



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“ESTUDIO DE VIDA COMERCIAL Y EFECTO LETAL DE LA TÉCNICA DE  
COCCIÓN *SOUS-VIDE* SOBRE LA MICROBIOTA HABITUAL Y *Listeria*  
*monocytogenes* INOCULADA EN CARNE DE CERDO”

PAULA CAROLINA PEIRANO HERNÁNDEZ

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina Preventiva Animal

PROFESORA GUÍA: DRA. PILAR OVIEDO HANNIG

SANTIAGO, CHILE

2012



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



“ESTUDIO DE VIDA COMERCIAL Y EFECTO LETAL DE LA TÉCNICA DE  
COCCIÓN *SOUS-VIDE* SOBRE LA MICROBIOTA HABITUAL Y *Listeria*  
*monocytogenes* INOCULADA EN CARNE DE CERDO”

PAULA CAROLINA PEIRANO HERNÁNDEZ

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina Preventiva Animal

NOTA FINAL: \_\_\_\_\_

	NOTA	FIRMA
PROFESORA GUÍA: DRA. PILAR OVIEDO H.	_____	_____
PROFESORA CONSEJERA: DRA. ANITA SOTO C.	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO: DR. GUILLERMO FIGUEROA G.	_____	_____

SANTIAGO, CHILE  
2012

Esta memoria de título forma parte del proyecto “Estudio de vida comercial y efecto de la letalidad de la técnica de cocción *sous-vide*”, financiado y realizado por la Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quisiera agradecer a la Dra. Manuela Hernández, docente del Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona, por darme la oportunidad de realizar mi memoria de título junto a ella. Muchas gracias por su paciencia, ayuda y por toda la experiencia que gané durante los meses que estuve en Barcelona. Gracias también al Dr. Artur X. Roig, al CERPTA (Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments) y a Rational S.A., por su ayuda y por brindar las instalaciones y equipos necesarios para la realización del estudio.

Quiero también agradecer a la Dra. Pilar Oviedo, quien amablemente aceptó ser mi profesora guía, a pesar de no haber realizado el estudio junto a ella. Gracias por su disposición y consejos.

Al mismo tiempo quisiera agradecer de forma muy especial a Montserrat Vila y Sasha Rivera. Chicas sin ustedes nada hubiera salido bien, gracias por la paciencia, la ayuda y sobre todo por su amistad.

A mi familia, especialmente a mi madre y abuelos, por el apoyo durante todos estos largos años de estudio, gracias por comprender mis tiempos y esperar conmigo que llegara este momento.

Finalmente gracias a Sergio por ayudarme a realizar lo que en un principio parecía algo imposible. Gracias por guiarme, gracias por la compañía, el apoyo y el cariño... sin ti no lo hubiese logrado.

**MOLTES GRÀCIES A TOTHOM!**

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	iii
<b>2. ABSTRACT</b> .....	iv
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	2
4.1. Cocinado <i>sous-vide</i> .....	2
4.1.1. Origen.....	2
4.1.2. Tecnología empleada .....	2
i. Envasado.....	4
ii. Cocinado.....	5
iii. Enfriamiento rápido .....	7
iv. Almacenamiento .....	8
v. Regeneración del producto .....	9
4.2. Ventajas del cocinado <i>sous-vide</i> .....	10
4.3. Desventajas del cocinado <i>sous-vide</i> .....	11
4.4. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	12
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	17
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	17
6.1. Objetivo general.....	17
6.2. Objetivos específicos .....	17
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	18
7.1. Cepas y preparación del inóculo .....	18
7.2. Preparación de las muestras y diseño del esquema experimental .....	19
7.3. Inoculación de las muestras.....	20
7.4. Envasado y almacenamiento inicial de las muestras .....	20
7.5. Cocción al vacío y almacenamiento final de las muestras.....	20
7.6. Análisis microbiológico de las muestras inoculadas .....	21
7.7. Análisis microbiológico de las muestras control .....	22
7.8. Modelización del crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> y microorganismos aerobios mesófilos.....	23

7.9. Análisis estadístico .....	23
<b>8. RESULTADOS</b> .....	24
8.1. Registros del proceso de cocción .....	24
8.2. Efecto del tratamiento térmico y evolución de microorganismos aerobios mesófilos en las muestras control durante su conservación en refrigeración .....	25
8.3. Efecto del tratamiento térmico en <i>Listeria monocytogenes</i> en las muestras inoculadas durante su conservación en refrigeración .....	27
8.4. Evolución de <i>Listeria monocytogenes</i> en las muestras inoculadas durante su conservación en refrigeración.....	29
8.4.1. <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A.....	29
8.4.2. <i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4031.....	32
<b>9. DISCUSIÓN</b> .....	35
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	40
<b>11. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	41

## 1. RESUMEN

En este estudio se valoró el efecto letal de la técnica de cocción al vacío (*sous-vide*) sobre *Listeria monocytogenes* (Scott A y CECT 4031) inoculada en carne de cerdo, previamente refrigerada (4°C durante 24 h) o congelada (-20°C durante 15 días), y en la microbiota aerobia mesófila contaminante. De igual forma se evaluó la posibilidad de recuperación y multiplicación de los microorganismos durante su posterior conservación (4 y 8°C). Las muestras de lomo de cerdo (*Longissimus dorsi*) fueron tratadas en horno mixto de convección-vapor a 60°C durante 30, 60 y 90 min. No se observaron diferencias significativas en las letalidades obtenidas en función de cada tratamiento, tanto para los microorganismos aerobios mesófilos como para *Listeria monocytogenes*, evidenciándose en esta última una reducción de 6 log<sub>10</sub> UFC/g para ambas cepas. La temperatura de almacenamiento tuvo un efecto significativo en la recuperación de los microorganismos aerobios mesófilos, disminuyendo su vida útil en las muestras conservadas a 8°C. Al comparar la materia prima inicialmente refrigerada con la congelada, se observaron diferencias significativas únicamente en las muestras tratadas durante 30 min y almacenadas a 8°C en la cepa Scott A. La cepa CECT 4031 no alcanzó los 2 log<sub>10</sub> UFC/g ningún día de análisis, tanto para las muestras refrigeradas como congeladas. Lo mismo ocurrió en la cepa Scott A para las muestras congeladas, sin embargo, las muestras inicialmente refrigeradas y tratadas durante 30 min, alcanzaron dicho recuento a partir del día 5, observándose un efecto significativo de la temperatura de conservación a 8°C, reduciendo de esta forma su vida comercial. Para las muestras tratadas a 60°C durante 60 o 90 min, el indicador para determinar la vida útil es el recuento total de aerobios mesófilos, mientras que para las muestras tratadas a 60°C durante 30 min, el microorganismo indicador es *Listeria monocytogenes* (cepa Scott A), especialmente cuando la temperatura de conservación no se mantiene escrupulosamente inferior o igual a 4°C.

## 2. ABSTRACT

In this study the lethal effect of cooking under vacuum technology (*sous-vide*) was assessed on *Listeria monocytogenes* (Scott A and CECT 4031) inoculated on pork meat previously refrigerated (4°C during 24 h) or frozen (-20°C during 15 days), and in the non-pathogenic aerobic microbiota. In the same way the recovery possibility and microorganism growth during conservation (4 y 8°C) were also evaluated. Pork loin samples were treated in a mixed convection-steam oven at 60°C during 30, 60 and 90 min. No significant differences were observed in lethality results in each treatment for mesophilic aerobic microorganisms as well as *Listeria monocytogenes*, the latter with a 6 log<sub>10</sub> CFU/g reduction in both strains. Storage temperature had a significant effect on the recovery of mesophilic aerobic microorganisms, decreasing their shelf life in samples conserved at 8°C. When comparing raw material initially refrigerated with the frozen one, significant differences were observed only in samples treated during 30 min and stored at 8°C in Scott A strain. CECT 4031 strain did not reached 2 log<sub>10</sub> CFU/g in any day of analysis, for both refrigerated and frozen samples. The same situation was observed in Scott A frozen samples, however, initially refrigerated and 30 min treated samples reached this count since day 5, with a significant effect of storage temperature at 8°C, thus lowering their shelf life. For the samples treated at 60°C during 60 or 90 min, the target organism to determine shelf life is total count of mesophilic aerobic microorganisms, while for the samples treated at 60°C during 30 min, target organism is *Listeria monocytogenes* (strain Scott A), specially when the conservation temperature is not carefully maintained equal or lower than 4°C.

### 3. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existe un gran interés por los productos de fácil preparación con un menor contenido de aditivos o libres de ellos y con una calidad nutritiva y sensorial lo más similar a los alimentos tradicionales. Una de las tecnologías aplicadas en la fabricación de platos cocinados no esterilizados, se basa en el denominado cocinado y enfriamiento o *cook and chill*. El objetivo principal de esta tecnología es asegurar la inocuidad y extender la vida útil de los alimentos, a la vez de preservar las propiedades nutricionales y realzar los atributos sensoriales. Dentro de este grupo se incluye el cocinado *sous-vide*, “bajo vacío” en español (Díaz, 2009).

De acuerdo con Ghazala *et al.* (1995), el concepto es simple: los productos frescos, crudos se colocan en una bolsa o bandeja semirígida, sellada al vacío, y son cocidos lentamente bajo un tratamiento térmico suave, se enfrían y se almacenan a 4°C hasta el momento de ser servidos. El cierre hermético impide la pérdida de humedad y por lo tanto el producto se mantiene tierno y la contracción se reduce al mínimo. El envasado al vacío aumenta la vida útil mediante la inhibición de microorganismos de degradación aeróbica oxidativa y degradación química.

Los consumidores demandan cada vez más productos “caseros”, pero también quieren comodidad; ambas características pueden ser proporcionadas por los productos *sous-vide*. Sin embargo, los tratamientos térmicos suaves mencionados anteriormente, no evitan que ciertas bacterias patógenas sobrevivan en el alimento, lo que preocupa al sector que utiliza la cocción *sous-vide* (restaurantes, cocinas que abastecen a sistemas de catering, hoteles, hospitales, colegios, etc.), por los riesgos asociados a este tipo de productos.

En este proyecto se determinó el efecto de diferentes tratamientos de cocción al vacío sobre la microbiota habitual, así como sobre *Listeria monocytogenes*, bacteria patógena de gran importancia higiénicosanitaria, habitualmente implicada en brotes de toxiinfecciones alimentarias. La evaluación se realizó en muestras elaboradas con carne de cerdo, que posean una cantidad suficientemente representativa de dicho patógeno.

## **4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1. Cocinado *sous-vide***

#### **4.1.1. Origen**

El cocinado *sous-vide* se desarrolló en Francia a partir de una técnica culinaria denominada *en papillote*, que consistía en envolver los alimentos en un pergamino y cocinarlos en horno a una temperatura media. De esta forma, los alimentos mantenían su humedad y resultaban más tiernos y sabrosos. A finales de 1960, el desarrollo de plásticos alimentarios resistentes a la temperatura le permitió al chef francés Georges Pralus experimentar con el sellado al vacío y la cocción lenta, como una manera de extender la vida útil y evitar la contracción del *foie gras*. Cuando el *foie gras* se consumía, sabía como si hubiese estado recién preparado (Díaz, 2009; Ghazala *et al.*, 1995). Actualmente, el método *sous-vide* tiene diversas aplicaciones y entre sus posibles usuarios se incluyen: servicios de restauración comercial, vendedores minoristas de alimentos, hoteles y restaurantes, sistemas de transporte (aéreo, ferroviario y marítimo), las fuerzas armadas, servicios de restauración de hospitales, el mercado de alimentos saludables, escuelas y servicios de comida rápida (Nyati, 2000).

#### **4.1.2. Tecnología empleada**

De acuerdo con Schellekens (1996), la cocina *sous-vide* o la cocina al vacío se define como: “materias primas o materias primas con alimentos intermediarios que se cocinan bajo condiciones controladas de tiempo y temperatura, dentro de bolsas selladas al vacío y estables al calor.” Típicamente se usan temperaturas más bajas (bajo 100°C) y tiempos más largos de cocción que los usados en la cocina tradicional.

Las diversas etapas de la cocina *sous-vide* se muestran en la Figura N° 1.



**Figura N° 1:** Diagrama de flujo del proceso *sous-vide* (Smith *et al.*, 1990)

Según Llebaria *et al.* (2012), dentro de la tecnología *sous-vide* se pueden distinguir dos grandes grupos en función del destino y las características iniciales y finales del producto cocinado al vacío:

1. Cocción al vacío y servicio inmediato: La combinación tiempo/temperatura es muy suave y variable entre productos, y se alcanzan valores finales a corazón de producto que no superan los 65°C y que a menudo pueden quedar en torno a los 40°C. Se busca el punto óptimo de cocción del alimento, que se sitúa en la frontera entre lo que es crudo y lo que es cocido. Un ejemplo representativo de este grupo es la cocción al vacío del pescado.
2. Cocción al vacío y conservación previa al servicio: En este tipo de cocción se alcanzan valores de temperatura a corazón de producto entre 65°C y 80°C durante un tiempo variable. Es el tipo de cocción utilizada para vegetales o para productos cárnicos con partes gelatinosas o duras que hay que fundir o reblandecer.

## **i. Envasado**

La etapa de envasado es crucial en el cocinado *sous-vide* por su importancia en la inhibición del deterioro químico y microbiológico durante el procesado y almacenamiento, aumentando de esta forma la vida útil del producto. El sellado de las bolsas debe ser revisado cuidadosamente, para prevenir la contaminación después del proceso y la consecuente reducción de la vida útil y la seguridad del producto (Díaz, 2009; Ghazala *et al.*, 1995; Nyati, 2000).

Los alimentos *sous-vide* son envasados al vacío en bolsas o bandejas de plástico antes de la pasteurización, a continuación y ya herméticamente sellados, son guardados bajo refrigeración (4°C) durante toda su vida útil (Ghazala *et al.*, 1995). Al mismo tiempo, el material del envase debe cumplir con varios objetivos y por lo tanto con varias especificaciones. Su función principal es proteger al alimento del medio externo y preservar el ambiente gaseoso creado en su interior, también debe ser resistente a altas temperaturas y tener una baja permeabilidad a los gases (O<sub>2</sub>,

vapor), suficiente resistencia mecánica y limitada migración de los componentes del plástico. Aparte de estas características básicas, es deseable que reúna otras propiedades desde el punto de vista legal, técnico, comercial, etc. (Díaz 2009; Schellekens, 1996).

De acuerdo con Díaz (2009), las características técnicas del equipo de envasado son muy importantes para asegurar la atmósfera dentro del envase durante el cocinado y almacenamiento del producto. La cantidad de aire residual que queda dentro del envase, depende del tipo de alimento que contenga; productos líquidos o productos que contengan salsas calientes no pueden ser sellados completamente al vacío, por lo tanto un valor típico para la presión residual dentro del envase en este tipo de alimento es 120 mbar. Para productos sólidos la presión residual dentro del envase puede llegar hasta los 10 mbar (Schellekens, 1996).

## **ii. Cocinado**

La etapa de cocinado tiene lugar después de la preparación y el procesado del alimento, y el tiempo transcurrido entre una fase y otra debe ser mínimo para prevenir, tanto el deterioro microbiológico, como el crecimiento de microorganismos patógenos. Al mismo tiempo que el cocinado debe conseguir que los alimentos como la carne y el pescado tengan una textura tierna y jugosa, no hay que olvidar el principal objetivo que es proporcionar alimentos seguros y con una extensa vida comercial (Díaz, 2009).

A diferencia de los alimentos convencionales procesados térmicamente, los productos *sous-vide* se someten a un tratamiento térmico mínimo. Durante el cocinado, generalmente se obtienen temperaturas moderadas en el centro del producto (normalmente 70-80°C), que garantizan una calidad superior en términos de propiedades nutricionales y sensoriales, pero esto también implica que células vegetativas y particularmente esporas de microorganismos dañinos, puedan sobrevivir al proceso. Lo anterior ha generado cierta preocupación por la salud pública de estos alimentos mínimamente procesados, sobre todo si se pierde la

cadena de frío en alguna etapa de la producción del alimento, almacenamiento, distribución y/o comercialización (De Baerdemaeker y Nocolaï, 1995; Schellekens, 1996; Smith *et al.*, 1990).

Debido a los posibles riesgos microbiológicos asociados al tratamiento térmico, las autoridades de varios países han desarrollado normativas en lo referente a alimentos *sous-vide*. En éste sentido, *The US National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods* (NACMCF), establece que para carne de animales de abasto y pollo, los procesos térmicos deben demostrar una reducción de al menos cuatro unidades logarítmicas de *Listeria monocytogenes*, así como un control en la producción de toxinas de *Clostridium botulinum* proteolítico y no proteolítico. Mientras que *The UK Department of Health* y *The Australian Quarantine and Inspection Services*, recomiendan una temperatura al centro del producto de 70°C durante el tratamiento térmico, para un producto que tenga una duración prevista de 28 días a una temperatura de 0-3°C. En 1998 la FDA (*Food and Drug Administration*) estableció las siguientes recomendaciones para los alimentos *sous-vide*: los productos *sous-vide* deben producirse y distribuirse de acuerdo a las GMP (*Good Manufacturing Practice*); además de las GMP, deben seguirse las directrices del sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*) estrictamente, dado que la pérdida de la cadena de frío es bastante común, las empresas *sous-vide* deben utilizar registradores de tiempo y temperatura para monitorear el producto (Anónimo, 1991; Nyati, 2000; Schellekens, 1996).

Según *The UK Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food* (ACMSF), el tratamiento mínimo para asegurar la inocuidad de los alimentos, es de 90°C por 10 min, sin embargo, estos tratamientos a temperaturas superiores a 70°C pueden destruir vitaminas termolábiles y producir pérdida de jugosidad, afectando a la calidad nutricional y sensorial de los platos cocinados. Por esta razón, resulta muy importante establecer tratamientos equivalentes en relación a la efectividad antimicrobiana, que permitan trabajar a temperaturas cercanas a 70°C durante periodos más largos (Díaz, 2009; Schellekens, 1996).

En la Tabla N° 1 se resumen algunos ejemplos de tratamientos térmicos empleados para ciertos productos *sous-vide* cocinados a base de carne o pescado.

**Tabla N° 1:** Temperatura interna en el centro del producto y tiempo de cocinado para diferentes platos *sous-vide* con una base de carne o pescado

PLATO <i>SOUS-VIDE</i>	TEMPERATURA/TIEMPO
<b>Salmón</b>	50°C/1 h 90°C/15 min 90°C/5 min
<b>Trucha</b>	90°C/10 min 90°C/3,3 min
<b>Atún</b>	90°C/20 min
<b>Papada de cerdo</b>	70°C/17 h
<b>Pichón</b>	62°C/2 h
<b>Salsa de tomate y carne</b>	70°C/900 min
<b>Pollo con salsa</b>	90°C/45 min
<b>Alas de pollo</b>	75°C/24 min
<b>Pollo</b>	80°C/10 min
<b>Ternera</b>	50°C/350 min 85°C/2 h

Díaz, 2009

### iii. Enfriamiento rápido

Después de calentados, la temperatura al centro de los alimentos es de aproximadamente 70°C. Luego se enfrían a una temperatura en un rango entre 1-8°C. El enfriamiento debe efectuarse inmediatamente tras la finalización del cocinado, no deben transcurrir más de 30 min y se debe alcanzar una temperatura interna de 0 a 3°C antes de 90 min (Díaz, 2009; Schellekens, 1996).

Los sistemas de enfriamiento más utilizados en la industria de la restauración emplean aire, agua, placas o cámaras frigoríficas. Los abatidores de aire utilizados en esta tecnología, son capaces de bajar la temperatura desde 70°C a 3°C en 90

min o desde 70°C a -18°C en 240 min, según sea destinado a refrigeración o congelación, respectivamente (Díaz, 2009).

En los países de la Unión Europea se han desarrollado diferentes regulaciones en lo referente a enfriamiento y almacenamiento bajo refrigeración de alimentos. La Tabla N° 2 resume la legislación relativa a la refrigeración de productos cocidos en algunos países europeos.

**Tabla N° 2:** Legislación relativa a la refrigeración de productos cocidos en algunos países europeos

PAÍS	ENFRIAMIENTO DESPUÉS DEL CALENTAMIENTO	ALMACENAMIENTO EN FRÍO (°C)
<b>Bélgica</b>	Inmediatamente	7
<b>Francia</b>	A 2°C dentro de 2 horas	0-3/4
<b>España</b>	No definido, específico para cada producto	0-4
<b>Reino Unido</b>	Tan rápido como sea posible	8

Schellekens, 1996

Por su parte Llebaria *et al.*, (2012), recomienda asegurar una temperatura de 4°C en el corazón del producto en un máximo de 24 h.

#### **iv. Almacenamiento**

Los alimentos *sous-vide* pueden almacenarse en refrigeración o congelación. De acuerdo con Díaz (2009), la refrigeración es el método de conservación idóneo para platos *sous-vide* de alta calidad sensorial cuya textura y otras cualidades sensoriales empeoran al aplicar tratamientos de congelación. Sin embargo, resulta menos efectivo que la congelación para prevenir el deterioro de los alimentos. El principal riesgo asociado al almacenamiento refrigerado de los alimentos cocinados *sous-vide*, es la germinación y multiplicación de las posibles esporas supervivientes

al tratamiento térmico. Sin embargo, también se deben tener en cuenta a los microorganismos lesionados y/o supervivientes al proceso, que pueden multiplicarse durante el almacenamiento del alimento, especialmente si se rompe la cadena de frío.

El procesamiento *sous-vide* prolonga la vida útil de los alimentos en comparación con los métodos convencionales *cook and chill*. En general, la vida útil varía en un rango de 6-42 días. Para carnes rojas se describe que pueden conservar su calidad sensorial durante 23-25 días, los productos de carne blanca por 14-30 días, y los productos de pescado y vegetales por 7 días (Armstrong y McIlveen, 2000; Díaz *et al.*, 2008; Schellekens, 1996). En relación a lo mismo, Llebaria *et al.* (2012), propone que el período de conservación de los productos cocinados al vacío tenga un máximo de 10 días a una temperatura máxima de 4°C. Si no se cumple esta exigencia, existe la posibilidad de multiplicación de *Listeria monocytogenes* o la formación de toxina de *Clostridium botulinum*.

#### **v. Regeneración del producto**

El tratamiento de regeneración (recalentamiento previo al servicio) debe asegurar temperaturas superiores a 70°C en el centro del producto. Sin embargo, si los alimentos van a ser consumidos inmediatamente después de la regeneración, entonces es suficiente alcanzar temperaturas superiores o iguales a 63°C (Díaz, 2009). En relación a lo mismo, Llebaria *et al.* (2012), establece que se debe asegurar una temperatura superior o igual a 65°C en el centro del producto en el mínimo tiempo posible sin superar la temperatura de cocción empleada.

Los equipos de regeneración más empleados en la industria, utilizan por ejemplo, baños de agua hirviendo durante 10-15 min o microondas durante 4-5 min. También se puede realizar la regeneración del producto en horno de vapor, plancha, freidora, etc. (Llebaria *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 1990).

## 4.2. Ventajas del cocinado *sous-vide*

La técnica *sous-vide* ha surgido en las últimas décadas como un proceso de catering que es capaz de proporcionar alimentos con una calidad sensorial superior y una vida útil mayor, que los alimentos tradicionalmente pasteurizados (De Baerdemaeker y Nicolai, 1995).

Según Schellekens (1996), las principales ventajas del cocinado *sous-vide* son de carácter económico (por ejemplo, mejor uso de la mano de obra y del equipamiento, a través de la producción centralizada) y cualitativo (por ejemplo, menor uso de saborizantes, mayor conservación de las vitaminas, retención de los jugos naturales de los alimentos).

De acuerdo con Armstrong y McIlveen (2000), se ha observado la mejora de la textura, particularmente la jugosidad y ternura de la carne, debido a la cocina húmeda con temperaturas inferiores a 100°C. Al mismo tiempo se genera una pérdida mínima de peso de 5-10%, comparada con la cocina tradicional que genera una pérdida de 25-40%. Referente a lo mismo, Nyati (2000), señala que las ventajas asociadas al cocinado *sous-vide* incluyen un perfil de sabor superior a los alimentos congelados, así como también la retención de sabores volátiles dentro del envase, que intervienen en la percepción del olor y el sabor del producto, y también evitan la aparición de olores y sabores desagradables producidos por la oxidación de las grasas. La mayor ternura del producto y el mantenimiento del color, se debe a que los nutrientes no se filtran en el agua hirviendo. Además, el almacenamiento en bolsas al vacío con baja permeabilidad al oxígeno, evita el contacto del producto con el aire, y por lo tanto, los alimentos mantendrán su calidad de textura, sabor, color y calidad microbiológica mucho más que un alimento del mismo tipo que no esté envasado al vacío. Lo anterior implica que el cocinado *sous-vide* es capaz de incrementar la vida útil de algunos productos con respecto a otros métodos más tradicionales (Díaz, 2009; Planas 2010).

### 4.3. Desventajas del cocinado *sous-vide*

De acuerdo con Ghazala *et al.* (1995), en el sector se ha expresado preocupación sobre la inocuidad sanitaria de estos alimentos, debido al potencial abuso de temperatura y la multiplicación de patógenos durante su conservación. Dicha preocupación se justifica, en vista de que muchos agentes patógenos son capaces de replicarse a temperaturas entre 3 y 12°C y producir toxinas sin generar deterioro organoléptico. Al mismo tiempo, Nyati (2000), señala que aunque el proceso ha generado un considerable interés internacional debido a sus ventajas operativas y elevado perfil sensorial, su desarrollo ha ido acompañado de serias advertencias de las autoridades debido a la percepción de los posibles riesgos a partir de psicrófilos, microaerófilos y anaerobios.

Patógenos no esporulados transmitidos por los alimentos y de importancia para la salud pública, que pueden estar presentes en los alimentos *sous-vide*, incluyen cepas enteras patógenas de *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Aeromonas*, *Listeria* y especies de *Yersinia*. Diversos estudios han demostrado que *L. monocytogenes* y *Y. enterocolitica* son capaces de multiplicarse a temperaturas de refrigeración (<5°C) durante un período de tiempo prolongado (7-21 días). También se ha informado que patógenos tradicionales transmitidos por los alimentos, tales como especies de *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*, son capaces de duplicarse a temperaturas de 5-12°C, es decir, condiciones de abuso mínimo de temperatura. Mientras que todos estos patógenos no esporulados debiesen ser destruidos durante el proceso térmico, ellos representan una amenaza potencial para el consumidor si, por ejemplo, las materias primas son de baja calidad microbiológica, o el producto se contamina durante el proceso debido a una mala práctica de manufactura, o el proceso de pasteurización resulta inadecuado para destruir una alta carga microbiana de estos patógenos no esporulados (Smith *et al.*, 1990). El principal problema de la cocina al vacío, reside en los microorganismos patógenos formadores de esporas capaces de soportar los suaves tratamientos térmicos y germinar durante el almacenamiento refrigerado, llegando a

producir toxiinfecciones alimentarias. Dentro de este grupo se incluyen cepas proteolíticas y no proteolíticas de *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens* (Díaz, 2009).

En cuanto a las pérdidas nutricionales de estos alimentos, Creed (1995), señala que las vitaminas de interés en este caso serán las que puedan disminuir durante el método de procesamiento *sous-vide*, es decir, las que son sensibles al tratamiento térmico: tiamina (vitamina B<sub>1</sub>), riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>) y ácido ascórbico (vitamina C). Las pérdidas de minerales no son causadas por el calor, pero pueden ocurrir por la lixiviación en el agua de cocción. En el caso de la técnica *sous-vide*, el contenido mineral de los alimentos frescos es probable que se mantenga.

#### **4.4. *Listeria monocytogenes***

De acuerdo con Adams y Moss (2000), el género *Listeria* tiene seis especies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, y *L. grayi*. Sólo las especies hemolíticas *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* y *L. seeligeri* pueden, en ocasiones, estar relacionadas con patogenicidad en humanos, aunque es *L. monocytogenes* la única especie que ha sido involucrada en brotes de listeriosis de origen alimentario. La mayoría de los casos de listeriosis humana son causados por sólo tres de los trece serotipos identificados (1/2a, 1/2b y 4b).

*Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, catalasa positivo, oxidasa negativo, no esporulado, que crece en un amplio rango de temperatura desde 0 a 42°C con un óptimo entre 30 y 35°C (Adams y Moss, 2000; García y Heredia, 2009). Es también un microorganismo intracelular facultativo, que puede sobrevivir y multiplicarse en células del sistema monocito-macrófago. Para ello necesita la acción de una serie de factores de virulencia, como las internalinas (InIA, InIB), listeriolisina O, fosfolipasas C (PI-PLC, PC-PLC) y la proteína ActA (Adams y Moss, 2000; Larraín y Carvajal, 2008).

Según FAO/OMS (2004), este patógeno ha sido causante de enfermedad en una amplia gama de animales salvajes y domésticos, siendo aislado desde numerosas

especies de mamíferos, aves, anfibios, peces, crustáceos, insectos y reptiles; así como también desde una gran variedad de fuentes, incluyendo agua, suelo, vegetación, ensilaje, materia fecal y aguas residuales. Hay indicios de que la bacteria reside transitoriamente en el tracto intestinal humano, y, según el examen de muestras fecales, son portadores del microorganismo, sin consecuencias perjudiciales para la salud aparentes, del 2 al 10% de la población general. Este microorganismo está frecuentemente presente en alimentos crudos, tanto de origen vegetal como animal, y puede convertirse en endémica en los entornos de elaboración de alimentos. Está también presente en alimentos cocinados, debido a la contaminación posterior a la elaboración o a un tratamiento térmico insuficiente. También se ha aislado de alimentos como leche líquida cruda y pasteurizada, quesos (particularmente quesos de pasta blanda madurados), helados, hortalizas crudas, embutidos fermentados de carne cruda o cocida, carne de ave cruda o cocida, carnes crudas, y productos del mar crudos y ahumados.

Mientras que los modos de transmisión de *Listeria monocytogenes* pueden incluir la transmisión vertical (de la madre al hijo), zoonótica (contacto con animales) y nosocomial (adquiridas en el hospital), en general se considera que la mayoría de los casos de listeriosis humana involucran la transmisión por alimentos (FAO/OMS, 2004).

Las diversas manifestaciones clínicas asociadas a la listeriosis pueden agruparse en dos categorías: listeriosis invasiva y listeriosis no invasiva. La listeriosis invasiva generalmente se desarrolla en personas con sistemas inmunes comprometidos, y se refiere a los casos en que una infección inicial del tejido intestinal por *Listeria monocytogenes* deriva en la invasión de partes del organismo que habitualmente son estériles, como el útero grávido, el sistema nervioso central o la sangre, o combinaciones de éstos. Se caracteriza por una tasa de letalidad alta, de 20 a 30% y las infecciones pueden producir secuelas. Por su parte, la listeriosis no invasiva (conocida como gastroenteritis febril por listerias), se puede desarrollar en cualquier población, si se consume un gran número de bacterias (por ejemplo,  $>10^3$  UFC/g). En estos casos, los síntomas son los de una gastroenteritis, como diarrea, fiebre,

cefalea y mialgia, tras un período de incubación corto. No se conocen la incidencia ni los factores que ocasionan la aparición de esta forma no invasiva de la enfermedad (Health Canada, 2010; FAO/OMS, 2004).

La listeriosis es una enfermedad relativamente rara a nivel mundial; la incidencia anual para la listeriosis humana se encuentra en un rango entre 0,1 a 11,3 casos por millón de personas. En la UE se registraron 12.678 casos de listeriosis durante el 2004, con una tasa de incidencia de 0,3 casos por cien mil habitantes. En Australia esta tasa alcanza los 3 casos por millón de personas (García y Heredia, 2009; FAO/OMS, 2004). En Chile, el Instituto de Salud Pública ha confirmado 12 casos de listeriosis durante el año 2012 (0,1 por cien mil habitantes), cifra mayor a la registrada en igual período de 2011 (11 casos). En ambos períodos el 100% de los afectados corresponde a los grupos de riesgo (embarazadas, niños pequeños, inmunosuprimidos, portadores de patologías crónicas y adultos mayores). Durante todo el año 2011 se notificaron 59 casos de *Listeria monocytogenes*, cifra inferior a la registrada en los años 2008 a 2010, nuevamente todos los casos pertenecieron a los grupos de riesgo (MINSAL, 2012).

*Listeria monocytogenes* es un agente de vigilancia de laboratorio en Chile, según el Decreto Supremo Nº 158/2004 (MINSAL, 2004). El diagnóstico se confirma únicamente tras el aislamiento del agente infeccioso a partir del líquido cefalorraquídeo, sangre, líquido amniótico, placenta, meconio, loquios, material de lavado gástrico u otros sitios infectados (MINSAL, 2012).

La resistencia térmica de *Listeria monocytogenes* es superior a la de cualquier otro patógeno encontrado en los alimentos en su forma vegetativa y ha sido estudiada en diferentes platos cocinados. Al mismo tiempo tiene la habilidad de crecer bajo temperaturas de refrigeración (2-4°C), e incluso se ha detectado su presencia a -0,1°C. Comparada con otras bacterias patógenas que no producen esporas y que son transmitidas por los alimentos (por ejemplo, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* enterohemorrágica), *Listeria monocytogenes* es resistente a varias condiciones medioambientales tales como altas concentraciones de sal o acidez. Esta combinación, junto a su naturaleza ubicua y anaerobia facultativa, la transforman en

el principal microorganismo a tener en cuenta en la producción de alimentos *cook and chill* (donde se incluye la tecnología *sous-vide*), ya que las características de estos platos son idóneas para su crecimiento (Díaz, 2009; FAO/OMS, 2009; Gandhi y Chikindas, 2007; Hansel y Knøchel, 2001).

El tratamiento térmico suave empleado en el cocinado *sous-vide* puede favorecer la termotolerancia de la bacteria si ésta resulta solamente lesionada. Se ha comprobado que cultivos de *Listeria monocytogenes* dañados subletalmente por calor, son tan patógenos tras su recuperación como cultivos no tratados. Es así como las células de *Listeria monocytogenes* que hayan sufrido una lesión subletal durante cualquier fase del procesamiento de un alimento, tienen la capacidad de recuperarse en el producto acabado durante su almacenamiento en refrigeración, ya que pueden multiplicarse de forma más rápida que la flora saprófita (Blanco, 1994; Sergelidis y Abraham, 2009).

Debido a los peligros que representa este microorganismo, se han establecido diferentes criterios en cada país. La FDA de Estados Unidos, tiene una política de tolerancia cero respecto a *Listeria monocytogenes*. Basándose en esta política, la detección de cualquier célula de este patógeno en el alimento, transforma al producto en contaminado (Gandhi y Chikindas, 2007). Por su parte, el Reglamento N° 2073/2005 de la Comisión de las Comunidades Europeas relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, establece un recuento máximo de *Listeria monocytogenes* de  $10^2$  UFC/g durante la vida comercial de los productos alimenticios (Comisión de las Comunidades Europeas, 2005). Al mismo tiempo, el Reglamento Sanitario de los Alimentos del Ministerio de Salud de Chile, establece dos categorías para los alimentos listos para el consumo en función de su pH,  $a_w$  y vida útil: los que favorecen la multiplicación de *Listeria monocytogenes* y los que no. Para aquellos que no favorecen la multiplicación, se acepta hasta un máximo de 100 UFC/g durante su vida útil; mientras que para los que lo favorecen, así como los que van destinados al consumo de menores de 12 meses, el recuento de *Listeria monocytogenes* debe ser cero (MINSAL, 1997).

Las investigaciones existentes acerca de la tecnología *sous-vide*, en muchas ocasiones no resultan del todo apropiadas, ya que se basan en estudios realizados en caldos de cultivo, los cuales difieren de las características propias de los alimentos, tanto en su composición, como en su capacidad de transferencia de calor. Además, en muchas ocasiones no se ha considerado la posible presencia de microorganismos lesionados, los cuales no son detectados mediante los métodos de microbiología habituales. A partir de lo expuesto anteriormente, surgen las razones para plantear este estudio.

## **5. HIPÓTESIS**

Los tratamientos aplicados en la técnica de cocción *sous-vide*, son efectivos para eliminar a la microbiota habitual y a *Listeria monocytogenes* inoculada en carne de cerdo, asegurando la calidad microbiológica de los platos elaborados con dicha tecnología.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo general**

Determinar el efecto letal de la técnica de cocción *sous-vide* sobre la microbiota habitual y *Listeria monocytogenes* inoculada en carne de cerdo, así como la posibilidad de recuperación y multiplicación de los microorganismos durante la posterior conservación en refrigeración.

### **6.2. Objetivos específicos**

6.2.1. Evaluar el efecto letal de diferentes tratamientos (60°C/30 min, 60°C/60 min, 60°C/90 min) sobre la microbiota habitual (microorganismos aerobios mesófilos) y *Listeria monocytogenes* (CECT 4031 y Scott A) inoculada en carne de cerdo.

6.2.2. Evaluar la posibilidad de recuperación y multiplicación de los microorganismos durante su posterior conservación bajo refrigeración a temperaturas óptimas (4°C), como de abuso (8°C), con el fin de poder determinar su vida comercial segura.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

La fase experimental del proyecto se llevó a cabo en el Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB), Barcelona, España.

### 7.1. Cepas y preparación del inóculo

Se utilizaron dos cepas de *Listeria monocytogenes* para la realización del estudio, con el fin de continuar el esquema de trabajo realizado por Gutiérrez (2011). La cepa Scott A (serovar 4b), perteneciente al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Madrid, España), y la cepa CECT 4031 (serovar 1a), perteneciente a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universidad de Valencia, Burjassot, España). Estas cepas se conservaron liofilizadas. A partir del liofilizado se preparó el inóculo en tubos con Caldo Triptona Soya (*Tryptone Soy Broth*, TSB, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido), incubados a 37°C por 24 h. Posteriormente se sembró en placas de Petri con Agar Triptona Soya (*Tryptone Soy Agar*, TSA, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido), que fueron incubadas a 37°C durante 24 h, para comprobar su identidad y pureza. A partir de las placas, se sembraron en estría tubos inclinados de TSA (cultivos de trabajo) que fueron conservados a 4°C por un período máximo de 9 semanas. A partir de los cultivos de trabajo se realizaron dos subcultivos adicionales en placas de Petri con TSA incubados a 37°C por 24 h, para obtener a los microorganismos en fase estacionaria.

A partir del segundo subcultivo se realizó una suspensión en tubos con 10 ml de solución de Cloruro de Sodio (Panreac, Montcada i Reixac, Barcelona, España) 0,85% (8,5 g/L de NaCl) con 3 g de perlas de vidrio, para obtener una concentración aproximada de *Listeria monocytogenes* de  $10^{8-9}$  UFC/ml. A partir de la suspensión se realizó una dilución 1:10 en 100 ml de solución salina (NaCl 0,85%), con la cual se inocularon las muestras de carne.

## 7.2. Preparación de las muestras y diseño del esquema experimental

Para la realización del ensayo se utilizaron piezas de carne de cerdo pertenecientes al músculo longitudinal de la espalda (*Longissimus dorsi*), adquiridas en un supermercado local de Barcelona, España. Para garantizar la homogeneidad de las muestras, las piezas se cortaron en unidades más pequeñas (filetes), con una cortadora manual (MAS 6200, Bosch, BSH Electrodomésticos, España), con una dimensión aproximada de 9x15x1,5 cm y un peso de 80-90 g.

Los filetes obtenidos se dividieron en 5 lotes según se presenta en la Figura N° 2, correspondiente al esquema general de trabajo; para cada lote se cortaron 44 muestras de carne de cerdo. De dichos lotes se inocularon 4, mientras que uno quedó sin inocular, correspondiente al lote control para las muestras refrigeradas por 24 h. El experimento se realizó dos veces.

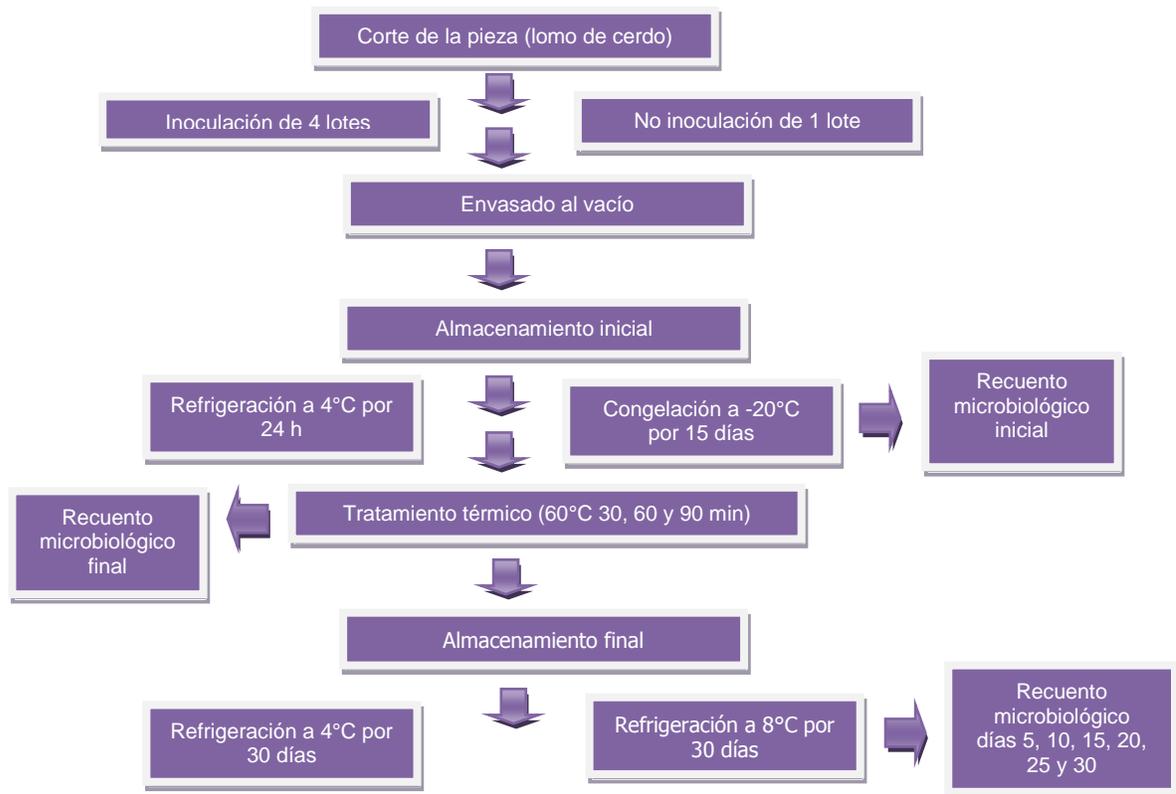


Figura N° 2: Esquema general del diseño experimental

### **7.3. Inoculación de las muestras**

Se procedió a la inoculación de las muestras en una campana de flujo laminar (BIO II A, Telstar, Terrassa, Barcelona, España), ubicada en el laboratorio de bioseguridad del CERPTA (Centre Especial de Recerca Planta de Tecnologia dels Aliments) de la UAB. La inoculación se realizó utilizando un instrumento de madera de 10x10 cm, con 64 agujas de 3 cm de largo y 0,70 mm de diámetro, en forma de matriz de 8x8; las agujas se introdujeron en la solución de trabajo y luego en la muestra. Dicho procedimiento se realizó 20 veces por muestra, con el fin de conseguir un recuento entorno a los  $10^{5-6}$  UFC/g.

### **7.4. Envasado y almacenamiento inicial de las muestras**

Una vez realizada la inoculación, cada muestra se envasó en una bolsa de poliamida y polietileno de 90 micras (VAC BCN, S.L., Barcelona, España). Luego fueron termoselladas al vacío con una termoselladora manual (EVT-7-VT, Tecnotrip, Barcelona, España).

Para finalizar, la mitad de las muestras se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 15 días y la otra mitad se refrigeró a  $4^{\circ}\text{C}$  por 24 h, junto a las muestras sin inocular (control), simulando las condiciones aplicadas en las empresas de catering.

### **7.5. Cocción al vacío y almacenamiento final de las muestras**

Las muestras fueron cocidas en un horno mixto de vapor-convección (*SelfCooking Center*, Rational S.A., Barcelona, España) regulado a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 30, 60 y 90 min, según consta en el esquema general de trabajo. Dichos tratamientos se aplicaron teniendo en consideración los datos de Van Asselt y Zwietering (2006), con los que realizando el cálculo en función de su valor  $D_{ref}$  (95%), a estos tiempos se conseguía una reducción de 2, 4 y 6 unidades logarítmicas, respectivamente. La evolución de la temperatura interna del producto se controló mediante una sonda

térmica incorporada en el horno, que fue introducida en el corazón de una de las muestras.

Una vez finalizados los tratamientos, las muestras fueron enfriadas en un baño de agua y hielo, alcanzando una temperatura de entre 4 y 6°C en 30 min aproximadamente.

Posteriormente las muestras se conservaron bajo refrigeración a 4 y a 8°C, por un período de 30 días, y fueron analizadas los días 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30; según consta en el esquema general de trabajo de la Figura N° 2.

## **7.6. Análisis microbiológico de las muestras inoculadas**

Las muestras envasadas al vacío (tras el enfriamiento y durante su conservación en refrigeración) se abrieron de forma aséptica en una campana de flujo laminar (Micro-V, Telstar, Terrassa, Barcelona, España). Posteriormente se realizó una dilución inicial 1:3 con agua de peptona tamponada (AES Chemunex, Combours, Francia) con la totalidad del contenido de cada muestra, en una bolsa estéril mediante un equipo gravimétrico automático (Delta Dilutor, IUL Instruments, GMBH, Königswinter, Alemania). Las muestras se homogenizaron en un stomacher de palas (IUL Instruments, GMBH, Königswinter, Alemania) durante 2 min.

Para determinar el recuento de los patógenos en las muestras, se utilizaron dos métodos en función del recuento esperado: para las muestras donde se esperaba obtener un recuento bajo, se realizó la siembra de 1 ml repartido en tres placas; en cambio para las muestras donde se previó que el recuento sería alto, se sembró en espiral con un equipo automatizado (Eddy Jet, IUL Instruments, GMBH, Königswinter, Alemania).

Para el recuento de *Listeria monocytogenes* se utilizó el medio cromogénico selectivo para *Listeria* de Ottaviani y Agosti (ALOA, AES Chemunex, Combours, Francia). Tras la siembra, las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 h. Además de hacer el recuento en las muestras tratadas, también se realizó la incubación del agua de peptona a 37°C durante 24 h, para investigar la presencia de estas

bacterias, determinar si quedaban bacterias por debajo del límite de detección y/o determinar la presencia de microorganismos lesionados.

La investigación de *Listeria monocytogenes* se hizo siguiendo el procedimiento UNE-EN ISO 11290-2 (2000); Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte 2: método de recuento.

La letalidad se calculó como la diferencia entre el logaritmo del recuento inicial (correspondiente a las muestras crudas) y del recuento final (correspondiente a las muestras después del tratamiento térmico).

### **7.7. Análisis microbiológico de las muestras control**

Las muestras envasadas al vacío (tras el enfriamiento y durante su conservación en refrigeración), se abrieron de forma aséptica en una campana de flujo laminar (Micro-V, Telstar, Terrassa, Barcelona, España). Posteriormente se realizó una dilución inicial 1:3 con agua de peptona tamponada (AES Chemunex, Combours, Francia) con la totalidad del contenido de cada muestra, en una bolsa estéril mediante un equipo gravimétrico automático (Delta Dilutor, IUL Instruments, GMBH, Königswinter, Alemania). Las muestras se homogenizaron en un stomacher de palas (IUL Instruments, GMBH, Königswinter, Alemania) durante 2 min.

Los aerobios mesófilos se sembraron en masa en Agar de Recuento en Placa (*Plate Count Agar*, PCA, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), después de la siembra, las placas se incubaron a 30°C durante 24-48 h.

La investigación de los microorganismos aerobios mesófilos se realizó siguiendo el procedimiento UNE-EN ISO 4833 (2003); Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30°C.

## 7.8. Modelización del crecimiento de *Listeria monocytogenes* y microorganismos aerobios mesófilos

La cinética de crecimiento de *Listeria monocytogenes* y de los microorganismos aerobios mesófilos, se caracterizó utilizando el programa DMFit *Web Edition* (<http://modelling.combase.cc>) del *Institute of Food Research* (Norwich, Reino Unido), con el fin de estimar la velocidad máxima de multiplicación ( $\mu_{max}$ ) de todos los procesos estudiados y determinar el modelo predictivo que presentaba un mejor ajuste. Dicho programa ajusta los parámetros de crecimiento poblacional a modelos desarrollados por Baranyi y Roberts (1994), entre otros.

## 7.9. Análisis estadístico

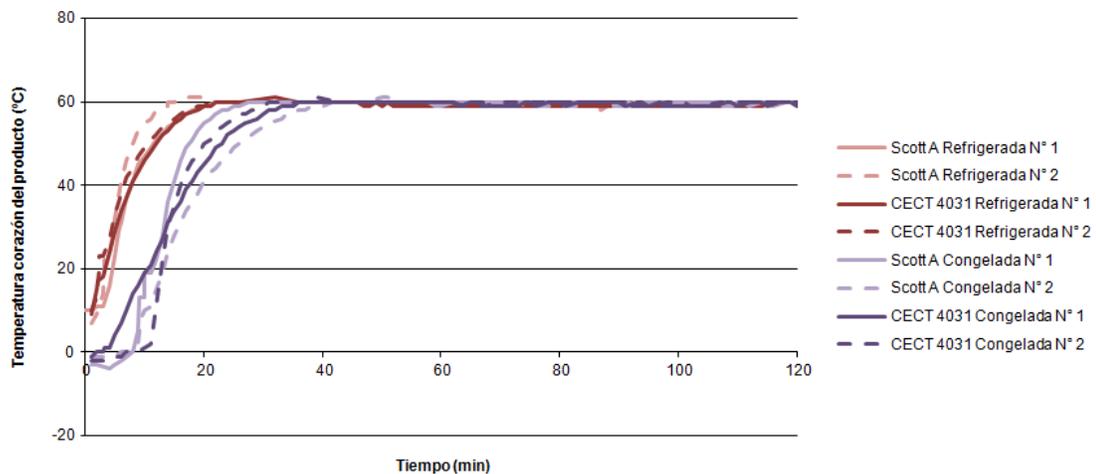
Los recuentos obtenidos se expresaron como  $\log_{10}$  UFC/g, estimando la media de las dos réplicas realizadas para cada uno de los días de análisis. Las medias se sometieron a la prueba no paramétrica de Wilcoxon con un nivel de significancia del 5%, utilizando el software estadístico SPSS® (IBM *Statistical Package for the Social Science*, versión 19, 2010).

El modelo matemático a usar fue:  $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + \varepsilon_{ijk}$ . Donde  $Y_{ijk}$  se refiere al recuento para cada observación;  $\mu$  corresponde a la media general de todas las observaciones;  $\alpha_i$  corresponde al efecto del almacenamiento previo a la cocción (congelación o refrigeración);  $\beta_j$  se entiende como el tratamiento térmico;  $\gamma_k$  es la temperatura de almacenamiento (4 u 8°C);  $\alpha\beta$ ,  $\alpha\gamma$  y  $\beta\gamma$ , representan las interacciones entre cada uno de los factores; y  $\varepsilon_{ijk}$  representa el error experimental aleatorio de cada observación.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Registros del proceso de cocción

En la Figura N° 3 se observan los registros de la temperatura interna del producto durante los tratamientos de cocción al vacío en horno mixto de convección-vapor. Se evidenció que para alcanzar una temperatura de 60°C en el centro de las piezas de lomo de cerdo previamente refrigeradas a 4°C, se precisaba de aproximadamente 18 min, mientras que para las piezas previamente congeladas a -20°C, el tiempo necesario ascendía a unos 28,25 min. La velocidad promedio del incremento de temperatura hasta alcanzar los 60°C en el centro del producto fue de 2,94 °C/min para las muestras refrigeradas, y de 2,42 °C/min para las congeladas. Una vez transcurrido los tres tiempos de cocción (30, 60 y 90 min), se procedió a enfriar rápidamente las muestras.

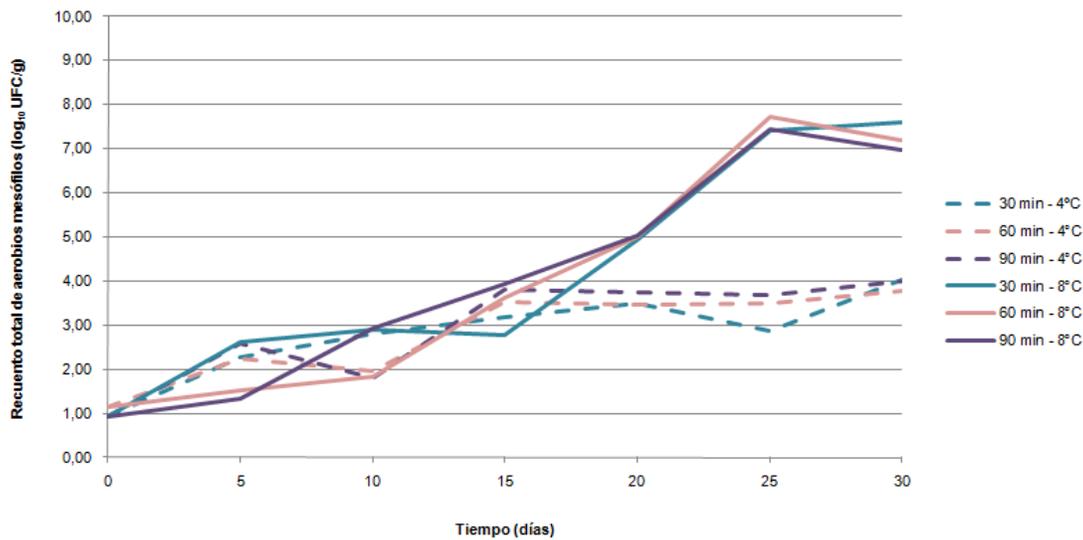


**Figura N° 3:** Registros de temperatura interna del producto sometido a cocción *sous-vide* en horno mixto de convección-vapor

## **8.2. Efecto del tratamiento térmico y evolución de microorganismos aerobios mesófilos en las muestras control durante su conservación en refrigeración**

El recuento inicial obtenido tras el almacenamiento de la carne bajo refrigeración a 4°C, fue de  $2,92 \pm 0,60 \log_{10}$  UFC/g. Tras la aplicación de los diferentes tratamientos térmicos, dicho recuento se redujo a los siguientes valores:  $0,94 \pm 1,33$ ;  $1,16 \pm 0,06$  y  $0,92 \pm 0,11 \log_{10}$  UFC/g; al mismo tiempo las letalidades alcanzadas fueron  $1,98 \pm 0,73$ ;  $1,76 \pm 0,53$  y  $2,00 \pm 0,49 \log_{10}$  UFC/g, para las muestras tratadas durante 30, 60 y 90 min respectivamente. No se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en las letalidades entre los tratamientos aplicados.

Como se observa en la Figura N° 4, durante el almacenamiento de las muestras bajo refrigeración a 4°C, se observó una recuperación en los recuentos de aerobios mesófilos totales. Sin embargo, dichos recuentos no llegaron a alcanzar los niveles máximos, que según el Real Decreto 3484 de España (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2000) se definen como recuentos superiores a  $10^5$  UFC/g; en ninguno de los tratamientos, mientras que en las muestras almacenadas a 8°C, ya a partir del día 20 se alcanzaron recuentos superiores a  $5 \log_{10}$  UFC/g para todos los tratamientos. La temperatura de almacenamiento tuvo un efecto significativo ( $P < 0,05$ ) en la recuperación de los microorganismos a lo largo del tiempo en las muestras tratadas durante 60 y 90 min, evidenciándose que a mayor temperatura de almacenamiento se producía una mayor multiplicación bacteriana.



**Figura N° 4:** Evolución del recuento total de microorganismos aerobios mesófilos en las muestras control tratadas a 60°C en función del tiempo de cocción aplicado y su posterior almacenamiento

En la Tabla N° 3, se muestran los valores de la velocidad máxima de multiplicación de los microorganismos aerobios mesófilos, obtenidos con el programa DMFit, y la estimación de la vida útil en función del tratamiento aplicado y de su posterior conservación en refrigeración.

Se observó que las mayores velocidades máximas de crecimiento ( $\mu$  max) correspondieron a las muestras almacenadas a 8°C, con valores de  $0,29 \pm 0,07$ ;  $0,43 \pm 0,06$  y  $0,31 \pm 0,07$   $\log_{10}$  UFC/g/d. Mientras que para las muestras almacenadas a 4°C estos valores fueron  $0,14 \pm 0,03$ ;  $0,13 \pm 0,04$  y  $0,15 \pm 0,06$   $\log_{10}$  UFC/g/d, para los tiempos de cocción de 30, 60 y 90 min respectivamente.

Basándose en estos resultados, la estimación de la vida útil (momento en que se alcanzan recuentos superiores a  $10^5$  UFC/g) osciló entre 18 y 30 días, correspondiendo el menor tiempo al tratamiento de 90 min almacenado a 8°C y el mayor tiempo al tratamiento de 60 min almacenado a 4°C. Diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) se observaron en las muestras cocidas durante 60 y 90 min, almacenadas

a 4 y a 8°C, sin embargo entre los tiempos de cocción aplicados dichas diferencias no se observaron para ninguna de las temperaturas de almacenamiento ( $P>0,05$ ).

**Tabla Nº 3:** Velocidad máxima de crecimiento de mesófilos aerobios totales y estimación de la vida útil en las muestras control tratadas a 60°C en función del tiempo de cocción y su posterior almacenamiento

TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN (°C)	TIEMPO DE COCCIÓN (min)	VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO ( $\mu$ max) $\pm$ SE* (log <sub>10</sub> UFC/g/d)	VIDA ÚTIL (días)	
			MEDIA	INTERVALO DE CONFIANZA (95%)
4	30	0,14 $\pm$ 0,03	29,00 <sup>a</sup>	27,29–30,71
	60	0,13 $\pm$ 0,04	29,54 <sup>a</sup>	27,22–31,86
	90	0,15 $\pm$ 0,06	27,20 <sup>a</sup>	24,00–30,40
8	30	0,29 $\pm$ 0,07	22,38 <sup>ab</sup>	19,31–25,45
	60	0,43 $\pm$ 0,06	18,93 <sup>b</sup>	16,70–21,16
	90	0,31 $\pm$ 0,07	17,86 <sup>b</sup>	15,41–20,31

\*: Error estándar

a-b: Letras diferentes en la misma columna corresponden a diferencias estadísticamente significativas ( $P<0,05$ )

### 8.3. Efecto del tratamiento térmico en *Listeria monocytogenes* en las muestras inoculadas durante su conservación en refrigeración

En la Tabla Nº 4, se muestran los resultados obtenidos en el recuento de *Listeria monocytogenes* al aplicar los tratamientos térmicos de cocción a 60°C durante 30, 60 y 90 min, en función de la cepa y temperatura de mantenimiento de la materia prima previa al tratamiento (4°C durante 24 h o -20°C durante 15 días).

Tras el tratamiento de cocción, en la mayoría de las muestras analizadas, el recuento final fue inferior al límite de detección, obteniéndose una letalidad superior a 6 unidades logarítmicas, y por lo tanto muy por encima del cálculo teórico realizado con el valor  $D_{ref}$  (95%) (Van Asselt y Zwietering, 2006). Sin embargo, tras el enriquecimiento en agua de peptona durante 24 h, se observó la presencia de *Listeria monocytogenes* CECT 4031 en las muestras previamente congeladas y cocinadas durante 60 y 90 min. En el caso de *Listeria monocytogenes* Scott A, se

evidenció la presencia de células supervivientes únicamente en las muestras congeladas.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P>0,05$ ) en los valores de letalidad obtenidos ni en función del tratamiento térmico, de la materia prima (congelada o fresca) ni de la cepa. En cualquier caso, tras el tratamiento o durante su conservación *Listeria monocytogenes* fue detectada.

**Tabla Nº 4:** Efecto del tratamiento térmico sobre *Listeria monocytogenes* en función de la cepa, temperatura de mantenimiento previo de la materia prima y tiempo de cocción

CEPA	TEMPERATURA DE MATERIA PRIMA (°C)	TIEMPO DE COCCIÓN (min)	RECuento INICIAL ( $\log_{10}$ UFC/g/d) $\pm$ SE*	RECuento FINAL ( $\log_{10}$ UFC/g/d) $\pm$ SE*	LETALIDAD ( $\log_{10}$ UFC/g/d) $\pm$ SE*	ENRIQUECIMIENTO
<b>CECT 4031</b>	4	30	6,44 $\pm$ 0,11	0,00	6,44 <sup>a</sup>	-
		60		0,00	6,44 <sup>a</sup>	-
		90		0,00	6,44 <sup>a</sup>	-
	-20	30	6,85 $\pm$ 0,78	0,00	6,85 <sup>a</sup>	-
		60		0,00	6,85 <sup>a</sup>	+
		90		0,00	6,85 <sup>a</sup>	+
<b>Scott A</b>	4	30	6,19 $\pm$ 0,73	0,00	6,19 <sup>a</sup>	-
		60		0,00	6,19 <sup>a</sup>	-
		90		0,00	6,19 <sup>a</sup>	-
	-20	30	7,13 $\pm$ 0,57	0,65 $\pm$ 0,91	6,48 $\pm$ 1,48 <sup>a</sup>	+
		60		0,90 $\pm$ 1,27	6,23 $\pm$ 1,84 <sup>a</sup>	+
		90		1,11 $\pm$ 1,57	6,02 $\pm$ 2,14 <sup>a</sup>	+

\*: Error estándar

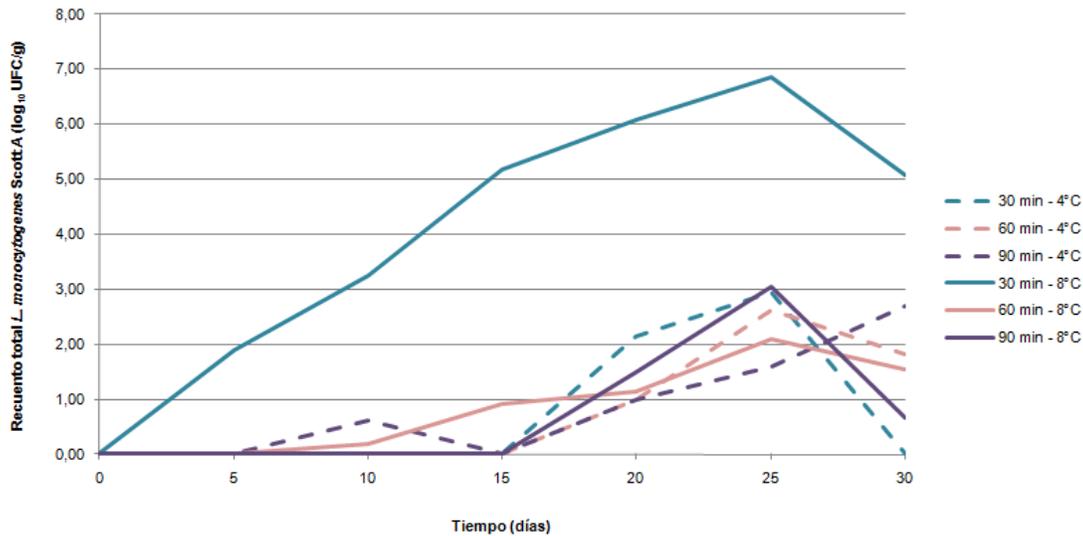
a-b: Letras diferentes en la misma columna corresponden a diferencias estadísticamente significativas ( $P<0,05$ )

#### **8.4. Evolución de *Listeria monocytogenes* en las muestras inoculadas durante su conservación en refrigeración**

##### **8.4.1. *Listeria monocytogenes* Scott A**

La Figura N° 5 muestra la evolución de la multiplicación de la cepa Scott A durante la conservación a 4 y 8°C de las muestras inicialmente refrigeradas. Teniendo en consideración lo establecido en el Reglamento N° 2073/2005 (Comisión de las Comunidades Europeas, 2005), que exige un recuento máximo de  $10^2$  UFC/g durante la vida comercial de los productos alimenticio, los mayores recuentos se alcanzaron en las muestras correspondientes al tratamiento de 30 min y almacenadas a 8°C, donde ya a partir del día 5 se superaron los  $2 \log_{10}$  UFC/g. Para el resto de los tratamientos dicho recuento se alcanzó entre los días 20 y 25. No obstante, tras el enriquecimiento en agua peptonada durante 24 h se evidenció la presencia de *Listeria* superviviente a partir del día 5 en todas las muestras.

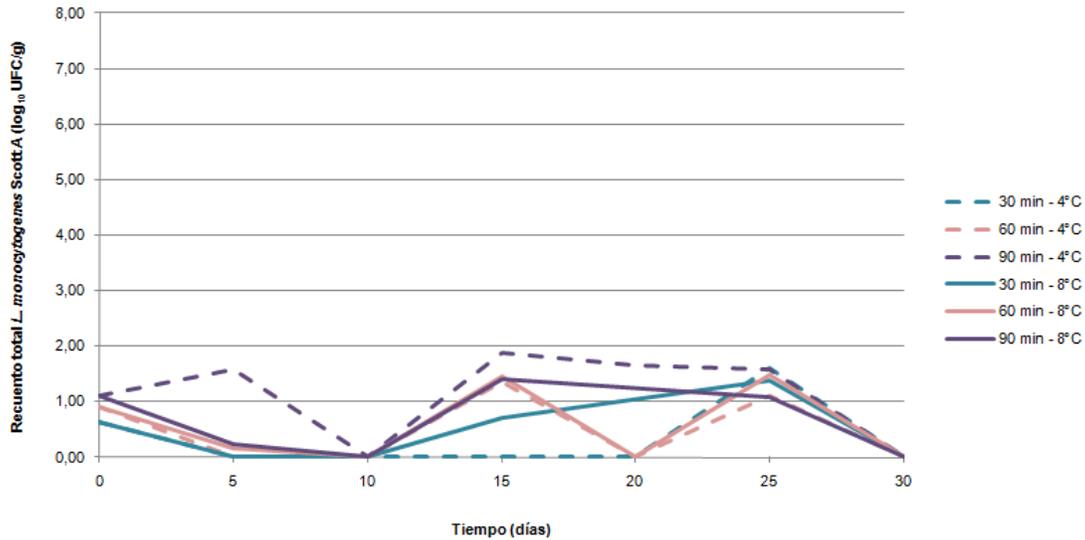
Se observó un efecto significativo ( $P=0,001$ ) de la temperatura de almacenamiento en la recuperación de los microorganismos a lo largo del tiempo sólo en las muestras tratadas durante 30 min.



**Figura N° 5:** Evolución del recuento total de *Listeria monocytogenes* Scott A en las muestras refrigeradas inoculadas tratadas a 60°C en función del tiempo de cocción aplicado y su posterior almacenamiento

En la Figura N° 6, se presenta la evolución del crecimiento de la cepa Scott A durante la conservación a 4 y 8°C de las muestras inicialmente congeladas. En este caso los 2 log<sub>10</sub> UFC/g no se superaron en ningún momento a lo largo de los 30 días de conservación. Sin embargo, tras el enriquecimiento del agua de peptona durante 24 h se evidenció la presencia de *Listeria* superviviente desde el inicio del estudio en todas las muestras.

La congelación tuvo un efecto significativo ( $P < 0,01$ ) únicamente en las muestras cocidas durante 30 min y almacenadas a 8°C, evidenciándose una disminución de su crecimiento a lo largo del tiempo.



**Figura N° 6:** Evolución del recuento total de *Listeria monocytogenes* Scott A en las muestras congeladas inoculadas tratadas a 60°C en función del tiempo de cocción aplicado y su posterior almacenamiento

En la Tabla N° 5, se muestran los valores de la velocidad máxima de multiplicación de *Listeria monocytogenes* Scott A en las muestras inicialmente refrigeradas, obtenidos con el programa DMFit, y la estimación de la vida útil en función del tiempo de cocción y su posterior conservación en refrigeración.

Tras la modelización se observó que las velocidades máximas de crecimiento para las muestras almacenadas a 4°C fueron  $0,17 \pm 0,004$ ;  $0,16 \pm 0,004$  y  $0,12 \pm 0,007$   $\log_{10}$  UFC/g/d; mientras que para las muestras mantenidas a 8°C estos valores fueron  $0,38 \pm 0,09$ ;  $0,13 \pm 0,008$  y  $0,26 \pm 0,002$   $\log_{10}$  UFC/g/d, para los tratamientos de 30, 60 y 90 min, respectivamente. Al mismo tiempo, la vida útil correspondiente a las muestras almacenadas a 4°C fue de 23,96; 24,50 y 27,67 días; mientras que para las muestras almacenadas a 8°C dichos valores fueron 5,26; 23,82 y 21,09 días; para los tratamientos aplicados durante 30, 60 y 90 min, respectivamente. Se obtuvieron diferencias significativas ( $P=0,001$ ) sólo en las muestras tratadas durante 30 min, obteniéndose una menor vida útil en las muestras almacenadas a 8°C.

En el caso de las muestras previamente congeladas el ajuste a los modelos no pudo realizarse debido a que las muestras no mostraron un crecimiento importante a lo largo del estudio, no superándose los 2 log<sub>10</sub> UFC/g en ningún caso.

**Tabla Nº 5:** Velocidad máxima de crecimiento de *Listeria monocytogenes* Scott A y estimación de la vida útil en las muestras refrigeradas inoculadas tratadas a 60°C en función del tiempo de cocción y su posterior almacenamiento

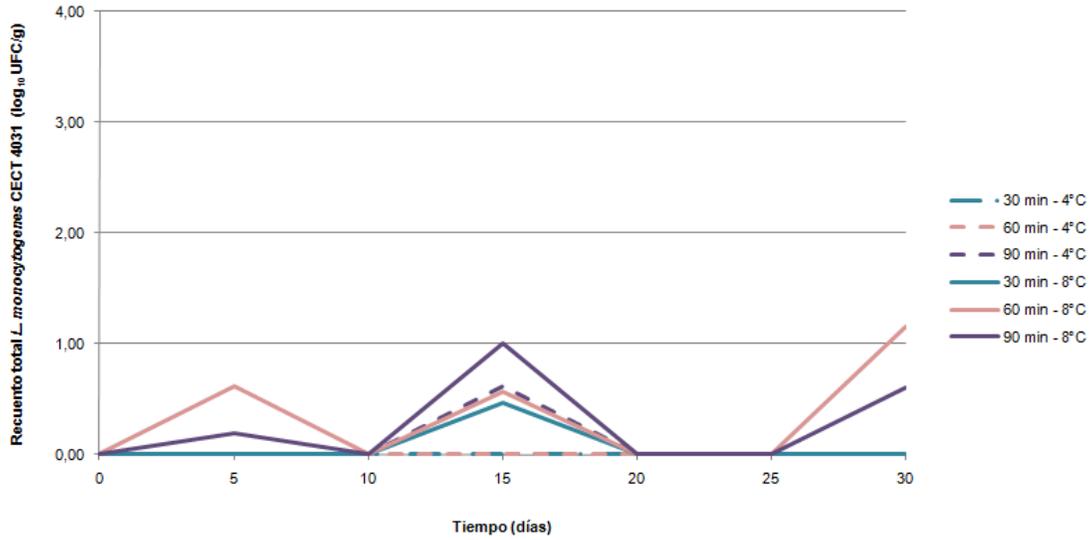
TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN (°C)	TIEMPO DE COCCIÓN (min)	VELOCIDAD MÁXIMA DE CRECIMIENTO ( $\mu$ max) $\pm$ SE*	VIDA ÚTIL (días)	
			MEDIA	INTERVALO DE CONFIANZA (95%)
4	30	0,17 $\pm$ 0,004	23,96 <sup>a</sup>	23,77–24,15
	60	0,16 $\pm$ 0,004	24,50 <sup>a</sup>	24,31–24,69
	90	0,12 $\pm$ 0,007	27,67 <sup>a</sup>	27,29–28,05
8	30	0,38 $\pm$ 0,09	5,26 <sup>b</sup>	4,33–6,19
	60	0,13 $\pm$ 0,008	23,82 <sup>a</sup>	23,45–24,19
	90	0,26 $\pm$ 0,002	21,09 <sup>a</sup>	21,01–21,17

\*: Error estándar

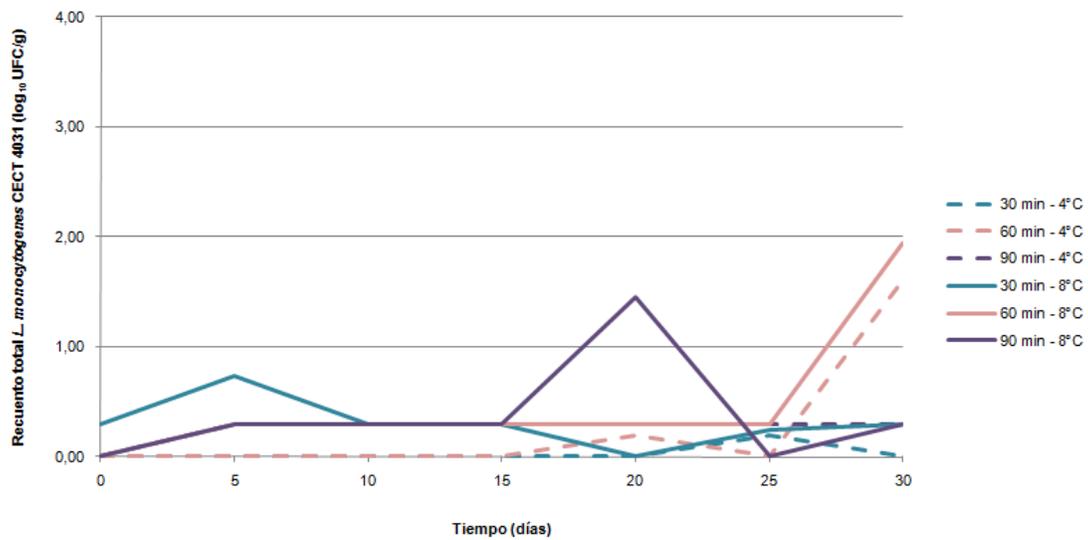
a-b: Letras diferentes en la misma columna corresponden a diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ )

#### 8.4.2. *Listeria monocytogenes* CECT 4031

En las Figuras Nº 7 y 8, se observa la evolución de *Listeria monocytogenes* CECT 4031 luego del tratamiento térmico y su posterior conservación a 4 y 8°C para las muestras refrigeradas y congeladas, respectivamente. Se evidenció que los recuentos finales de las muestras conservadas tanto a 4 como a 8°C, no superaron nunca los 2 log<sub>10</sub> UFC/g. Ello puede ser debido a la acción estresante del tratamiento térmico sobre *Listeria*, que limita su desarrollo incluso a 8°C, no apreciándose diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) independientemente del tratamiento térmico aplicado.



**Figura Nº 7:** Evolución del recuento total de *Listeria monocytogenes* CECT 4031 en las muestras refrigeradas inoculadas tratadas a 60°C en función del tiempo de cocción aplicado y su posterior almacenamiento



**Figura Nº 8:** Evolución del recuento total de *Listeria monocytogenes* CECT 4031 en las muestras congeladas inoculadas tratadas a 60°C en función del tiempo de cocción aplicado y su posterior almacenamiento

La modelización de la multiplicación de la cepa CECT 4031 en el programa DMFit, no pudo realizarse debido a que las muestras no mostraron un crecimiento importante a lo largo del estudio.

## 9. DISCUSIÓN

En el caso del recuento total de microorganismos aerobios mesófilos, tras la aplicación del tratamiento térmico a 60°C, durante 30, 60 y 90 min, no se obtuvieron diferencias significativas en las letalidades entre los tres tiempos empleados. Se observó que el tratamiento térmico no logró reducir en su totalidad a los microorganismos aerobios mesófilos, obteniéndose una recuperación de ellos a lo largo del tiempo, mayormente en las muestras almacenadas a 8°C. Según Díaz (2009), los microorganismos aerobios mesófilos, psicrófilos y enterobacterias son los principales grupos de microorganismos que, a priori, podrían alterar la carne cocinada refrigerada, y son relativamente poco resistentes al calor y suelen ser inactivados mediante pasteurización. Lo anterior explica la poca evolución de las muestras almacenadas a 4°C, no llegando en ningún momento del estudio a superar los niveles máximos establecidos. Por su parte las muestras almacenadas a 8°C, presentaron niveles superiores a los 5 log<sub>10</sub> UFC/g ya a partir del día 20, evidenciando el efecto significativo de la mayor temperatura de almacenamiento.

Nuestros resultados difieren a los obtenidos por Nyati (2000), quien estudió la calidad microbiológica de lomo de cerdo durante 5 semanas a 3 y 8°C, tras haber sido sometido a un tratamiento térmico de cocción al vacío de 68°C/2 minutos, obteniendo recuentos totales de 3 y 6 log<sub>10</sub> UFC/g en la quinta semana de estudio, respectivamente.

Por otro lado, en un estudio previo realizado en el Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos de la Universidad Autónoma de Barcelona, donde se estudió el efecto de la cocción al vacío en *Listeria monocytogenes* (Scott A y CECT 4031), inoculada en carne de cerdo, así como en la microbiota habitual (microorganismos aerobios mesófilos), se aplicaron tratamientos en baño termostático a 60°C durante 30, 60 y 90 min, y luego las muestras fueron mantenidas a 4 y 8°C (Gutiérrez, 2011); se obtuvieron recuentos máximos en todas las muestras almacenadas a 4 y 8°C a partir del día 10-15 de almacenamiento. En otro ensayo anterior, donde se realizó un estudio de caducidad en pechugas de pollo cocidas al vacío en baño

termostático a 65°C durante 75 min y mantenidas a 4 y 10°C (Vila, 2010); se obtuvieron recuentos máximos en todas las muestras almacenadas a 4°C a partir del día 14, y en las muestras almacenadas a 10°C los resultados fueron bastante variables. En nuestro estudio, se alcanzaron recuentos superiores a 5 log<sub>10</sub> UFC/g únicamente en las muestras almacenadas a 8°C. Por su parte, las velocidades máximas de multiplicación obtenidas en el tratamiento térmico en baño fueron mayores que las obtenidas en horno. Lo anterior indicaría, que el tratamiento térmico en horno retarda la recuperación de los microorganismos aerobios mesófilos durante más tiempo que el tratamiento en baño. Ésto podría deberse a la homogeneidad del tratamiento en horno, lo que difiere de lo ocurrido en baño; donde el efecto térmico varía en función de la situación de las bolsas respecto al foco de calor, así como también en función del número de muestras dentro del baño. Otro factor a tener en consideración es el efecto diferencial de la penetración del calor en las muestras, observándose una menor jugosidad en las tratadas en horno.

Según nuestro estudio, la determinación de la vida útil de las muestras dependería principalmente de la evolución de los microorganismos aerobios mesófilos, debido a su mayor desarrollo durante la conservación bajo refrigeración. De acuerdo con Díaz (2009), los tres factores que determinan la seguridad microbiológica de los alimentos cocinados al vacío son: la intensidad del tratamiento térmico, la rapidez de enfriamiento y las condiciones de almacenamiento (temperatura y tiempo).

En el caso de *Listeria monocytogenes*, la letalidad obtenida en los tres tiempos de cocción estudiados para las muestras inicialmente refrigeradas a 4°C y las congeladas a -20°C lograron alcanzar las 6 log<sub>10</sub> UFC/g en ambas cepas. Estos datos concuerdan con los obtenidos en el estudio previo realizado por Gutiérrez (2011), en baño termostático, a excepción del tratamiento de 30 min para la cepa Scott A, donde la letalidad que obtuvo fue sólo de 1 log<sub>10</sub> UFC/g. También concuerdan con los resultados obtenidos por Planas (2011), quien en un estudio realizado anteriormente, estudió la letalidad de *Listeria monocytogenes* CECT 4031 inoculada en pechugas de pollo y cocidas en baño termostático a 65°C durante 75 min; obteniendo una letalidad de 5,21 log<sub>10</sub> UFC/g. Según estos resultados, se

podría decir que la letalidad obtenida fue la óptima para ambos tratamientos térmicos (horno y baño), según las indicaciones que entrega *The National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods* (NACMF), el cual recomienda que se apliquen tratamientos que demuestren una reducción decimal de al menos 4 unidades logarítmicas para *Listeria monocytogenes* en la carne de animales de abasto y de pollo (Anónimo, 1991).

En cuanto a la recuperación de *Listeria monocytogenes* Scott A durante su conservación en refrigeración, las muestras inicialmente refrigeradas y tratadas durante 30 min, alcanzaron los 2 log<sub>10</sub> UFC/g a partir del día 5. El resto de los tratamientos lo hizo entre los días 20 y 25, observándose un efecto significativo de la temperatura de conservación, únicamente en las muestras tratadas durante 30 min, reduciendo de esta forma la vida útil de las muestras conservadas a 8°C. Se debe tener en consideración que, probablemente, dicho tratamiento no produjo una lesión severa en las células, mejorando así su capacidad de recuperación y proliferación durante el almacenamiento a temperatura de abuso. Hansel y Knøchel (2001), expusieron el posible crecimiento de células de *Listeria monocytogenes* lesionadas térmicamente, en alimentos que se cocinan dentro de sus envases, como los productos *sous-vide*. Así, en su estudio realizado con *Listeria monocytogenes* 13-249 utilizando un tratamiento térmico de 60°C, compararon la evolución del microorganismo a partir de células levemente lesionadas (95-99%), moderadamente lesionadas (99-99,99%) y severamente lesionadas (≥99,99%); observándose que sólo estas últimas no sobrepasaron los 2 log<sub>10</sub> UFC/g al final del estudio.

En el estudio previo realizado en baño termostático (Gutiérrez, 2011), las muestras inicialmente refrigeradas de la cepa Scott A, alcanzaron los 2 log<sub>10</sub> UFC/g a partir del día 5 en todos los tratamientos, a excepción de las muestras tratadas durante 60 min y conservadas a 4°C. Lo anterior indica que el tratamiento térmico realizado en horno retarda significativamente la recuperación de *Listeria monocytogenes* Scott A durante su almacenamiento en refrigeración.

Por otro lado, en las muestras inicialmente congeladas de esta cepa, dicho recuento no se alcanza en ningún momento. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Gutiérrez (2011). Al comparar la materia prima inicialmente refrigerada con la congelada, se observaron diferencias significativas únicamente en las muestras tratadas durante 30 min y almacenadas a 8°C, retardando el crecimiento de las muestras que fueron sometidas a congelación. La mayor sensibilidad a los tratamientos térmicos causada por el efecto de las bajas temperaturas fue descrita también por Miller *et al.* (2000), quienes determinaron que un *shock* de frío en *Listeria monocytogenes* Scott A antes de un tratamiento térmico a 60°C, redujo hasta un 45% el valor D. Por su parte Beales (2004), indica que a medida que la temperatura del *shock* en frío disminuye, la tasa de crecimiento y el número de células finales disminuye.

En el caso de la cepa CECT 4031 tanto para las muestras inicialmente refrigeradas como congeladas, el tratamiento térmico fue notoriamente efectivo, ya que no se superaron los 2 log<sub>10</sub> UFC/g; evidenciando que la cocción alteró significativamente el desarrollo de esta cepa durante los 30 días de almacenamiento tanto a 4 como a 8°C. En el estudio realizado por Gutiérrez (2011) en baño termostático, ya a partir del día 5 se observó una recuperación de la cepa, alcanzando niveles superiores a los 2 log<sub>10</sub> UFC/g, tanto en la materia prima previamente refrigerada como congelada. Al mismo tiempo, en el estudio realizado por Planas (2010), las muestras almacenadas a 4°C alcanzaron dicho recuento a partir del día 14 y las mantenidas a 10°C a partir del día 7. Lo anterior indica que el tratamiento térmico realizado en horno retarda significativamente la recuperación de *Listeria monocytogenes* 4031 durante su almacenamiento en refrigeración.

Debido a la efectividad del tratamiento, no se observaron mayores diferencias entre las muestras refrigeradas y congeladas previamente a la cocción para el caso de la cepa CECT 4031. Esto difiere del estudio realizado por Gutiérrez (2011), donde se concluyó que la congelación retardó la recuperación de esta cepa, no obstante, en dicho estudio se evidenció una mayor sensibilidad a la congelación en la cepa Scott A.

La respuesta de los microorganismos al tratamiento térmico depende de varios factores, como la cepa, el tipo de tratamiento térmico y el estrés provocado (Lin y Chou, 2004). En nuestro estudio la cepa CECT 4031 (serovar 1a) mostró un comportamiento diferente a la cepa Scott A (serovar 4b), evidenciándose una mayor resistencia térmica en esta última cuando la materia prima no había sido sometida a una congelación previa. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos tras el ensayo realizado en baño termostático por Gutiérrez (2011). Es así como la cepa patógena (Scott A) sería un mejor indicador microbiológico que la cepa no patógena (CECT 4031) en cuanto a la extensión de la vida comercial del producto.

## 10. CONCLUSIONES

- ◆ La letalidad de *Listeria monocytogenes* fue superior a  $6 \log_{10}$  UFC/g en todos los tiempos de cocción, tanto para las muestras refrigeradas como congeladas, en ambas cepas estudiadas (CECT 4031 y Scott A), indicando que el tratamiento térmico utilizado por el método *sous-vide* tuvo un efecto significativo en la letalidad de las bacterias, sin embargo, la inactivación total no se consiguió, ya que hubo crecimiento tras la incubación en algunas de las muestras.
- ◆ La congelación previa al tratamiento térmico redujo significativamente la capacidad de recuperación y posterior multiplicación de la cepa Scott A de *Listeria monocytogenes*. No obstante, en la cepa CECT 4031 no se observó el mismo efecto, probablemente asociado a su mayor sensibilidad a la temperatura.
- ◆ Para las muestras tratadas a 60°C durante 60 o 90 min, el indicador para determinar la vida útil es el recuento total de aerobios mesófilos, mientras que para las muestras tratadas a 60°C durante 30 min, el microorganismo indicador es *Listeria monocytogenes* (cepa Scott A), especialmente cuando la temperatura de conservación no se mantiene escrupulosamente inferior o igual a 4°C.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

**ADAMS, M.R.; MOSS, M.O.** 2000. Bacterial Agents of Foodborne Illness. **In:** Food Microbiology. Segunda Edición. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, Reino Unido. pp: 184-270.

**ANÓNIMO.** 1991. Recommendations of the US National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods: I HACCP principles, II meat and poultry, III seafood. Food Control (2): 202-211.

**ARMSTRONG, G.; McILVEEN, H.** 2000. Effects of prolonged storage on the sensory quality and consumer acceptance of sous vide meat-based recipe dishes. Food Qual Prefer (11): 377-385.

**BARANYI, J.; ROBERTS, T.** 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Int J Food Microbiol (23): 277-294.

**BEALES, N.** 2004. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. Compr Rev Food Sci Food Saf 3: 1-20.

**BLANCO, M.** 1994. Recuperación de *Listeria monocytogenes* dañada subletalmente por efecto de la congelación. Memoria Doctor en Veterinaria. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Patología Animal I. 118 p.

**CANADÁ, HEALTH CANADA.** 2010. DRAFT, Policy on *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods. 22 marzo 2010. 47 p.

**CHILE, MINISTERIO DE SALUD (MINSAL).** 1997. Decreto Supremo N° 977/96 Reglamento Sanitario de los Alimentos. 13 mayo 1997. 172 p.

**CHILE, MINISTERIO DE SALUD (MINSAL).** 2004. Decreto Supremo N° 158/2004. Reglamento sobre notificación de enfermedades transmisibles de declaración obligatoria. 22 octubre 2004. 6 p.

**COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.** 2005. Reglamento (CE) N° 2073/2005 de La Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. 22 diciembre 2005. 33 p.

**CREED, P. G.** 1995. "Sous vide" review. The sensory and nutritional quality of "sous vide" foods. Food Control 6 (1): 45-52.

**DE BAERDEMAEKER, J.; NICOLAÏ, B. J.** 1995. Equipment considerations for sous vide cooking. Food Control 6 (4): 229-236.

**DÍAZ, P.; NIETO, G.; GARRIDO, M.; BAÑÓN, S.** 2008. Microbial, physical-chemical and sensory spoilage during the refrigerated storage of cooked pork loin processed by the *sous vide* method. Meat Sci (80): 287-292.

**DÍAZ, P.** 2009. Calidad y deterioro de platos "sous vide" preparados a base de carne y pescado y almacenados en refrigeración. Tesis Doctoral. Murcia, España. Universidad de Murcia, Departamento de Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología. 336 p.

**ESPAÑA, MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO.** 2000. Real Decreto 3484/2000 de 29 de diciembre por el que se establecen las normas de higiene para la elaboración, distribución y comercio de las comidas preparadas. 12 enero 2001.

**GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.** 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. Int J Food Microbiol (113): 1-15.

**GARCÍA, S.; HEREDIA, N.** 2009. Foodborne Pathogens and Toxins: An Overview. In: Microbiologically Safe Foods. Jhon Wiley & Sons, Inc. New Jersey, Estados Unidos de América. pp: 15-49.

**GHAZALA, S.; RAMASWAMY, H. S.; SMITH, J.P.; SIMPSON, M. V.** 1995. Thermal process simulations for *sous vide* processing of fish and meat foods. Food Res Int 28 (2): 117-122.

**GUTIÉRREZ, A.** 2011. Efecto de la cocción al vacío (*sous vide*) en la supervivencia de *Listeria monocytogenes* inoculada en carne de cerdo. Memoria Máster en Investigación en Ciencia Animal y de los Alimentos. Barcelona, España. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria, Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. 27 p.

**HANSEL, T. B.; KNØCHEL, S.** 2001. Factors influencing resuscitation and growth of heat injured *Listeria monocytogenes* 13-249 in *sous vide* cooked beef. Int J Food Microbiol (63): 135-147.

**LARRAÍN, D.; CARVAJAL, J.** 2008. Los aspectos fisiopatológicos y moleculares involucrados en el traspaso de *Listeria monocytogenes* a través de la barrera placentaria. (Una revisión bibliográfica). Santiago, Chile. Pontificia Universidad Católica de Chile, Escuela de Medicina. 11 p.

**LIN, Y.; CHOU, C.** 2004. Effect of heat shock on thermal tolerance and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to other environmental stresses. Food Microbiol (21): 605-610.

**LLEBARIA, X.; HERNÁNDEZ, M.; VILA, M.; BRUGUÉS, S.; CASTELLS, P.; PLANAGUMÁ, P.** 2012. Guia per a l'aplicació del sistema APPCC en cuina al buit. Barcelona, España. Planta de Tecnologia dels Aliments Universitat Autònoma de

Barcelona, Generalitat de Catalunya Agència Catalana de Seguretat Alimentària, Fundació Alícia. 46 p.

**MINISTERIO DE SALUD (MINSAL), DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGÍA.** 2012. Informe de Listeria. [en línea]. <[http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Listeriosis/Listeria\\_SE142012.pdf](http://epi.minsal.cl/epi/html/bolets/reportes/Listeriosis/Listeria_SE142012.pdf)> [consulta: 22-06-2012].

**MILLER, A. J.; BAYLES, D.; EBLEN, B. S.** 2000. Cold shock induction of thermal sensibility in *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 66 (10): 4345-4350.

**NYATI, H.** 2000. Survival characteristic and the applicability of predictive mathematical modelling to *Listeria monocytogenes* growth in sous vide products. Int J Food Microbiol (56): 123-132.

**ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN/ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (FAO/OMS).** 2004. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en los alimentos listos para el consumo. Informe técnico. Serie Evaluación de riesgos microbiológicos, N° 5. Roma, Italia.

**ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN/ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (FAO/OMS).** 2009. Codex Alimentarius, Higiene de los alimentos. Cuarta edición. Roma, Italia.

**PLANAS, M.** 2010. Efecte de la letalitat de la tècnica de cocció al buit (*sous vide*) en el pit de pollastre inoculat amb *Listeria monocytogenes* i *Salmonella enteritidis*. Memòria Màster Seguretat Alimentària. Barcelona, España. Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Veterinària, Departament de Ciència Animal y dels Aliments. 17 p.

**SCHELLEKENS, M.** 1996. New research issues in sous-vide cooking. Trends Food Sci Technol 7: 256-262.

**SERGELIDIS, D.; ABRAHIM, A.** 2009. Adaptative response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. Food Control (20): 1-10.

**SMITH, J.P.; TOUPIN, C.; GAGNON, B.; VOYER, R.; FISET, P. P.; SIMPSON, M.V.** 1990. A Hazard Analysis Critical Control Point Approach (HACCP) to ensure the microbiological safety of sous vide processed meat/pasta product. Food Microbiol (7): 177-198

**UNE-EN ISO 11290-2.** 2000. Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte 2: método de recuento.

**UNE-EN ISO 4833.** 2003. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30°C.

**VAN ASSELT, E. D., ZWIETERING, M. H.** 2006. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. Int J Food Microbiol (107): 73-82.

**VILA, M.** 2010. Estudio de vida comercial e inactivación térmica de fagos del proceso de cocción *sous-vide* para la pechuga de pollo. Memoria Máster en Seguridad Alimentaria. Barcelona, España. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria, Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. 19 p.