto APPCC y tiempos de almacenamiento cortos algunos productos cárnicos podrían desarrollarse sin la presencia estricta de nitritos (36).

Como se comentó anteriormente, la oxidación supone un factor limitante en la calidad y aceptabilidad de los productos cárnicos afectando negativamente a sus propiedades organolépticas y reduciendo su vida útil. Entre los efectos obtenidos destacan la pérdida de calidad nutricional, color, sabor e incluso la aparición de productos tóxicos derivados de la peroxidación lipídica. Ejemplos de antioxidantes químicos añadidos para evitar este efecto son el butil hidroxitolueno (BHT), hidroxibutilanisol (BHA), propilgalatos y el eritorbato sódico. Actualmente, también se comercializan aditivos naturales con efecto antioxidante. Estos se sintetizan en la industria a partir de aislados de fuentes naturales siendo los más estudiados las especies ricas en polifenoles, plantas medicinales o aromáticas, así como, sus extractos y aceites esenciales (26).

Los aceites esenciales procedentes de fuentes vegetales son de los antimicrobianos naturales más estudiados. Además de su propiedad antioxidante, su adición añade características antimicrobianas ante múltiples bacterias como *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium botulinum* que pueden crecer



en la carne y sus derivados (37). Entre los más analizados se encuentran el aceite esencial de orégano, clavo, tomillo, jengibre, rosa mosqueta y albahaca. Su potencial acción antimicrobiana se ha descrito tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas presentes en la carne. Dicha actividad reside en su alto contenido en compuestos fenólicos. También juegan un papel importante los bioproductos, como el hidrosol, y los metabolitos secundarios presentes en las plantas medicinales y sus aceites (38).

Entre las limitaciones principales para su uso se encuentra el aporte de un intenso sabor que puede estropear las características sensoriales del producto. Técnicas emergentes como la encapsulación de estos aceites en nanoemulsiones (39) y su uso conjunto con otras tecnologías (nisina, MAP etc.), así como, el embalaje activo, han sido propuestos con el fin de solucionar este problema (40).

Así mismo, la industria alimentaria ha estudiado el uso de las bacteriocinas producidas por algunas bacterias ácido láctico (lactococos, lactobacilos, pediococos) como conservantes de los alimentos (41). La lisina representa la única bacteriocina aprobada por la Administración de Alimentos y Cosméticos (FDA) aunque otros compuestos como la pediocina han sido investigados. El uso de estas bacteriocinas está enfocado a la inhibición de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus cereus* (42).

## 1.6 Técnicas de identificación microbiana.

Entre las herramientas de trabajo esenciales en el laboratorio de microbiología de los alimentos se encuentra la aplicación de una metodología efectiva de identificación microbiana. Su uso tiene como objetivo la identificación de los microorganismos de interés por su relevancia clínica o implicación en la calidad, seguridad y tecnología alimentaria.

Actualmente existen múltiples maneras de abordar la identificación microbiana siendo las más importantes los métodos fenotípicos o “tradicionales”, métodos moleculares y los métodos basados en la proteómica (43).

Los métodos clásicos para la identificación bacteriana se basan principalmente en test rápidos y simples como la tinción de Gram, los test de catalasa y oxidasa. En segundo lugar los ensayos fenotípicos, basados en pruebas bioquímicas, han sido ampliamente utilizados debido a su sencillez y disponibilidad para completar la



identificación. Esta identificación puede ser llevada a cabo usando kits comerciales como pruebas bioquímicas en miniatura como el API (Biomerieux), incluso kits automatizados (44). Sin embargo, dichas técnicas que establecen la identificación por marcadores fenotípicos pueden mostrar ligeras variaciones debido a las condiciones de cultivo, tiempo, temperatura, medios de cultivo etc. Como ya se ha mencionado anteriormente, el estudio se basa en las propiedades morfológicas, fisiológicas y bioquímicas (tinciones, cultivos, pruebas bioquímicas y pruebas serológicas). Estas propiedades son observadas en la bacteria desconocida y comparadas con las recogidas en una base de datos de bacterias tipo. Cuanta mayor sea la similitud de dichas características la fiabilidad de la identificación se ve aumentada. Cabe destacar las diferentes limitaciones de este tipo de métodos entre los que podemos mencionar los siguientes: i) las cepas pueden expresar diferentes morfologías o características bioquímicas a pesar de ser de la misma especie, debido a las condiciones de crecimiento, obteniendo diferentes resultados en ensayos repetidos de la misma cepa, ii) el tiempo utilizado en este tipo de ensayo, iii) limitaciones en la fuentes de datos para llevar a cabo la comparación entre cepas y la lentitud y cantidad de material usado durante el procedimiento (43).

La presencia de los inconvenientes mencionados y la necesidad de una identificación rápida y fiable justifican el uso de otros métodos complementarios como son las técnicas de biología molecular.

Estas pruebas consisten en el estudio de genes estables, dianas moleculares, que permitan establecer una relación a nivel filogénico entre bacterias. La identificación molecular se basa en la amplificación del gen de interés y secuenciación de este o de alguno de sus fragmentos. A pesar de utilizarse diferentes genes (rpoB, gyrB, ARNr23s...), actualmente el estudio de la secuencia del ARNr 16S es el más usado para la identificación. Entre las características que justifican su interés para la identificación bacteriana destacan su distribución universal, el alto grado de conservación y la presencia de regiones variables específicas para cada especie (43).

Otras técnicas basadas en la proteómica, como la Espectrometría de Masas, están siendo utilizada actualmente con gran éxito. La Espectrometría de Masas es una técnica analítica ideada a principios del siglo XX por J. J Thompson, que ha demostrado analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos separándolos en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ). Después de su



análisis se obtiene un gráfico, denominado espectro de masas, que representa los fragmentos adquiridos por orden creciente de masas frente a su abundancia relativa (45).

El uso de la Espectrometría de Masas para la identificación bacteriana fue propuesto por primera vez en 1975 debido a la obtención de diferentes espectros para los distintos géneros y especies de pequeñas bacterias liofilizadas (46).

El desarrollo de dispositivos de Espectrometría de Masas MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry) está cambiando el flujo de trabajo de los laboratorios de microbiología ofreciendo una herramienta fácil de utilizar, rápida y efectiva. Los resultados son obtenidos a partir de la detección de proteínas ribosómicas de entre 2.000-20.000 Da. La rapidez del método adquiere especial importancia en su uso para diagnóstico clínico (47).

Todos los espectrómetros de masas constan de tres elementos fundamentales: una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector.

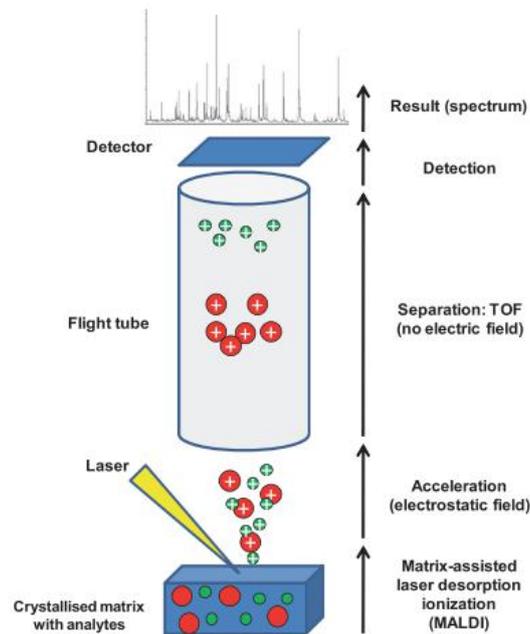
En el caso de la Espectrometría de Masas MALDI TOF, la fuente de ionización es un láser ultravioleta (con una longitud de onda de 337nm) que permite la desorción/ionización de la muestra con la ayuda de un ácido orgánico fotosensible denominado matriz. La función de la matriz consiste en la absorción de la energía del láser para su posterior transmisión a la muestra facilitando así la cesión de iones. Por ello, el primer paso para el uso del equipo consiste en la aplicación de la muestra sobre uno de los pocillos de la placa de MALDI TOF y la adicción de matriz. Siendo necesario esperar a su secado para que la muestra y la matriz cristalicen. Posteriormente se introduce la placa y las muestras son ionizadas al ser bombardeadas con fotones emitidos por el láser del equipo.

La muestra ionizada y vaporizada crea una nube de gas densa entre los electrodos. El campo eléctrico formado permite acelerar la muestra hasta el detector. El analizador tipo TOF (por sus siglas en inglés, tiempo de vuelo) separa los iones procedentes de la muestra en relación con su ratio masa/ carga ( $m/z$ ).

El tiempo que tarda cada partícula en atravesar el tubo de flujo, o tiempo de vuelo, que depende de su masa atómica. Este tiempo es analizado por un detector, situado al final del tubo, que genera un gráfico específico de masas para cada microorganismo. El espectro obtenido se compara con los perfiles de espectros de



una base de datos permitiendo identificar al microorganismo desconocido ( ver Figura 6) (48).



**Figura 4.** Fundamento del método Espectrometría de Masas MALDI TOF.

*Fuente:* Recuperada de Antony Croxatto, Guy Prod'hom, Gilbert Greub, Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology, FEMS [Internet]. 2012;36(2): 380–407. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298> (48).

## 2. OBJETIVOS.

### 2.1 Objetivo general.

El objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Grado (TFG), ha sido el estudio de la de bacterias ácido lácticas en un embutido cárnico fresco tratado con diferentes antimicrobianos naturales durante su almacenamiento mediante el uso de Espectrometría de Masas MALDI TOF.



## 2.2 Objetivos específicos.

- Establecer el método de preparación de muestras para la identificación de bacterias ácido lácticas aisladas de un embutido cárnico mediante de la técnica Espectrometría de Masas MALDI TOF.
- Identificar las principales especies de bacterias aisladas a partir Agar MRS presentes en un embutido cárnico utilizando Espectrometría de Masas MALDI TOF.
- Identificar las principales especies de bacterias ácido lácticas en embutidos cárnicos tratados con antimicrobianos naturales como aceite esencial (EO), lúpulo (HOP) y una combinación de ambos (EO+ HOP) en salchichas frescas.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 3.1 Obtención de muestras.

Las muestras han sido obtenidas a partir de un embutido cárnico de cordero, denominado salchicha tipo Cevapi, elaborado en la planta piloto de la Universidad de León por el grupo de investigación liderado por Javier Mateo Oyagüe profesor del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Este embutido fue elaborado con carne picada de cordero, a la que se agregó 2% de NaCl. Esta mezcla se refrigeró durante 24 horas. Así mismo, se preparó una solución que contenía agua, ajo y pimienta, que fue utilizada para agregarlo al producto control (CON). Seguidamente, se preparó la mencionada solución, a la que se agregó alguno de los siguiente antimicrobianos: lúpulo (tratamiento HOP), aceite esencial de *Zataria multiflora* (tratamiento EO) o una combinación de ambos (tratamiento HOP+EO), ésta solución fue adicionada a la mezcla de carne refrigerada. Posteriormente, los preparados cárnicos fueron embutidos y envasados en una atmósfera modificada de 20% CO<sub>2</sub> y 80% N, estas salchichas, fueron mantenidos en refrigeración a 4 °C durante 35 días.

### 3.2 Recuentos bacterianos.

Las muestras fueron obtenidas de cada tratamiento los días 0 y 35 de almacenamiento y procesadas en un período de tiempo no mayor a 3 horas. Se realizaron diluciones seriadas en Agua Peptonada con 0.1% de peptona (Oxoid) y 0.85% de Na Cl hasta obtener una población de bacterias entre 30 y 300 ufc/mL en cada placa.



Los recuentos de bacterias ácido lácticas (BAL) fueron realizados en Agar De Manosa Rogosa y Sharpe (Agar MRS; Oxoid) agregando una doble capa de agar (MRS) a las placas. Las placas se incubaron a 30°C durante 72 horas.

### 3.3 Aislamiento de bacterias.

A partir de las placas de Agar MRS crecidas y en las que se realizó el recuento microbiano, se recogieron dos colonias que fueran representativas de la población microbiana presentes en la placa, según la morfología de la colonia. Estas colonias fueron sembradas en un caldo de TSB (Oxoid) con 0.5% extracto de levadura e incubadas a 35°C durante 24 horas. 1 mL del cultivo fue centrifugado a 12,000 r.p.m durante 5 min en una centrífuga (marca Eppendorf). Posteriormente se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 1 ml de un medio que contenía 50% de TSB y 50% de glicerol. Las cepas fueron congeladas a -20°C hasta su utilización.

### 3.4 Recuperación de los aislamientos.

Las colonias guardadas en glicerol se sembraron en caldo TSB + 0.5 de extracto de levadura y se incubaron a 35°C durante 24h. Posteriormente, se sembraron en placas Agar MRS y se incubaron en las condiciones antes mencionadas para verificar la pureza de los aislamientos. A partir de las placas que contenían un solo un tipo de colonias se prepararon las muestras para el análisis mediante Espectrometría de Masas MALDI TOF con el sistema MALDI Biotyper (Bruker Daltonik). El análisis fue llevado a cabo en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de Valladolid.

Para conocer el método más eficiente de preparación de las muestras para el análisis mediante MALDI TOF de este tipo de aislamiento, se realizaron estudios preliminares siguiendo tres protocolos descritos por el fabricante del MALDI Biotyper (Bruker Daltonik). Los protocolos valorados fueron (ver Figura 5):

- a) Transferencia directa.
- b) Transferencia directa extendido.
- c) Extracción larga.



**a) Método de transferencia directa.**

Una colonia de las placas que contenían aislamientos puros se transfirió a la placa de ensayo (Steel Target Sample Plate) del MALDI TOF. Posteriormente, se dejó secar totalmente al aire y una vez seco se agregó 1  $\mu$ L de matriz ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxicinámico disuelta en una solución saturada de acetonitrilo y ácido trifluoroacético y se dejó cerca al aire. Seguidamente, se analizó con ayuda del analizador MALDI TOF (Bruker Daltonik GmbH GmbH, Leipzig, Alemania). El analizador tipo TOF separa los iones procedentes de la muestra en relación con su ratio masa/carga (m/z).

**b) Método de transferencia directa extendido.**

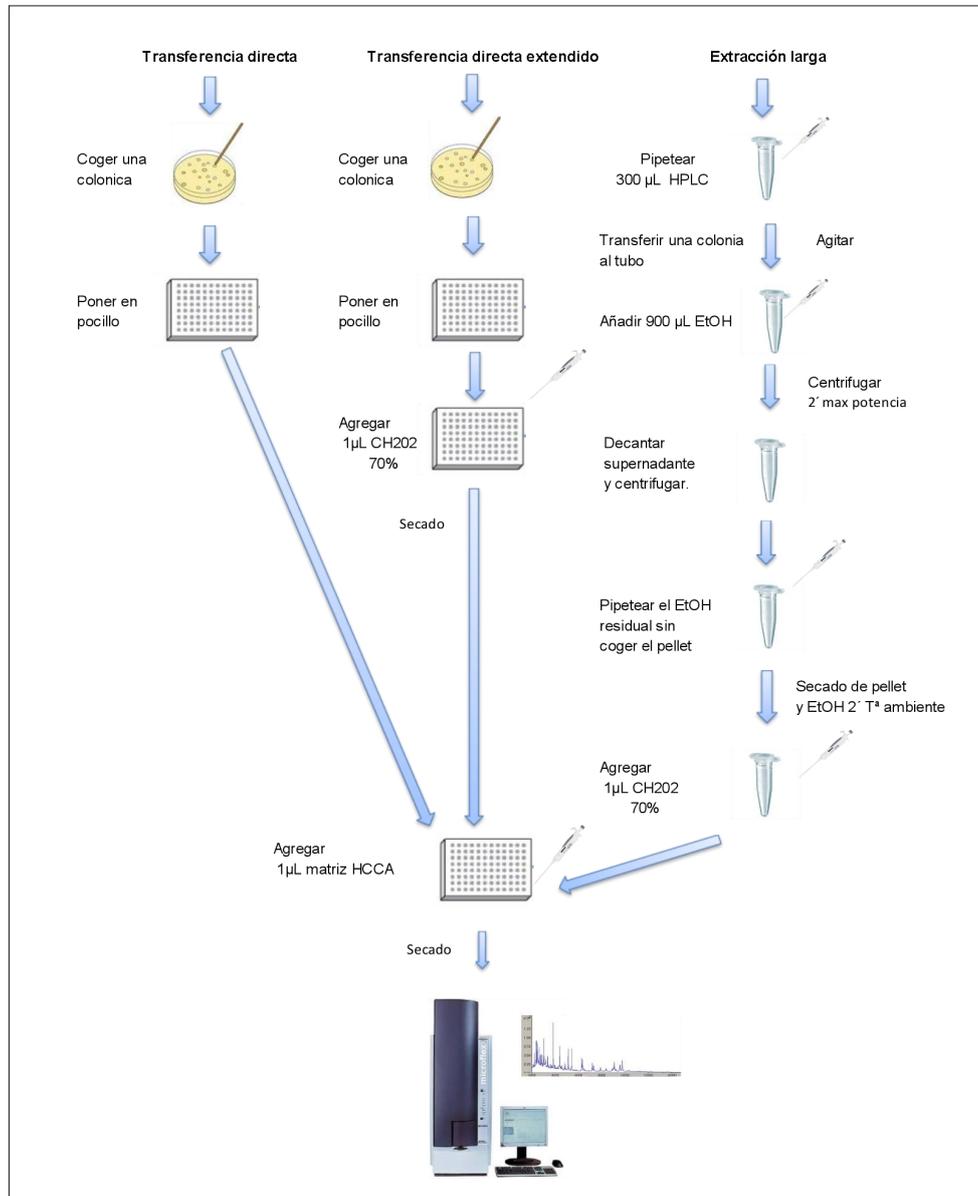
Una colonia de las placas que contenían aislamientos puros se transfirió a la placa de ensayo (Steel Target Sample Plate) del MALDI TOF. Posteriormente, se dejó secar totalmente al aire y, una vez seco, se agregó 1  $\mu$ L de ácido fórmico al 70% sobre el pocillo dejándolo secar nuevamente a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1  $\mu$ L de matriz ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxicinámico disuelta en una solución saturada de acetonitrilo y ácido trifluoroacético y se dejó cerca al aire. Finalmente, se analizó con ayuda del analizador MALDI TOF (Bruker Daltonik GmbH GmbH, Leipzig, Alemania).

**c) Método de extracción larga.**

Se agregaron 300  $\mu$ L de agua dionizada (MS Grade) a cada tubo de microcentrífuga Eppendorf. Una colonia de las placas que contenían aislamientos puros se transfirió al fondo del tubo y se realizó una centrifugación. Posteriormente se añadió 900  $\mu$ L de etanol y se centrifugó a la máxima potencia (13.000-15.000rpm) durante 2 minutos. Seguidamente, se decantó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente durante 2 minutos. A continuación, se retiró el etanol sobrante con la ayuda de una pipeta teniendo cuidado de no eliminar el pellet. Se agregó 1  $\mu$ L de ácido fórmico al 70% al tubo Eppendorf donde se encontraba el pellet y se mezcló bien mediante centrifugación. Finalmente, se agregó 1  $\mu$ L de acetonitrilo y se centrifugó a la máxima potencia (13.000-15.000rpm) durante 2 minutos. Se pipeteo 1  $\mu$ L de sobrenadante y se transfirió a la placa de ensayo (Steel Target Sample Plate) del MALDI TOF dejándolo secar. A continuación, se añadió 1  $\mu$ L de matriz ácido  $\alpha$ -cyano-4-



hidroxicinámico disuelta en una solución saturada de acetonitrilo y ácido trifluoroacético y se dejó cerca al aire. Finalmente, se analizó con ayuda del analizador MALDI TOF (Bruker Daltonik GmbH GmbH, Leipzig, Alemania).



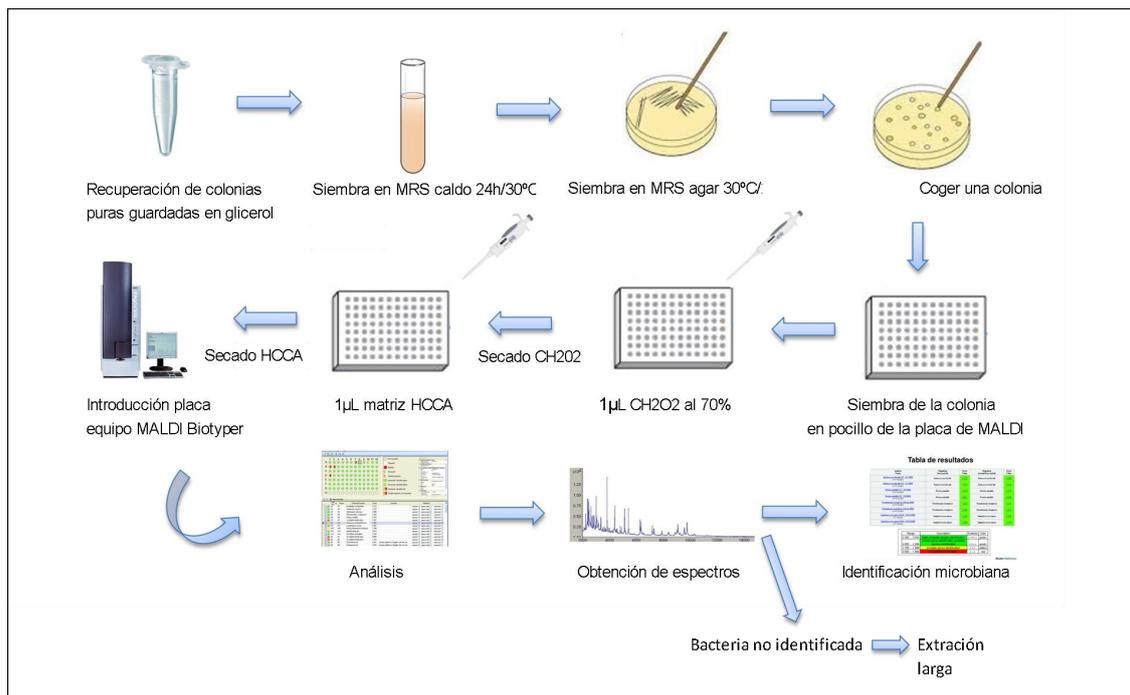
**Figura 5.** Protocolos estándar de preparación de muestras de bacterias para el análisis mediante MALDI Biotyper (Bruker Daltonik).

*Fuente:* elaboración propia a partir de la guía de protocolos de MALDI Biotyper (Bruker Daltonik) (49).

El método de transferencia directa quedó descartado en las pruebas preliminares debido a su escasa puntuación en la identificación. La naturaleza Gram positiva de



las bacterias ácido lácticas y la formación de exopolisacáridos justificó la necesidad de realizar un protocolo con extracción. El método de extracción transferencia directa extendido (protocolo estándar de Bruker Daltonik para MALDI Biotyper), fue el elegido finalmente por su buena relación entre tiempo de preparación y los resultados obtenidos. El flujo de trabajo seguido en este estudio ha sido resumido en la Figura 6. Para las cepas con baja determinación con el método de transferencia directo extendido, se procedió a la aplicación del método de extracción larga, siguiendo el protocolo estándar de (Bruker Daltonik) para MALDI Biotyper.



**Figura 6.** Flujo de trabajo para la identificación bacteriana de las colonias puras aisladas a partir de un embutido cárnico desarrollado en la Universidad de León.

Fuente: elaboración propia.

### 3.5 Análisis mediante Espectrometría de Masas MALDI TOF.

La medición de masas se realizó usando Flex Analysis (versión 3.4; Bruker Daltonik), para ello, se llevó a cabo una calibración externa del espectro de masas, utilizando un estándar *E. coli* DH5. Posteriormente, la determinación se realizó en el modo automático.



Para la identificación de los microorganismos a través del espectro de masas obtenido de los microorganismos problema se procesó con el programa BioTyper (version 3.1; Bruker Daltonik). La lista de picos generada se comparó con la biblioteca de referencia del MALDI Biotyper 3.1, usando un algoritmo de comparación integrado en el programa. Tras importar el espectro al programa, todo el proceso, desde su análisis hasta su identificación, se lleva a cabo de forma automática, sin intervención alguna por parte del usuario.

En función de la similitud de este espectro con la librería de datos se obtienen puntuaciones, denominadas *score* por el fabricante. El BioType log (*score*) se identifica con un semáforo de colores en función del valor obtenido (Tabla 1). En cuestión de minutos se obtiene en formato PDF los resultados de la determinación.

SCORE	PROBABILIDAD
0.00 - 1.699	Identificación irrelevante.
1.70 - 1.99	Identificación probable del género.
2.0 - 2.299	Identificación de género segura, identificación probable de especie.
2.300 - 3.000	Alta probabilidad de identificación de especie.

**Tabla 1.** Interpretación del Biotyper log (*score*) generado por el equipo MALDI Biotyper (Bruker Daltonik).

*Fuente:* elaboración propia a partir del manual de uso MALDI Biotyper (Bruker Daltonik) (50).

Como se puede observar en la Tabla 1, la identificación a nivel de género se establece para una puntuación de 1,7-1,99. Sin embargo, para conseguir una identificación a nivel de especie la obtención de niveles superiores a un score de 2.0 son necesarios.

#### 4. RESULTADOS Y DISCURSIÓN.

En este trabajo de investigación se presentan los resultados parciales, es decir, la evolución de los recuentos de bacterias ácido lácticas (BAL) en el día 0 y día el 35 del experimento. Así como, el método más apropiado para la identificación de las BAL en los días anteriormente mencionados mediante Espectrometría de Masas MALDI TOF usando el sistema MALDI Biotyper (Bruker Daltonik).

En la Tabla 2, se recogen los valores medios y la desviación estándar de los recuentos (BAL) realizados en el día 0 y 35 en un preparado cárnico (salchicha Cevapi, mantenida a 4°C y envasado en una atmósfera modificada 20% CO<sub>2</sub> y 80%



N). Los recuentos de BAL en el día 0 oscilaron entre 4,15 y 4,79 Log ufc/ g, mientras que en el día 35 las BAL alcanzaron unos valores medios comprendidos entre 8,4-8,8 Log ufc/g. Las diferencias de los recuentos de BAL en el día cero entre los tres lotes elaborados no superaron una unidad logarítmica. Los recuentos encontrados en este trabajo de investigación en el día 0 fueron similares a los observados por diversos autores (51,52) quiénes encontraron valores para este grupo microbiano entre 4.0 y 5.10 Log de ufc/g, en salchichas frescas de cerdo y vacuno respectivamente. De acuerdo a la bibliografía consultada, no se han encontrado trabajos de investigación en un periodo de conservación tan amplio y con condiciones de almacenamiento similares para salchichas frescas, menos aún en salchichas de cordero. Sin embargo, los recuentos de BAL obtenidos en este trabajo a los 35 días fueron ligeramente superiores a los encontrados por Argyr et al. (53), quiénes encontraron valores de 7.8 Log ufc/g a los 12,5 días de almacenamiento mantenido a 5°C en una atmósfera que contenía 40% CO<sub>2</sub> / 30% O<sub>2</sub> / 30% N en salchichas frescas de vacuno. Esta ligera diferencia podría deberse al menor tiempo de almacenamiento.

TRATAMIENTO REALIZADO	DÍA 0	DÍA 35
	MEDIA± DS (Log ufc/mL)	MEDIA±DS (Log ufc/mL)
<b>Control-1</b>	4,16 ± 0,05	8,67 ± 0,06
<b>Control-2</b>	4,15 ± 0,05	8,41 ± 0,01
<b>Control-3</b>	4,79 ± 0,07	8,87 ± 0,08
<b>LUPULO-1</b>	4,16 ± 0,05	8,47 ± 0,03
<b>LUPULO -2</b>	4,15 ± 0,05	8,67 ± 0,02
<b>LUPULO -3</b>	4,79± 0,07	8,78 ± 0,02
<b>ACEITE ESENCIAL-1</b>	4,16± 0,05	8,41 ± 0,03
<b>ACEITE ESENCIAL -2</b>	4,15 ± 0,05	8,55 ± 0,07
<b>ACEITE ESENCIAL -3</b>	4,79 ± 0,07	8,53 ± 0,01
<b>LUPULO+ACEITE ESENCIAL-1</b>	4,16 ± 0,05	8,35 ± 0,06
<b>LUPULO+ACEITE ESENCIAL 2</b>	4,15 ± 0,05	8,56 ± 0,03
<b>LUPULO+ACEITE ESENCIAL -3</b>	4,79 ± 0,07	8,74 ± 0,05

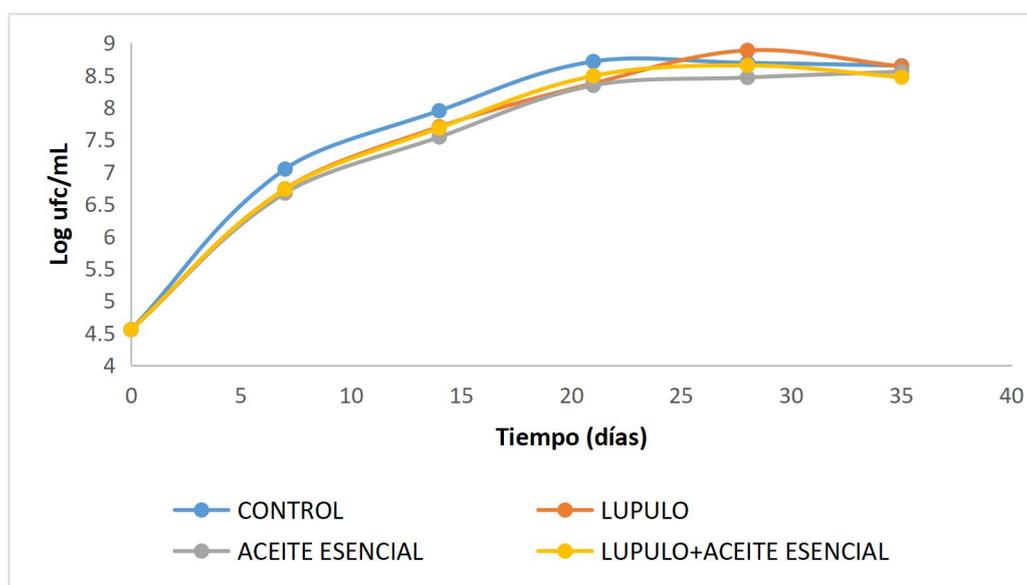
**Tabla 2.** Valores medios y desviación estándar de los recuentos de bacterias ácido lácticas (BAL) realizados en el día 0 y 35 en un producto cárnico fresco. Los recuentos se realizaron en todos los tratamientos: control, lúpulo, aceite esencial y una combinación de ambos (lúpulo + aceite esencial).

Respecto a los recuentos en el día 35, estos fueron realizados para cada uno de los tratamientos estudiados (control, lúpulo, aceite esencial y la combinación lúpulo+aceite esencial). Los recuentos de BAL más altos fueron encontrados en el



control 8,87 Log ufc/g, mientras que los más bajos fueron los obtenidos en el tratamiento que combinó el aceite esencial y el lúpulo (8,35 Log ufc/g). Si comparamos los resultados obtenidos entre los lotes de elaboración del producto cárnico, se observa que el lote 3 mostró los recuentos más altos tanto en el control como en los otros tratamientos. Georgantelis et al. (54) encontraron valores para este grupo microbiano de 8.02 Log ufc/g cuando estudiaron el efecto del aceite esencial de romero en salchichas frescas de cerdo, conservadas a 4°C en una película permeable al oxígeno de polietileno en 20 días, estos valores son similares a los observados en este trabajo.

En la Figura 7, se pueden observar los recuentos de BAL a través de los 35 días de almacenamiento a 4°C para los cuatro tratamientos; control, lúpulo, aceite esencial, y la combinación de lúpulo y aceite esencial. Los recuentos medios en el día 0 de BAL para todos los tratamientos fue de  $4,55 \pm 0,311$  Log ufc/g. Estos recuentos mostraron un incremento hasta el día 21 en todos los tratamientos alcanzándose valores de 8,71 Log ufc/g en el control. A partir del día 21 los recuentos de BAL mostraron una tendencia estable excepto para el tratamiento con lúpulo en el que se observó un incremento del recuento de BAL alcanzándose valores de 8,88 Log ufc/g. En el día 35 el control y el tratamiento con lúpulo alcanzaron los valores más altos de 8,64 Log ufc/g, mientras que en el tratamiento con lúpulo + aceite esencial mostró el valor más bajo de 8,47 Log ufc/g.



**Figura 7.** Recuentos de bacterias ácido lácticas de un embutido cárnico conservado a 4°C en una atmósfera modificada previamente tratado con antimicrobianos naturales: lúpulo, aceite esencial, y una combinación de ambos, así como, de un control sin antimicrobianos.



Como era de esperar los recuentos de BAL mostraron una tendencia ascendente durante el tiempo de conservación similar a la encontrado por otros autores (53). Sin embargo, estos resultados fueron contrarios a lo observado por Kamdem et al. (52), quienes obtuvieron una disminución a través del tiempo de BAL. Este hecho puede ser debido a que en este último trabajo de investigación se utilizaron diferentes combinaciones de aditivos y especias en salchichas frescas conservadas a 2°C, mientras en este estudio sólo se usó un antimicrobiano natural como tratamiento. Cuando comparamos los valores obtenidos del presente trabajo para el tratamiento con aceite esencial proveniente de *Zataria multiflora* con los encontrados por Georgantelis et al. (54) en salchichas de cerdo frescas tratadas con aceite de romero al día 20 de conservación, observamos que estos fueron muy similares 8,3 Log ufc/g y 8,02 Log ufc/g, respetivamente.

En las Tabla 3. se muestran los resultados del método utilizado para la identificación de las 49 colonias aisladas a partir de Agar MRS en el día 0, mediante Espectrometría de Masas MALDI TOF y con ayuda del programa Biotyper. Los datos reflejados en esta tabla corresponden a todos ensayos realizados con los distintos métodos de preparación de muestra para la identificación de las colonias aisladas. Por lo tanto, las colonias aisladas de una misma muestra fueron analizadas en diferentes días de trabajo.

Como se puede observar en la Tabla 3, el método de extracción directa extendido, que contenía 1 µL de ácido fórmico fue el que mostro el mayor porcentaje de bacterias no identificadas (20%), mientras que el método de extracción larga fue el método con menor número de bacterias sin identificar (19%). El número de aislamientos identificados fue ligeramente mayor con el método de extracción larga (56,56%) que con el método de transferencia directa extendido (43,44%). Por otro lado, sólo el 13% de las identificaciones obtenidas con el MALDI TOF utilizando el método de extracción transferencia directa extendido para la preparación tuvieron altas puntuaciones (*scores*) entre 2,000 y 2,999, mientras que el método de extracción larga alcanzo el 19%. Estas diferencias en los resultados observados entre los dos métodos pueden ser debido a dos causas principalmente. Una de ellas es el tipo de bacterias identificadas en esta investigación, las cuales fueron bacterias Gram positivas, que tienen una pared celular difícil de romper con la matriz. Este hecho pudo evitar la salida de las proteínas ribosomales que son las utilizadas para la identificación mediante MALDI TOF (46). Otra de ellas fue la baja concentración



microbiana alcanzada a las 24 horas de incubación por algunos de los aislamientos estudiados en este trabajo, no alcanzando el contenido bacteriano mínimo entre  $10^4$  y  $10^6$  requerido para el análisis (55). Como se puede ver en la Tabla 3, *Staphylococcus pasteurii*, *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus*, *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. fueron las especies que requirieron del uso del método extracción larga para que fueran identificadas adecuadamente o se incrementara la puntuación en la identificación. Este aspecto ha sido también observado por otros estudios con algunos microorganismos como bacterias Gram positivas, levaduras y mohos (46). Finalmente, los resultados del método de preparación de muestra de transferencia directa no han sido mostrados en la Tabla 3 debido a su baja eficiencia a la hora de la identificación de la microbiota aislada en Agar MRS. Contrario a lo obtenido en esta investigación, otros autores han reportado unos mejores porcentajes de identificación para *Lactobacillus* spp. con el método de transferencia directa, aunque no identificaron las especies encontradas en este trabajo (56).

Microorganismo	Método	Rango	Nº cepas	% s/total
<i>Identificación no relevante</i>	Transferencia directo extendido	0.00 - 1.699	32	20%
	Extracción larga	0.00 - 1.699	31	19%
<b><i>Identificación no relevante total</i></b>			<b>63</b>	<b>39%</b>
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Extracción larga	1.70 - 1.99	1	1%
		2.0 - 2.299	7	4%
		2.300 - 3.000	2	1%
	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	4	2%
		2.0 - 2.299	4	2%
	<b><i>Staphylococcus pasteurii total</i></b>			<b>18</b>
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	3	2%
		2.0 - 2.299	7	4%
		2.300 - 3.000	1	1%
	Extracción larga	2.300 - 3.000	3	2%
	<b><i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i> total</b>			<b>14</b>
<i>Lactobacillus sakei</i>	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	1	1%
		2.0 - 2.299	3	2%
	Extracción larga	1.70 - 1.99	2	1%



		2.0 - 2.299	1	1%
		2.300 - 3.000	1	1%
<b><i>Lactobacillus sakei total</i></b>			<b>8</b>	<b>5%</b>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Extracción larga	1.70 - 1.99	2	1%
		2.0 - 2.299	2	1%
	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	1	1%
		2.0 - 2.299	2	1%
<b><i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris total</i></b>			<b>7</b>	<b>4%</b>
<i>Serratia liquefaciens</i>	Extracción larga	1.70 - 1.99	1	1%
		2.0 - 2.299	2	1%
		2.300 - 3.000	2	1%
	Transferencia directo extendido	2.0 - 2.299	1	1%
<b><i>Serratia liquefaciens total</i></b>			<b>6</b>	<b>4%</b>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Extracción larga	1.70 - 1.99	2	1%
		2.0 - 2.299	2	1%
	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	2	1%
<b><i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides total</i></b>			<b>6</b>	<b>4%</b>
<i>Lactobacillus</i> spp.	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	3	2%
	Extracción larga	1.70 - 1.99	3	2%
<b><i>Lactobacillus</i> spp. total</b>			<b>6</b>	<b>4%</b>
<i>Aerococcus vidrians</i>	Extracción larga	1.70 - 1.99	4	2%
	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	1	1%
		2.0 - 2.299	1	1%
<b><i>Aerococcus vidrians total</i></b>			<b>6</b>	<b>4%</b>
<i>Enterobacter asburiae</i>	Extracción larga	1.70 - 1.99	4	2%
		2.0 - 2.299	1	1%
<b><i>Enterobacter asburiae total</i></b>			<b>5</b>	<b>3%</b>
<i>Lactococcus lactis</i> subs. <i>lactis</i>	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	3	2%
<b><i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis total</i></b>			<b>3</b>	<b>2%</b>
<i>Enterobacter cloacae</i>	Extracción larga	1.70 - 1.99	3	2%
<b><i>Enterobacter cloacae total</i></b>			<b>3</b>	<b>2%</b>
<i>Streptococcus salivarius</i>	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	1	1%



		2.0 - 2.299	1	1%
<b><i>Streptococcus salivarius total</i></b>			<b>2</b>	<b>1%</b>
<i>Staphylococcus warneri</i>	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	2	1%
<b><i>Staphylococcus warneri total</i></b>			<b>2</b>	<b>1%</b>
<i>Staphylococcus epidermitis</i>	Extracción larga	2.0 - 2.299	2	1%
<b><i>Staphylococcus epidermitis total</i></b>			<b>2</b>	<b>1%</b>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Extracción larga	1.70 - 1.99	1	1%
		2.0 - 2.299	1	1%
<b><i>Leuconostoc mesenteroides total</i></b>			<b>2</b>	<b>1%</b>
<i>Enterobacter amnigenus</i>	Extracción larga	1.70 - 1.99	2	1%
<b><i>Enterobacter amnigenus total</i></b>			<b>2</b>	<b>1%</b>
<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>	Transferencia directo extendido	2.0 - 2.299	1	1%
<b><i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus total</i></b>			<b>1</b>	<b>1%</b>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	Extracción larga	2.0 - 2.299	1	1%
<b><i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum total</i></b>			<b>1</b>	<b>1%</b>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Extracción larga	2.0 - 2.299	1	1%
<b><i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris total</i></b>			<b>1</b>	<b>1%</b>
<i>Lactococcus lactis</i>	Extracción larga	2.0 - 2.299	1	1%
<b><i>Lactococcus lactis total</i></b>			<b>1</b>	<b>1%</b>
<i>Lactococcus lactis</i>	Extracción larga	2.300 - 3.000	1	1%
<b><i>Lactococcus lactis total</i></b>			<b>1</b>	<b>1%</b>
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2.0 - 2.299	1	1%
<b><i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus total</i></b>			<b>1</b>	<b>1%</b>
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	Extracción larga	1.70 - 1.99	1	1%
<b><i>Enterobacter cancerogenus total</i></b>			<b>1</b>	<b>1%</b>
<b>Total general</b>			<b>162</b>	<b>100%</b>

**Tabla 3.** Métodos de preparación de muestras utilizados para la identificación de las colonias aisladas de Agar MRS usando la Espectrometría de Masas MALDI TOF y con ayuda del sistema Biotyper (Bruker Daltonik) al día 0 de muestras provenientes de un embutido cárnico fresco.



En la Tabla 4 se muestran los resultados del método utilizado para la identificación de las colonias obtenidas a partir de Agar MRS mediante Espectrometría de Masas MALDI TOF con ayuda del sistema Biotyper. El método de extracción directa extendido, que contenía 1  $\mu$ L de ácido fórmico fue el que mostro el mayor porcentaje de bacterias no identificadas (44,57%), mientras que el método de extracción larga fue el método con menor número de bacterias sin identificar (5,43%). El método de transferencia directa extendido fue el que mayor número aislamientos identificados con un 66,3%. Sin embargo, el método de preparación de muestra que mostró mayor porcentaje y puntuación (*scores* >2,000) en la identificación de *Lactobacillus* spp. fue el método de extracción larga con un 16%. Puesto que son bacterias microaerófilas, algunas especies de *Lactobacillus* spp. presentaron un menor crecimiento (en condiciones aeróbias). La baja concentración de estos microorganismos ha requerido el uso del método de extracción larga para eliminar la presencia de compuestos que puedan interferir en su identificación mediante Espectrometría de Masas MALDI TOF.



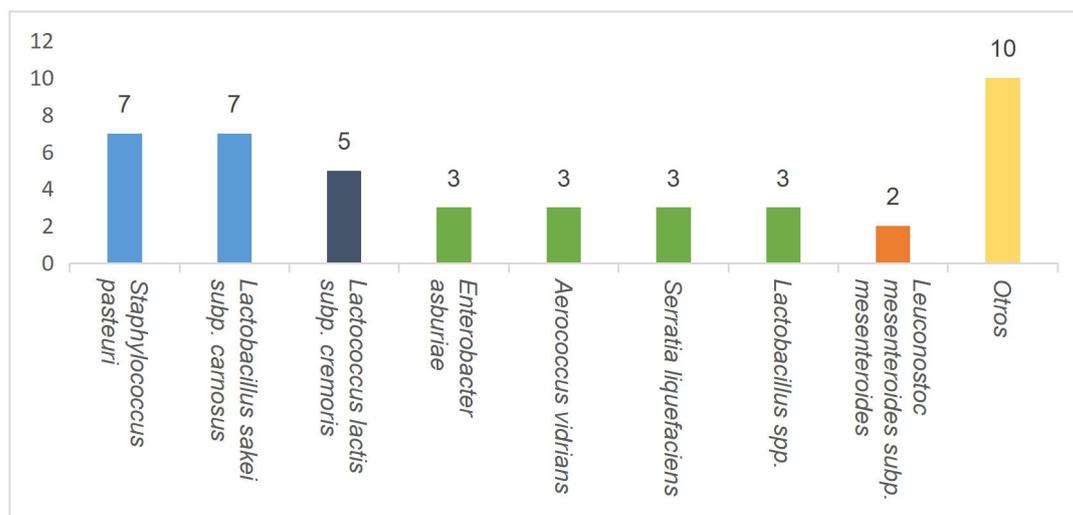
Microorganismo	Método	Rango	Nº cepas	% s/total
No identificadas	Transferencia directo extendido	0.00 - 1.699	82	44,57%
	Extracción larga	0.00 - 1.699	10	5,43%
<b>Total Identificación no relevante</b>			<b>92</b>	<b>50,00%</b>
<i>Lactobacillus sakei</i>	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	15	8,15%
		2.0 - 2.299	4	2,17%
		2.300 - 3.000	3	1,63%
	Extracción larga	2.0 - 2.299	1	0,54%
		2.300 - 3.000	13	7,10%
<b>Total <i>Lactobacillus sakei</i></b>			<b>38</b>	<b>19,6%</b>
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	13	7,07%
		2.0 - 2.299	12	6,52%
		2.300 - 3.00	5	2,72%
	Extracción larga	2.0 - 2.299	1	0,54%
		2.300 - 3.00	3	1,63%
<b>Total <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i></b>			<b>34</b>	<b>18,48%</b>
<i>Lactobacillus</i> spp.	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	3	1,63%
	Extracción larga	1.70 - 1.99	11	5,98%
<b>Total <i>Lactobacillus</i> spp.</b>			<b>14</b>	<b>7,61%</b>
<i>Filifactor villosum</i>	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	3	1,63%
<b>Total <i>Filifactor villosum</i></b>			<b>3</b>	<b>1,63%</b>
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	Extracción larga	1.70 - 1.99	1	0,54%
		2.0 - 2.299	1	0,54%
<b>Total <i>Carnobacterium maltaromaticum</i></b>			<b>2</b>	<b>1,09%</b>
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	1	0,54%
<b>Total <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i></b>			<b>1</b>	<b>0,54%</b>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	1	0,54%
<b>Total <i>Lactobacillus curvatus</i></b>			<b>1</b>	<b>0,54%</b>
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	Transferencia directo extendido	1.70 - 1.99	1	0,54%
<b>Total <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i></b>			<b>1</b>	<b>0,54%</b>
<b>Total general</b>			<b>184</b>	<b>100,00 %</b>

**Tabla 4.** Métodos de preparación de muestra utilizados para la identificación de los aislamientos obtenidos a partir de Agar MRS al día 35, mediante Espectrometría de Masas MALDI TOF y con ayuda del sistema Biotyper (Bruker Daltonik) con las muestras de bacterias ácido lácticas a día 35 del experimento obtenidas a partir de un embutido cárnico fresco.

En la Figura 8 se muestran los resultados elaborados a partir de la mejor identificación, correspondiente al rango más elevado obtenido, de las 49 cepas aisladas a partir de un embutido cárnico fresco a día 0 del ensayo. Como podemos observar las principales especies microbianas aisladas de Agar MRS en el día cero fueron; *Staphylococcus pasteurii* y *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus* alcanzando un 26% de las bacterias identificadas, seguidas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* con un 9%. Otras especies identificadas en el día 0 fueron; *Staphylococcus warneri*,



*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Staphylococcus epidermitis*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Streptococcus salivarius*. La presencia de los géneros de *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., en salchichas frescas de cerdo durante los primeros días de conservación ha sido también demostrada encontrada por Cocolin et al., (51). Así mismo, Zagorec et al. (57), indica que las principales especies responsables de la alteración de productos son *Lactobacillus* spp., así como, *Lactococcus* spp. *Leuconostoc* spp. Estos microorganismos son los responsables de diversos defectos en el aroma y olor.

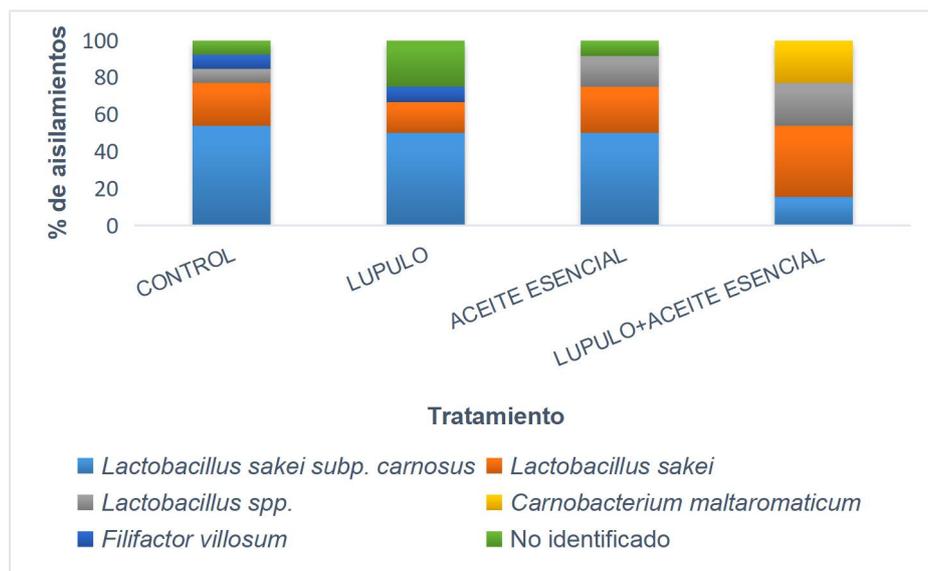


**Figura 8.** Principales especies microbianas identificadas por Espectrometría de Masas MALDI TOF mediante el sistema Biotyper, aisladas a partir de Agar MRS de muestras al día 0, teniendo en consideración los mejores resultados obtenidos en la identificación.

La Figura 9. se ha realizado con los datos de la mejor identificación microbiana obtenida para cada cepa. Los resultados de las identificaciones microbianas se presentan organizados para cada uno de los tratamientos realizados: lúpulo, aceite esencial y una combinación de ambos (lúpulo + aceite esencial), así como, para el control sin antimicrobianos. Como se puede observar en la Figura 9, *Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus* fue el microorganismo más abundante de la población microbiana estudiada (55 aislamientos), seguido por *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus* spp. en orden descendiente. Con una representación discreta sobre el total de aislamientos, también fueron identificadas las especies microbianas: *Carnobacterium maltaromaticum*, *Fillifactor villosum* y *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei*. *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus* spp., así como, *Carnobacterium maltaromaticum*, han sido identificadas como especies alterantes aisladas a partir de



productos frescos mantenidos en atmósferas modificadas (30,58). Con respecto a las especies predominantes por tratamiento, *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus* fue el microorganismo mayoritario en todos los tratamientos con excepción del tratamiento con lúpulo + aceite esencial cuyo microorganismo mayoritario fue *Lactobacillus sakei*. Diversos autores han encontrado que *Lactobacillus sakei* es uno de los microorganismos alterantes más importantes en los productos cárnicos (29,30,51). Así mismo, el cambio observado en la microbiota presente en este embutido cárnico asemeja estar relacionado con el tipo de antimicrobiano utilizado en el tratamiento. Parece ser que el lúpulo inhibe el crecimiento especialmente de *Lactobacillus sakei*, mientras que el lúpulo combinado con el aceite esencial inhibe a *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus*. Jayasena et al., (28), encontraron que el aceite esencial muestra una alta actividad antimicrobiana contra *Lactobacillus sakei* y *Serratia liquefaciens*. La diferencia entre este trabajo de investigación y el mencionado anteriormente puede deberse a la falta de identificación de las subespecies.

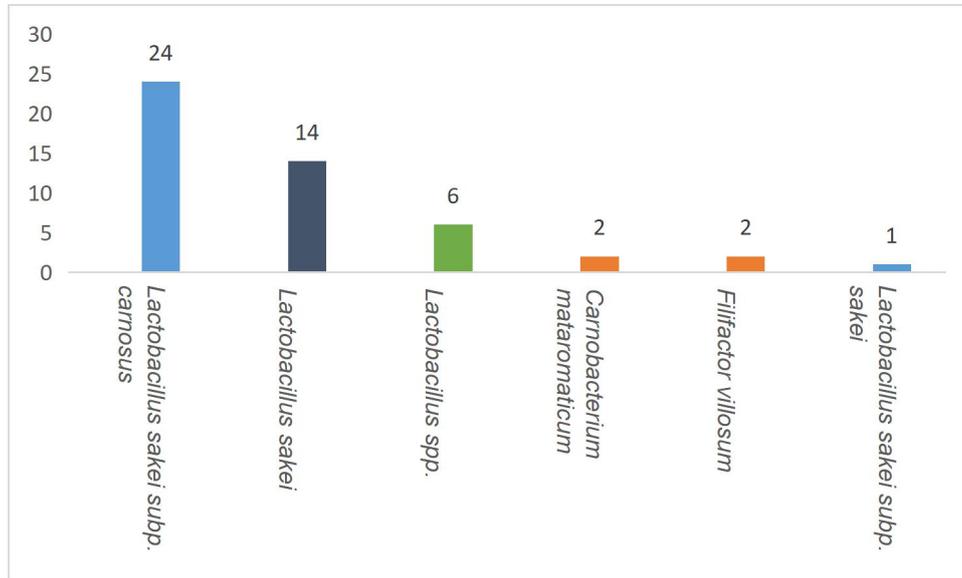


**Figura 9.** Porcentajes de las principales especies microbianas identificadas por Espectrometría de Masas MALDI TOF con ayuda del programa Biotyper, aisladas a partir de Agar MRS en el día 35, según el tipo de tratamiento.

En referencia al resto de microorganismos citados, los resultados muestran un diferente crecimiento en función del tratamiento. *Filifactor villosus* sólo ha sido identificado en los aislamientos del control y aquellos previamente tratados con lúpulo. Con respecto a *Carnobacterium maltaromaticum*, su presencia se corresponde únicamente con los aislamientos tratados con lúpulo + aceite esencial. La presencia de *Carnobacterium maltaromaticum* en el día 35 puede deberse por un lado, a la



inhibición de *Lactobacillus sakei* creando condiciones favorables para su crecimiento y, por otro lado, a la baja presencia de oxígeno, condición que favorece el crecimiento el *Carnobacterium* spp. (59).



**Figura 10.** Distribución de las especies identificadas a los 35 días de almacenamiento.

En la Figura 10 se muestran las principales especies identificadas a los 35 días de almacenamiento. Como podemos observar, las especies de *Lactobacillus* spp. son las mayoritarias (45/49). Entre ellas la más importante ha sido *Lactobacillus sakei* subsp. *carnosus*.

A través de la identificación de las colonias de bacterias ácido lácticas se observó un crecimiento bacteriano lento tanto en caldo como en agar formando colonias muy pequeñas cuando se sembraron en Agar MRS. En consecuencia, estas muestras aportaron poco material biológico para su identificación mediante Espectrometría de Masas MALDI TOF. Por otro lado, muchas de las cepas presentaron un tacto gelatinoso que dificultaba su extensión en la placa de MALDI explicado posiblemente por la generación de exopolisacáridos (60).



## 5. CONCLUSIÓN.

Los datos obtenidos permiten concluir que el uso de Espectrometría de Masas MALDI TOF como herramienta de identificación microbiana, es una solución rápida y efectiva para la identificación de bacterias procedentes de productos cárnicos. Sin embargo, el uso del método de transferencia directa extendido en la preparación de la muestra presentó algunas limitaciones que fueron superadas por el método de extracción larga. Por ello, se propone en primera instancia el uso de método de transferencia directa extendido y sólo en caso de baja puntuación (*score*) aplicar el método de extracción larga. Los resultados del presente estudio muestran un cambio en la población de bacterias ácido lácticas procedentes de una salchicha fresca mantenida en condiciones de anaerobiosis: inicialmente, la flora bacteriana se encontraba compuesta por una microbiota más heterogénea formada por *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus sakei* spp., *Lactococcus* spp., *Serratia* spp. y *Leuconostoc* spp. Al final del experimento (día 35) la microbiota estuvo representada principalmente por *Lactobacillus sakei* spp. Tomando en cuenta todos los resultados, el tratamiento con aceite esencial parece ser el que mostró mayor actividad antimicrobiana para las bacterias ácido lácticas. La combinación de lúpulo y aceite esencial fue la que mostró un mayor cambio en la población microbiana en el día 35.

Una evaluación de las propiedades sensoriales sería requerida para conocer la aceptación de los productos tratados con estos antimicrobianos naturales. Finalmente, se puede prever que en un futuro la Espectrometría de Masas MALDI TOF sea una de las herramientas más utilizadas para el estudio de la microbiología de los alimentos, permitiendo conocer los cambios de la microbiota en los derivados cárnicos con el uso de nuevos antimicrobianos.



## 6. BIBLIOGRAFÍA.

1. Font-i-Furnols M, Guerrero L. Consumer preference, behavior and perception about meat and meat products: An overview. *Meat Sci* [Internet]. 2014;98(3):361–71. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.025>
2. Basulto AJ, Manera M, Baladia E, Miserachs M, Pérez R, Ferrando C. Definición y características de una alimentación saludable [Internet]. 2013. Disponible en: [http://fedn.es/docs/grep/docs/alimentacion\\_saludable.pdf](http://fedn.es/docs/grep/docs/alimentacion_saludable.pdf)
3. Biesalski HK. Meat as a component of a healthy diet - Are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet?. *Meat Sci* [Internet]. 2005;70(3 SPEC. ISS.):509–24. Disponible en: [doi:10.1016/j.meatsci.2004.07.017](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.017)
4. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C. Tabla de composición de los alimentos. Vol 1. 18ª ed. Madrid: Pirámide; 2016.
5. Pereira PM de CC, Vicente AF dos RB. Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Sci* [Internet]. 2013;93(3):586–92. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.018>
6. Williams P. Nutritional composition of red meat. *Nutr Diet* [Internet]. 2007;64(SUPPL.4):5–7. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1747-0080.2007.00197.x>
7. María SA, Graffe M, Isabel M, Aznar M, Alberto L. La carne en la alimentación española: importancia de la carne de cordero. *Nutr. clín. diet. Hosp* [Internet]. 2010;30(3):42–8. Disponible en: [http://revista.nutricion.org/PDF/Carne\\_alimentacion\\_española.pdf](http://revista.nutricion.org/PDF/Carne_alimentacion_española.pdf)
8. Wyness L. The role of red meat in the diet: nutrition and health benefits. *Proc Nutr Soc* [Internet]. 2016;75(3):227–32. Disponible en: <https://doi.org/10.1017/S0029665115004267>
9. Bodwell CE, Anderson BA. Nutritional Composition and Value of Meat and Meat Products [Internet]. En: Bechtel PJ. *Muscle As Food*. ACADEMIC PRESS, INC.; 2013. 321–369 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-084190-5.50013-8>



10. Jiménez-Colmenero F, Carballo J, Cofrades S. Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Sci* [Internet]. 2001;59(1):5–13. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22062500>
11. Parlamento Europeo y Consejo de la UE. Reglamento (CE) nº 1333/2008 sobre aditivos alimentarios. *DOUE* [Internet]. 2008;16–33. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX:32008R1333&qid=1490706835383>
12. Ministerio de la Presidencia. Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos. *BOE* [Internet] 2014;147:46058–78. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2014/06/18/pdfs/BOE-A-2014-6435.pdf>
13. IARC; OMS. Monografías de la IARC evalúan el consumo de la carne roja y de la carne procesada. *OMS* [Internet]. 2015;(26 de octubre de 2015):2. Disponible en: [https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240\\_S.pdf](https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2015/pdfs/pr240_S.pdf)
14. OMS. Carcinogenicidad del consumo de carne roja y de carne procesada. Documento de preguntas y respuestas. *OMS* [Internet]. 2015. Disponible en: <https://www.who.int/features/qa/cancer-red-meat/es/>
15. Sugimura T, Wakabayashi K, Nakagama H, Nagao M. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci* [Internet]. 2004;95(4):290. Disponible en: doi:10.1111/j.1349-7006.2004.tb03205.x
16. Sindelar JJ, Milkowski AL. A Review of Curing and Examining the Risk / Benefit of Its Use. *AMSA* [Internet]. 2011;3:1–14. Disponible en: <http://www.meatscience.org/SodiumNitriteReview.aspx>
17. Bedale W, Sindelar JJ, Milkowski AL. Dietary nitrate and nitrite: Benefits, risks, and evolving perceptions. *Meat Sci* [Internet]. 2016;120:85–92. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.009>
18. Corpet DE. Red meat and colon cancer: Should we become vegetarians, or can we make meat safer? *Meat Sci* [Internet]. 2011;89(3):310–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.009>



19. De Smet S, Vossen E. Meat: The balance between nutrition and health. A review. *Meat Sci* [Internet]. 2016;120:145–56. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.008>
20. ENIDE. Encuesta nacional de ingesta dietética [Internet]. 2011. Disponible en: <http://www.msssi.gob.es/novedades/docs/PresentacionENIDE010311.pdf>
21. FESNAD. La FESNAD recomienda mantener las pautas de salud pública en cuanto al consumo de carnes rojas y procesadas. FESNAD [Internet]. 2015. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/noticias/2015/Comunicado\\_FESNAD.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/noticias/2015/Comunicado_FESNAD.pdf)
22. SEEN. Posicionamiento de la SEEN ante la noticia de la OMS que relaciona el consumo de carne procesada con el cáncer. SEEN [Internet]. 2015. Disponible en: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/noticias/2015/Np\\_carne\\_procesada.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/noticias/2015/Np_carne_procesada.pdf)
23. Gevaart-Durkin A, de Peyster A. High Temperature Cooked Meats. En: Wexler P. *Encyclopedia of Toxicology* [Internet]: 3ª Ed. Vol. 2. Elsevier; 2014. 912–915 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01155-6>
24. MAPAMA. Informe del Consumo de Alimentación en España 2017. Disponible en [https://www.mapa.gob.es/images/es/informeanualdeconsumoalimentario2017\\_tcm30-456186.pdf](https://www.mapa.gob.es/images/es/informeanualdeconsumoalimentario2017_tcm30-456186.pdf)
25. FAO. Perspectivas alimentarias: resúmenes de mercado. 2018. Disponible en: <http://www.fao.org/3/CA0910ES/ca0910es.pdf>
26. Villalobos-Delgado LH, Mateo J, Caro I, Leal Ramos M-Y, Mendez NG, et al. Natural Antioxidants in Fresh and Processed Meat. En: Galanakis CM. *Sustainable Meat Production and Processing* [Internet]. Academic Press; 2019. 207–236 p. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814874-7.00011-0>
27. Doulgeraki AI, Ercolini D, Villani F, Nychas GJE. Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2012;157(2):130–41. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020>



28. Jayasena DD, Jo C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2013;34(2):96–108. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2013.09.002>
29. Borovic B, Velebit B, Moracanin SV, Lakicevic B, Baltic T. Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria in Levačka Sausage. *Procedia Food Sci* [Internet]. 2015;5:14–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.004>
30. Borch E, Kant-Muermans ML, Blixt Y. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 1996;33(1):103–20. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8913812>
31. Pisoschi AM, Pop A, Georgescu C, Turcuş V, Olah NK, Mathe E. An overview of natural antimicrobials role in food. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2018;143:922–35. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>
32. Sindelar JJ, Milkowski AL. A Review of Curing and Examining the Risk / Benefit of Its Use. *Am Meat Sci Assoc* [Internet]. 2011;3:1–14. Disponible en: <http://www.meatscience.org/SodiumNitriteReview.aspx>
33. Majou D, Christieans S. Mechanisms of the bactericidal effects of nitrate and nitrite in cured meats. *Meat Sci* [Internet]. 2018;145:273–84. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.013>
34. Alexander DD, Cushing CA. Red meat and colorectal cancer: A critical summary of prospective epidemiologic studies. *Obes Rev* [Internet]. 2011;12(501):472–93. Disponible en: [doi:10.1111/j.1467-789X.2010.00785.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2010.00785.x)
35. Mortensen A, Aguilar F, Crebelli R, Di Domenico A, Dusemund B, Frutos MJ, et al. Re-evaluation of sodium nitrate (E 251) and potassium nitrate (E 252) as food additives. *EFSA J* [Internet]. 2017;15(6):1–123. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2017.4787>
36. EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on a request from the Commission related to the effects of Nitrites/Nitrates on the Microbiological Safety of Meat Products. *EFSA J* [Internet]. 2003;14, 1-34. Disponible en: [http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific\\_output/files/main\\_documents/opinion\\_biohaz\\_04\\_en1,2.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/opinion_biohaz_04_en1,2.pdf)



37. Pateiro M, Barba FJ, Domínguez R, Sant'Ana AS, Mousavi Khaneghah A, Gavahian M, et al. Essential oils as natural additives to prevent oxidation reactions in meat and meat products: A review. *Food Res Int* [Internet]. 2018;113:156–66. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.014>
38. Jayasena DD, Jo C. Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2013;34(2):96–108. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2013.09.002>
39. Castro-Rosas J, Ferreira-Grosso CR, Gómez-Aldapa CA, Rangel-Vargas E, Rodríguez-Marín ML, Guzmán-Ortiz FA, et al. Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food - A review. *Food Res Int* [Internet]. 2017;102(May):575–87. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.054>
40. Nikmaram N, Budaraju S, Barba FJ, Lorenzo JM, Cox RB, Mallikarjunan K, et al. Application of plant extracts to improve the shelf-life, nutritional and health-related properties of ready-to-eat meat products. *Meat Sci* [Internet]. 2018;145(May):245–55. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.031>
41. Woraprayote W, Malila Y, Sorapukdee S, Swetwivathana A, Benjakul S, Visessanguan W. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Sci* [Internet]. 2016;120:118–32. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.004>
42. Pisoschi AM, Pop A, Georgescu C, Turcuş V, Olah NK, Mathe E. An overview of natural antimicrobials role in food. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2018;143:922–35. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.095>
43. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [Internet]. 2011; 29: 601–608 p. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>
44. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, et al. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem* [Internet]. 2011;44(1):104–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017>



45. Allende F, Legarraga P. Identificación Bacteriana Basada En El Espectro De Masas de Proteínas: Una Nueva Mirada a La Microbiología Del Siglo XXI. *Rev Chilena Intercol* [Internet]. 2012;29(3):263–72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182012000300003>
46. Bourassa L, Butler-Wu SM. MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. En: Sails A, Tang YW. *Methods in Microbiology* [Internet]. 1ª ed. Vol. 42. Elsevier Ltd.; 2015. 37–85 p. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mim.2015.07.003>
47. Hou TY, Chiang-Ni C, Teng SH. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J Food Drug Anal* [Internet]. 2019;27(2):404–14. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.001>
48. Antony Croxatto, Guy Prod'hom, Gilbert Greub. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS* [Internet]. 2012;36(2):380–407. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298>
49. Bruker Daltonik. MALDI Biotyper® Protocol Guide. 2015.
50. Bruker Daltonik. MALDI Biotyper 3.1 User Manual. 2012.
51. Cocolin L, Rantsiou K, Iacumin L, Urso R, Cantoni C, Comi G. Study of the Ecology of Fresh Sausages and Characterization of Populations of Lactic Acid Bacteria by Molecular Methods. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2004;70(4):1883–94. Disponible en: [doi:10.1128/AEM.70.4.1883–1894.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1883-1894.2004).
52. Kamdem SS, Patrignani F, Elisabetta Guerzoni M. Shelf-life and safety characteristics of Italian Toscana traditional fresh sausage (Salsiccia) combining two commercial ready-to-use additives and spices. *Food Control* [Internet]. 2007;18(5):421–9. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.11.013>
53. Argyri AA, Mallouchos A, Panagou EZ, Nychas GJE. The dynamics of the HS/SPME-GC/MS as a tool to assess the spoilage of minced beef stored under different packaging and temperature conditions. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2015;193:51–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.020>
54. Georgantelis D, Ambrosiadis I, Katikou P, Blekas G, Georgakis SA. Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on microbiological parameters and lipid



oxidation of fresh pork sausages stored at 4 °C. *Meat Sci* [Internet]. 2007;76(1):172–81. Disponible en: doi:10.1016/j.meatsci.2006.10.026

55. Wisser A, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics - Identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2011;93(3): 65-73. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3783-4>

56. Dec M, Urban-Chmiel R, Gnat S, Puchalski A, Wernicki A. Identification of *Lactobacillus* strains of goose origin using MALDI-TOF mass spectrometry and 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. *Res Microbiol* [Internet]. 2014;165(3):190–201. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2014.02.003>

57. Zagorec M, Champomier-Vergès M-C. *Meat Microbiology and Spoilage*. *Lawrie's Meat Science*. Elsevier; 2017. p. 187–203.

58. Sirangelo TM. New Approaches to Study Fresh Pork Sausage Microbiota. *Int J Res Stud Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2018;4(2):1–5. Disponible en: DOI: <http://dx.doi.org/10.20431/2454-9428.0402001>

59. Zhang P, Badoni M, Gänzle M, Yang X. Growth of *Carnobacterium* spp. isolated from chilled vacuum-packaged meat under relevant acidic conditions. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2018;286(enero):120–7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.032>

60. Hilbig J, Loeffler M, Herrmann K, Weiss J. Application of exopolysaccharide-forming lactic acid bacteria in cooked ham model systems. *Food Res Int* [Internet]. 2019;119:761–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.058>



## 7. ANEXOS.

Cepa	Microorganismo	Método	Valor rango
102	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Extracción larga	2,198
103	<i>Streptococcus salivarius</i>	Transferencia directo extendido	2,128
104	<i>Aerococcus vidrians</i>	Transferencia directo extendido	2,092
105	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Extracción larga	2,193
106	<i>Serratia liquefaciens</i>	Extracción larga	2,344
107	<i>Aerococcus vidrians</i>	Extracción larga	1,841
108	<i>Aerococcus vidrians</i>	Transferencia directo extendido	1,703
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subp. <i>mesenteroides</i>	Extracción larga	2,109
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subp. <i>dextranicum</i>	Transferencia directo extendido	2,014
109	<i>Aerococcus vidrians</i>	Transferencia directo extendido	1,794
111	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Extracción larga	2,173
112	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Extracción larga	2,171
113	Identificación no relevante	Transferencia directo extendido	1,586
114	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Extracción larga	2,362
115	<i>Staphylococcus warneri</i>	Transferencia directo extendido	1,811
116	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Extracción larga	2,298
117	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Transferencia directo extendido	2,016
118	<i>Enterobacter asburiae</i>	Extracción larga	1,865
120	Identificación no relevante	Transferencia directo extendido	1,686
121	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	Extracción larga	1,944
122	<i>Enterobacter asburiae</i>	Extracción larga	2,01
123	<i>Lactobacillus</i> spp.	Transferencia directo extendido	1,823
124	<i>Serratia liquefaciens</i>	Extracción larga	2,433
126	<i>Lactobacillus sakei</i> subp. <i>carneus</i>	Extracción larga	2,364
	<i>Serratia liquefaciens</i>	Extracción larga	2,179
127	<i>Lactobacillus</i> spp.	Transferencia directo extendido	1,947
128	<i>Enterobacter asburiae</i>	Extracción larga	1,818
129	Identificación no relevante	Extracción larga	1,655
130	Identificación no relevante	Transferencia directo extendido	1,462
131	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Extracción larga	2,11
132	<i>Lactobacillus</i> spp.	Extracción larga	1,787
133	Identificación no relevante	Transferencia directo extendido	1,635
133B	Identificación no relevante	Transferencia directo extendido	1,575
134	<i>Staphylococcus hominis</i> subp. <i>novobiosepticus</i>	Transferencia directo extendido	2,171
135	<i>Lactobacillus sakei</i> subp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,218
137	<i>Lactobacillus sakei</i> subp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,309
138	<i>Lactococcus lactis</i> subp. <i>cremoris</i>	Transferencia directo extendido	2,078
139	<i>Lactococcus lactis</i> subp. <i>cremoris</i>	Extracción larga	2,242
	<i>Lactococcus lactis</i> subp. <i>lactis</i>	Transferencia directo extendido	1,711
140	<i>Staphylococcus epidermitis</i>	Extracción larga	2,139
141 A	<i>Lactobacillus sakei</i> ssp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,267
141 B	<i>Lactobacillus sakei</i> subp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,12
142	<i>Lactococcus lactis</i> subp. <i>cremoris</i>	Extracción larga	2,097
143	<i>Lactococcus lactis</i>	Extracción larga	2,308
	<i>Lactococcus lactis</i> subp. <i>cremoris</i>	Extracción larga	1,914
144	<i>Lactococcus lactis</i> subp. <i>cremoris</i>	Extracción larga	2,282
145	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subp. <i>mesenteroides</i>	Transferencia directo extendido	1,977
146	<i>Lactobacillus sakei</i>	Transferencia directo extendido	1,989



147	<i>Lactobacillus sakei</i>	Extracción larga	2,392
148	Identificación no relevante	Transferencia directo extendido	1,629
148B	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,074
149	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Extracción larga	2,419
150	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,172
150B	Identificación no relevante	Transferencia directo extendido	1,592

**Anexo 1.** Resultados de la identificación por Espectrometría de Masas MALDI TOF mediante el sistema Biotyper, de las muestras al día 0 aisladas a partir de Agar MRS, teniendo en consideración los mejores resultados obtenidos para cada cepa.

Cepa	Microorganismo	Método	Valor del rango
601	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,337
602	Identificación no relevante	Transferencia directo extendido	1,601
603	<i>lactobacillus</i> spp.	Extracción larga	1,718
604	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Extracción larga	2,525
605	<i>Filifactor villosus</i>	Transferencia directo extendido	1,738
605 B	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	1,941
606	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,183
607	<i>Lactobacillus sakei</i>	Transferencia directo extendido	2,334
608	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,206
609	<i>Lactobacillus sakei</i> spp. <i>sakei</i>	Transferencia directo extendido	1,735
609B	<i>Lactobacillus sakei</i>	Transferencia directo extendido	2,016
610	<i>Lactobacillus sakei</i> ssp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	1,829
611	<i>Lactobacillus sakei</i>	Transferencia directo extendido	1,889
612	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,22
613	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,231
614	Identificación no relevante	Transferencia directo extendido	1,62
615	<i>Lactobacillus sakei</i>	Transferencia directo extendido	1,954
615A	<i>Lactobacillus sakei</i>	Transferencia directo extendido	2,457
615B	Identificación no relevante	Transferencia directo extendido	1,524
616	<i>Filifactor villosus</i>	Transferencia directo extendido	1,752
617	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	1,715
618	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Extracción larga	2,555
619	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,276
619 B	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,221
620	Identificación no relevante	Transferencia directo extendido	1,465
621	<i>Lactobacillus sakei</i>	Transferencia directo extendido	2,3
621 A	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	1,829
621B	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,302
622	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,24
623	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,307
624	Identificación no relevante	Transferencia directo extendido	1,533
625	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,332
626	Identificación no relevante	Transferencia directo extendido	1,523
627	<i>Lactobacillus</i> spp.	Extracción larga	1,835
628	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	1,973
629	<i>Lactobacillus</i> spp.	Transferencia directo extendido	1,822



630	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,027
631	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Extracción larga	2,365
633	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,168
633 B	<i>Lactobacillus sakei</i>	Transferencia directo extendido	1,845
634	<i>Lactobacillus sakei</i>	Transferencia directo extendido	1,767
635	<i>Lactobacillus sakei</i>	Extracción larga	2,483
636	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	1,825
637	<i>lactobacillus</i> spp.	Extracción larga	1,756
638	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,391
639	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	Extracción directa	1,7
640	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	Extracción directa	2,007
641	<i>Lactobacillus sakei</i>	Transferencia directo extendido	2,188
642	<i>Lactobacillus sakei</i>	Extracción directa	2,383
643	<i>Lactobacillus</i> spp.	Extracción directa	1,835
644	<i>Lactobacillus</i> spp.	Extracción directa	1,797
645	<i>Lactobacillus sakei</i>	Extracción directa	2,407
646	<i>Lactobacillus sakei</i>	Transferencia directo extendido	1,969
647	<i>Lactobacillus sakei</i>	Extracción directa	2,408
648	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	Transferencia directo extendido	2,009

**Anexo 2.** Resultados de la identificación por Espectrometría de Masas MALDI TOF mediante el sistema Biotyper, de las muestras al día 35 aisladas a partir de Agar MRS, teniendo en consideración los mejores resultados obtenidos para cada cepa.