

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD VETERINARIA**



TESIS DOCTORAL

Uso de electrones acelerados para el control de *Clostridium tyrobutyricum* y *Listeria monocytogenes* en queso

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Raquel Velasco de Diego

Directores

**Juan Antonio Ordóñez Pereda
María Isabel Cambero Rodríguez
María Concepción Cabeza Briales**

Madrid

© Raquel Velasco de Diego, 2021

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

USO DE ELECTRONES ACELERADOS PARA EL
CONTROL DE *Clostridium tyrobutyricum* Y
Listeria monocytogenes EN QUESO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Raquel Velasco de Diego

Directores

Juan Antonio Ordóñez Pereda

María Isabel Cambero Rodríguez

María Concepción Cabeza Briales

Madrid, 2020



Sección Departamental de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria
Facultad de Veterinaria

Avda. Puerta de Hierro, s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 3749

El trabajo experimental que ha dado lugar a esta memoria ha sido realizado en la Sección Departamental de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, financiado por las siguientes entidades:

- Ministerio de Economía y Competitividad. Proyecto RTA-2013-00070-CO3-02. Eliminación de *Listeria monocytogenes* en jamón curado deshuesado mediante tecnologías no térmicas. Efecto en la respuesta al estrés y la virulencia.
- Banco Santander Central Hispano-Universidad Complutense. Financiación del Programa de Creación y Consolidación de Grupos de Investigación (GR03/10, 2019). Grupo Tecnología de Alimentos de Origen Animal (TECNOLALIMA), referencia 920276.

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, la autora fue contratada como investigadora asociada al proyecto RTA-2013-00070-CO3-02 y, desde 2014, es Profesora Asociada del área de Tecnología de los Alimentos.

PRESENTACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

La Tesis Doctoral «Uso de electrones acelerados para el control de *Clostridium tyrobutyricum* y *Listeria monocytogenes* en queso» se presenta en formato de publicaciones y comprende los siguientes artículos de investigación relacionados con el alcance de los objetivos planteados:

En relación con el control del hinchamiento tardío en quesos duros y semiduros,

- Velasco, R., Ordóñez, J.A., Cabeza, M.C., de la Hoz, L. y Cambero, M.I. (2011). Use of the E-beam radiation to diminish the late blowing of cheese. **International Dairy Journal**, 21:493-500.

En relación con el control de L. monocytogenes en quesos de pasta blanda,

- Velasco, R., Ordóñez, J.A., Cambero, M.I. y Cabeza, M.C. (2015). Use of the E-beam radiation to eliminate *Listeria monocytogenes* from surface-mould cheese. **International Microbiology**, 18:33-40.

En relación con el efecto del tratamiento con radiaciones ionizantes en las características fisicoquímicas y sensoriales de los quesos

- Velasco, R., Ordóñez, J.A., Cabeza, M.C. y Cambero, M.I. (2016). Effect of E-beam sanitation of surface mould cheese on texture and sensory attributes. **LWT-Food Science and Technology**, 70:1-8.
- Velasco, R., Ordóñez, J.A., Cabeza, M.C. y Cambero, M.I. (2019). The impact of E-beam treatment on the microbial population and sensory quality of hard annatto-coloured cheese. **LWT-Food Science and Technology**, 101:315-322.

Todos los artículos se han publicado en revistas científicas incluidas en el *Journal of Citations Report* (JCR) y cumplen con lo dispuesto en la *Normativa para la Presentación de Tesis Doctorales en Formato de Publicaciones* (Aprobada por la Comisión de Doctorado de la Facultad de Veterinaria con fecha 8 de julio de 2019).

AGRADECIMIENTOS

Llegar a este momento, tan cerca de poner el punto final a la memoria de la Tesis, es una gran oportunidad para echar la vista atrás y valorar todo lo que he aprendido gracias a las personas que fui encontrando por el camino. Vaya mi reconocimiento para todas ellas, pues si sus nombres no están entre estas líneas es más por una limitación de espacio que una muestra de ingratitud.

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directores de Tesis, los Profs. Juan Antonio Ordóñez, M^a Isabel Cambero y M^a Concepción Cabeza, su confianza, su valiosa orientación, sus sugerencias y su ayuda. Hago extensivo el agradecimiento, con un cálido recuerdo, al Prof. Lorenzo de la Hoz, pues los cuatro hicieron posible mi vuelta al Departamento.

Quisiera agradecer al Prof. Gonzalo García de Fernando, actual director de la Sección Departamental de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, la oportunidad de entrar a trabajar por primera vez en un laboratorio, todo lo que aprendí durante mis primeros pasos en investigación y, tiempo después, todo lo que sigo aprendiendo como docente. Mi agradecimiento también para la Prof^a. M^a Dolores Selgas, tutora de mi formación en el programa de Doctorado. A ambos, gracias por incluirme en el grupo de investigación TECNOLALIMA, del que son codirectores. Y gracias a la Prof^a. Marisa García, investigadora principal del subproyecto UCM del proyecto RTA-2013-00070-CO3-02, por contar conmigo para el contrato de investigación asociado al mismo.

Gracias a los miembros de las secciones de «Tecno» e «Higiene» —entre los que incluyo, claro está, a Aurora, Santiago, Andrés y Alberto— que a lo largo de estos años me han regalado su ayuda, consejos, buenos ratos y sus ánimos. Gracias, Belén y Carlos, por todos esos kilómetros que, café en mano, hemos recorrido juntos.

Y no puedo dejar pasar la ocasión de mostrar mi agradecimiento de forma muy especial a quienes me acompañan durante el viaje, compartiendo alegrías y ayudándome a salir de las tormentas que voy encontrando:

Gracias, Isa y Marta. Por todos los momentos compartidos. Por vuestra luz. Joaquín, gracias por las palabras, risas, pañuelos, trucos... ¡Por fin huele a fiesta!

Gracias, Conchita. Por tu inmensa generosidad. Por tu honestidad. Por tu cariño. Por estar siempre ahí... La suerte es mía.

Gracias, Químicos. Por tantas y tantas risas, charlas, ánimos, escapadas, sobremesas sin tiempos. Por la segunda generación. Por ser *famigos*.

Gracias, familia. Por vuestro cariño y calor. Y especialmente a mis padres, por sus enseñanzas en los buenos momentos y, sobre todo, en los más difíciles... Te sigo echando de menos. Mucho.

Después de una intensa búsqueda, no he encontrado palabras que puedan expresar toda la gratitud que siento hacia mi pequeña familia, mi piedra angular. Ángel, millones de gracias por tu apoyo, por multiplicarte y llegar a todo (y más allá) para que yo siguiese adelante. Y, encima, me haces feliz... Hugo y María, infinitas gracias por ser como sois. Por vuestro amor. Por todo lo vivido, por el presente y por lo que vendrá. Os quiero.

En definitiva, «*Gracias a la vida, que me ha dado tanto...*».

Si vas a emprender el viaje hacia Ítaca
pide que tu camino sea largo,
rico en experiencia, en conocimiento.

A lestrigones y a cíclopes,
o al airado Poseidón nunca temas;
no hallarás tales seres en tu ruta
si alto es tu pensamiento y limpia
la emoción de tu espíritu y tu cuerpo.

Ni a lestrigones ni a cíclopes,
ni al fiero Poseidón hallarás nunca
si no los llevas dentro de tu alma,
si no es tu alma quien ante ti los pone.

Pide que tu camino sea largo;
que numerosas sean las mañanas de verano
en que con placer, felizmente,
arribes a bahías nunca vistas;
detente en los emporios de Fenicia
y adquiere hermosas mercancías,
madreperlas y coral, y ámbar y ébano,
perfumes deliciosos y diversos,
cuanto puedas invierte en voluptuosos y delicados perfumes;
visita muchas ciudades de Egipto
y con avidez aprende de sus sabios.

Ten siempre a Ítaca en la memoria.
Llegar allí es tu meta,
mas no apresures el viaje.
Mejor que se extienda largos años
y en tu vejez arribes a la isla
con cuanto hayas ganado en el camino,
sin esperar que Ítaca te enriquezca.
Ítaca te regaló un hermoso viaje.
Sin ella el camino no hubieras emprendido.
Mas ninguna otra cosa puede darte.
Aunque pobre la encuentres, no te engañará Ítaca.
Rico en saber y vida, como has vuelto,
comprendes ya qué significan las Ítacas.

A Hugo, María y Ángel

ÍNDICES

ÍNDICE

Lista de figuras	5
Lista de tablas	7
Lista de abreviaturas y acrónimos	9
RESUMEN	11
SUMMARY	17
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1. El queso	25
1.1.1. Definición del queso	25
1.1.2. Antecedentes históricos y situación actual	26
1.1.3. Elaboración del queso	30
1.1.3.1. Composición general de la leche	30
1.1.3.2. Proceso general de elaboración del queso	33
1.1.3.3. Procedencia y control de la microbiota de la leche	34
1.1.3.4. Cuajada: coagulación de la leche y desuerado	39
1.1.3.5. Queso: moldeado, salado y maduración	42
1.1.4. Proceso de elaboración del queso Cheddar, queso semiduro de pasta prensada y quesos de pasta blanda madurados por moho superficial ..	44
1.2. Principales defectos de los quesos	46
1.2.1. Hinchamiento tardío de quesos duros y semiduros	48
1.2.2. Bacterias ácido butíricas (BAB)	50
1.2.3. Estrategias para el control del hinchamiento tardío	51
1.2.3.1. Prevención de la contaminación de la leche en la granja	52
1.2.3.2. Reducción del número de esporas de BAB en la leche	53
1.2.3.3. Prevención de la germinación y crecimiento de las BAB durante la maduración	54
1.3. Microorganismos patógenos potencialmente presentes en quesos	56
1.3.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	57
1.3.2. Listeriosis	59
1.3.3. Crecimiento y supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> en queso	62

1.3.4. Control de <i>L. monocytogenes</i> en la industria quesera	63
1.3.4.1. <i>Listeria monocytogenes</i> en leche cruda	64
1.3.4.2. Pasteurización de la leche	64
1.3.4.3. Control de la contaminación durante la elaboración del queso	65
1.3.4.4. Higienización del producto final	65
1.4. Irradiación de alimentos	67
1.4.1. Principios básicos de los aceleradores de electrones	73
1.4.2. Efecto de las radiaciones ionizantes en los microorganismos	75
1.4.3. Efecto de las radiaciones ionizantes en los alimentos y sus componentes	80
1.4.3.1. Efecto en los componentes de los alimentos	80
1.4.3.2. Toxicología de los productos radiolíticos	86
1.4.3.3. Calidad sensorial de los productos lácteos irradiados	88
1.4.4. Marco legal y situación actual de la irradiación de alimentos	90
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	95
3. METODOLOGÍA	103
3.1. Material general	105
3.1.1. Material y equipos de laboratorio	105
3.1.2. Reactivos y medios de cultivo	105
3.1.3. Microorganismos	108
3.1.3.1. Preparación de inóculos de <i>Listeria</i> spp.	109
3.1.3.2. Preparación de suspensión de esporas de <i>C. tyrobutyricum</i>	109
3.1.4. Tipos de quesos empleados	110
3.1.4.1. Quesos de pasta blanda	110
3.1.4.2. Quesos duros y semiduros	110
3.2. Preparación de las muestras	111
3.3. Tratamiento con electrones acelerados	112
3.4. Análisis microbiológicos	113
3.4.1. Cinética de destrucción de <i>Listeria</i> spp. y <i>C. tyrobutyricum</i> por las radiaciones ionizantes	113
3.4.2. Evolución de la microbiota del queso durante el almacenamiento	114

3.5. Análisis fisicoquímicos	115
3.5.1. Determinación de la composición química	115
3.5.1.1. Humedad	115
3.5.1.2. Cenizas	116
3.5.1.3. Grasa	116
3.5.1.4. Proteína	116
3.5.2. Actividad de agua (a_w)	117
3.5.3. pH	117
3.6. Estudio de las propiedades sensoriales	118
3.6.1. Determinación instrumental del color	118
3.6.2. Determinación instrumental de la textura	119
3.6.2.1. Análisis del perfil de textura	120
3.6.2.2. Ensayo de penetración	122
3.6.3. Análisis sensorial	123
3.7. Análisis estadístico	124
3.7.1. Resultados de los análisis microbiológicos	124
3.7.2. Resultados de los análisis fisicoquímicos	124
3.7.3. Resultados de la determinación instrumental del color y textura	124
3.7.3.1. Regresión múltiple: Modelo cuadrático de superficie de respuesta	126
3.7.3.2. Análisis de componentes principales y análisis de conglomerados	126
3.7.4. Resultados del análisis sensorial	127
4. RESULTADOS	129
ARTÍCULO 1. Use of the E-beam radiation to diminish the late blowing of cheese	131
ARTÍCULO 2. Use of the E-beam radiation to eliminate <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> from surface mould cheese	141
ARTÍCULO 3. Effect of E-beam sanitation of surface mould cheese on texture and sensory attributes	151
ARTÍCULO 4. The impact of E-beam treatment on the microbial population and sensory quality of hard annatto-coloured cheese	163

5. DISCUSIÓN INTEGRADORA	177
5.1. Preámbulo	179
5.2. Control del hinchamiento tardío de los quesos	183
5.3. Higienización, con respecto a <i>L. monocytogenes</i> , de quesos de pasta blanda madurados superficialmente por mohos	188
5.4. Efecto del tratamiento con radiaciones ionizantes en las características fisicoquímicas y en la microbiota láctica	198
5.4.1. Efecto del tratamiento con electrones acelerados en la a_w y pH del queso	198
5.4.2. Respuesta de las BAL frente al tratamiento con electrones acelerados..	199
5.5. Efecto del tratamiento en las propiedades sensoriales	203
5.6. Consideraciones finales	211
6. CONCLUSIONES	215
7. BIBLIOGRAFÍA	219

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1** Signos cuneiformes para el queso y grasa láctea en una tablilla sumeria del periodo Uruk IV (3100-3000 a. n. e.).
- Figura 1.2** Evolución (1961-2014) de la producción de queso, en millones de toneladas, en los distintos continentes.
- Figura 1.3** Distribución mundial de la producción y el suministro per cápita de queso en 2013.
- Figura 1.4** Esquema general del proceso de elaboración de queso.
- Figura 1.5** Número de notificaciones registradas en la Red de Alerta Alimentaria de la Unión Europea debidas a la contaminación de queso con bacterias patógenas durante 1983-2019.
- Figura 1.6** Evolución (2007-2018) de los casos confirmados de listeriosis en la Unión Europea.
- Figura 1.7** Plano general (izquierda) y transversal (derecha) de una planta de irradiación equipada con un acelerador de electrones Rhodotron.
- Figura 1.8** Acelerador de electrones Rhodotron TT200 y trayectoria del haz en su interior.
- Figura 1.9** Ruta de formación de las 2-ACB.
- Figura 3.1** Imagen de un acelerador de electrones (izquierda) y corte longitudinal del mismo (centro). Representación transversal de su estructura y recorrido de los electrones en el interior hasta su salida (derecha)
- Figura 3.2** Representación gráfica del sistema CIE*Lab*.
- Figura 3.3** Representación gráfica de un ensayo del análisis del perfil de textura (TPA).
- Figura 3.4** Corte transversal de queso Camembert.
- Figura 3.5** Representación gráfica de un ensayo de penetración (curva de deformación).
- Figura 5.1** Definición del concepto de ventana de tratamiento de irradiación.

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.1** Composición química típica (g/100 g) de la leche de distintas especies y producción mundial de queso (%) que se fabrica con cada tipo de leche.
- Tabla 1.2** Características de los cultivos iniciadores para la elaboración de queso.
- Tabla 1.3** Guía para la evaluación de la calidad global de los quesos.
- Tabla 1.4** Condiciones aproximadas de maduración de quesos susceptibles de presentar hinchamiento tardío.
- Tabla 1.5** Concentración de BAB en tanques de leche cruda de distintas especies.
- Tabla 1.6** Brotes de listeriosis asociados al consumo de queso (1983-2019).
- Tabla 1.7** Dosis requeridas en las principales aplicaciones de la irradiación de alimentos.
- Tabla 1.8** Tipos y características de las radiaciones ionizantes aplicables en alimentos.
- Tabla 1.9** Radiorresistencia (valores D) de microorganismos en diversos productos lácteos.
- Tabla 1.10** Hidrocarburos y 2-alkilciclobutanonas (2-ACB) producidos por la radiolisis de los principales ácidos grasos presentes en los alimentos.
- Tabla 1.11** Lista de alimentos o ingredientes cuya irradiación está autorizada en algunos países de la UE y en Reino Unido a la dosis máxima absorbida que se indica (kGy).
- Tabla 3.1** Relación de equipos de laboratorio.
- Tabla 3.2** Medios de cultivo empleados.
- Tabla 3.3** Microorganismos empleados en los estudios de inactivación bacteriana.
- Tabla 3.4** Condiciones generales de los experimentos del plan de trabajo.
- Tabla 3.5** Condiciones de incubación para el recuento microbiológico.
- Tabla 3.6** Niveles de los factores implicados en el estudio de los parámetros de color y textura.

- Tabla 5.1** Límites máximos de *L. monocytogenes* de acuerdo al criterio microbiológico de la UE para alimentos RTE.
- Tabla 5.2** Parámetros de seguridad alimentaria para la higienización con respecto a *L. monocytogenes* de quesos Camembert (C) y Brie (B) de acuerdo a las reglamentaciones de la UE y EE. UU.
- Tabla 5.3** Evolución de la microbiota de los quesos irradiados a 4 y 14 °C.
- Tabla 5.4** Análisis conjunto del efecto del tratamiento con electrones acelerados (dosis aplicada) y del almacenamiento (tiempo y temperatura) en los atributos sensoriales de distintos tipos de queso.
- Tabla 5.5** Tratamientos de irradiación recomendados para la consecución de objetivos sanitarios o tecnológicos con mínimos efectos sensoriales.

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

2-ACB	2-alquilciclobutanonas
<i>a*</i>	Tendencia al rojo, en el sistema de color CIE <i>Lab</i>
a. n. e.	Antes de nuestra era
ALOP	<i>Appropriate level of protection</i> (nivel de protección adecuado)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (análisis de varianza)
APH	Altas presiones hidrostáticas
<i>a_w</i>	Actividad de agua
<i>b*</i>	Tendencia al amarillo, en el sistema de color CIE <i>Lab</i>
BAB	Bacterias ácido butíricas
BAL	Bacterias ácido lácticas
BPH	Buenas prácticas higiénicas
CCP	<i>Colloidal calcium phosphate</i> (fosfato cálcico coloidal)
CE	Comisión Europea
CIE	<i>Commission Internationale de l'Éclairage</i> (Comisión Internacional de Iluminación)
COP	<i>Cholesterol oxidation products</i> (óxidos de colesterol)
CP	Criterio de proceso
CR	Criterio de rendimiento
d. n. e.	De nuestra era
DOP	Denominación de origen protegida
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
EMP	Emden-Mayerhof-Parnas
ESR	<i>Electron spin resonance</i> (resonancia de espín electrónico)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSO	<i>Food safety objective</i> (objetivo de seguridad alimentaria)
<i>g</i>	Gravedad
Galactosa-6-P	Galactosa-6-fosfato
Gliceraldehído-3-P	Gliceraldehído-3-fosfato
Glucosa-6-P	Glucosa-6-fosfato

HCA	<i>Hierarchical cluster analysis</i> (Análisis jerárquico de conglomerados)
HTST	<i>High temperature, short time</i>
kGy	Kilogray
<i>L*</i>	Luminosidad, en el sistema de color CIE <i>Lab</i>
LBD	<i>Late blowing defect</i> (hinchamiento tardío)
LPS	Sistema lactoperoxidasa
MDA	Malondialdehído
Met	Metionina
MeV	Megaelectronvoltio
Mpb	Megapares de bases
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
OIEA	Organismo Internacional de Energía Atómica
OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	Objetivo de rendimiento
PCA	<i>Plate count agar</i> (agar de recuento en placa)
Phe	Fenilalanina
RASFF	<i>Rapid Alert System for Food and Feed</i> (Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos)
RCM	<i>Reinforced clostridial medium</i> (medio reforzado para clostridios)
RTE	<i>Ready to eat</i> (listo para el consumo)
TBA	<i>Thiobarbituric acid</i> (ácido tiobarbitúrico)
TPA	<i>Texture profile analysis</i> (análisis del perfil de textura)
TSA	<i>Tryptic soy agar</i> (agar tripticaseína soja)
TSB	<i>Tryptic soy broth</i> (caldo tripticaseína soja)
UDP-galactosa	Uridina difosfato galactosa
ufc	Unidad formadora de colonias
ufp	Unidad formadora de placas
UHT	<i>Ultra high temperature</i>

RESUMEN

Uso de electrones acelerados para el control de *Clostridium tyrobutyricum* y *Listeria monocytogenes* en queso

Introducción

El queso puede definirse como el alimento que resulta de la acidificación de la leche por bacterias lácticas (p. ej., lactococos, estreptococos y lactobacilos) y posterior coagulación de las caseínas por enzimas coagulantes (p. ej., quimosina, cipsosina y cuajos recombinantes), seguido del corte del gel formado (cuajada) y su desuerado, que posteriormente se moldea, prensa y sala y se somete a maduración durante un tiempo variable dependiendo del tipo de queso, desde fresco de consumo inmediato (p. ej., queso de Burgos y Villalón) hasta varios meses (la mayoría) e incluso años (p. ej., Grana Padano). La microbiota que participa en la acidificación y maduración (láctica, fúngica, etc.), las operaciones efectuadas en la cuajada (coagulación láctica o enzimática, corte, cocción, deshidratación, etc.) y las condiciones de maduración (tiempo, humedad y temperatura) determinan las características propias de cada variedad de queso.

En esta tesis se abordaron dos problemas, uno de carácter tecnológico con graves repercusiones económicas; se trata de la alteración que se ha definido como hinchamiento tardío (conocido en inglés por LBD, *late blowing defect*) de quesos duros y semiduros, causada por la fermentación butírica de *Clostridium tyrobutyricum* y especies afines. El otro problema, de tipo sanitario, se refiere a la posible presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos, especialmente en los de pasta blanda.

Para resolver ambos problemas se recurrió a la aplicación de radiaciones ionizantes, en la modalidad de electrones acelerados. Es una tecnología no térmica que se ha mostrado eficaz, por una parte, para ampliar la vida útil de ciertos alimentos al reducir el número de microorganismos alterantes y, por otra, para eliminar microorganismos patógenos no esporulados hasta niveles seguros (ALOP,

del inglés *Appropriate Level Of Protection*) en una gran variedad de alimentos listos para el consumo (RTE, del inglés *ready-to-eat*).

Objetivo principal

Establecer la viabilidad del tratamiento con electrones acelerados para evitar, por un lado, el hinchamiento tardío de los quesos y, por otro, conseguir la higienización de quesos de pasta blanda respecto a *L. monocytogenes*.

Metodología

Para llevar a cabo los estudios que se recogen en esta tesis se han elegido dos tipos de quesos; uno entre los clasificados como blandos (humedad > 40%), de cuajada láctica y maduración superficial por mohos (Camembert y Brie) y el otro entre los semiduros/duros (humedad de 36-40%) de cuajada enzimática (tipo Cheddar y de pasta prensada).

Las muestras se trataron en la planta IONISOS IBERICA S.A. (Tarancón) con un generador de electrones acelerados (tipo Rhodotron) a dosis entre 0,2 y 8 kGy, en función del aspecto a analizar. Alícuotas de quesos se contaminaron con *C. tyrobutyricum*, *L. monocytogenes* o *L. innocua* y se irradiaron a diferentes dosis para establecer la cinética de muerte de dichos microorganismos. Asimismo, en muestras control (sin contaminar) se estudió la evolución durante el almacenamiento de la microbiota superviviente (recuentos en medio PCA), de las características fisicoquímicas (pH y actividad de agua, a_w), los parámetros de color (sistema CIELab, L^* , a^* y b^*) y se analizó el perfil de textura (TPA). Finalmente, se llevaron a cabo pruebas triangulares y de ordenación para establecer la calidad sensorial de los quesos irradiados.

Resultados

Los resultados se recogen, resumidamente, en los siguientes puntos:

- La aplicación de radiaciones ionizantes a quesos semiduros con dosis de 3 kGy ocasionó una reducción del 96% del número de esporas de *C. tyrobutyricum*, lo que permite evitar, o al menos minimizar, el hinchamiento tardío.
- La eliminación de *L. monocytogenes* hasta niveles seguros en quesos Camembert y Brie de acuerdo al criterio de la UE (100 ufc/g) y al de «ausencia en 25 g» de algunos países (p. ej. EE. UU.) se logró con tratamientos con electrones acelerados de 1,28 kGy y 2,60 kGy, respectivamente.
- Los recuentos de bacterias lácticas en los quesos irradiados disminuyeron de forma proporcional a la dosis aplicada (entre 1,5 unidades logarítmicas con 1 kGy y 4,5 con 3 kGy). No obstante, la población superviviente se recuperó durante el almacenamiento tanto a 4 °C como a 14 °C hasta alcanzar los niveles iniciales en los quesos tipo Cheddar y semiduros de pasta prensada tratados con dosis de hasta 2 kGy. En los quesos Camembert y Brie, la recuperación solo se logró a 14 °C.
- Los efectos del tratamiento con electrones acelerados en las propiedades fisicoquímicas (pH y a_w) del queso fueron insignificantes.
- La evolución de los parámetros de textura y color de los quesos irradiados fue dependiente del efecto combinado de la dosis aplicada y las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura). El tiempo de exposición al aire tras la apertura del envase afectó significativamente ($p < 0,05$) a los parámetros colorimétricos.
- Las radiaciones ionizantes produjeron olores y sabores anómalos en los quesos tratados de intensidad proporcional a la dosis. No obstante, estos matices se disiparon durante el almacenamiento, de manera que los quesos tratados con 2 kGy fueron aceptados sensorialmente tras 20 (quesos blandos) y 28 días (tipo Cheddar) de almacenamiento a temperaturas entre 4 y 14 °C.

- En el queso semiduro de pasta prensada irradiado con 3 kGy se mantuvieron matices sápidos y aromáticos anómalos, pero era sensorialmente aceptable para el consumo. Sin embargo, la aplicación de 3 kGy a los quesos Camembert, Brie y tipo Cheddar generaron olores y sabores que motivaron su rechazo por los catadores.

Conclusión general

El tratamiento con electrones acelerados puede utilizarse en la industria quesera como una alternativa eficaz para el control del hinchamiento tardío de quesos semiduros/duros y de *L. monocytogenes* en quesos blandos, si bien los cambios sensoriales, aunque ligeros, pueden condicionar su uso para alcanzar el criterio microbiológico más exigente (ausencia en 25 g). No obstante, las alteraciones sensoriales se disipan en gran medida durante el almacenamiento de los quesos, por lo que la prolongación de los tiempos de comercialización es una estrategia válida para recuperar su calidad sensorial.

SUMMARY

Use of the E-beam treatment to control *Clostridium tyrobutyricum* and *Listeria monocytogenes* in cheese

Introduction

Cheese might be defined as the food resulting from the acidification of milk by lactic acid bacteria (e.g. lactococci, streptococci and lactobacilli) and subsequent coagulation of caseins by clotting enzymes (e.g., chymosin, cyprosine and recombinant rennet), followed by the cutting of the formed gel (curd) and its draining, which is moulded, pressed and salted afterwards. Finally, it is ripened for a variable time depending on the cheese type, i.e. from fresh cheese for immediate consumption (e.g. Burgos and Villalón cheese) to several months (most varieties) or even years (e.g. Grana Padano). The microbiota involved in the acidification and ripening steps (lactic, fungal, etc.), the operations carried out on the curd (lactic or enzymatic coagulation, cutting, cooking, dehydration, etc.) and the ripening conditions (time, humidity and temperature) determine the final characteristics of each cheese variety.

This thesis deals with two issues, one of them is of technological concern with a severe economic impact; it is about the spoilage defined as the late blowing defect (LBD) of hard and semi-hard cheeses, caused by the butyric fermentation of *Clostridium tyrobutyricum* and related species. The other topic, of a health nature, refers to the possible presence of *Listeria monocytogenes* in cheeses, especially in the soft cheeses.

To solve both problems, the application of ionizing radiation, as the accelerated electrons (E-beam) form, was used. This non-thermal technology has proved to be effective for extending the shelf life of certain foods by reducing the number of spoilage organisms and also to eliminate non-sporeforming pathogenic microorganisms to an appropriate level of protection (ALOP) in a wide range of ready-to-eat (RTE) foods.

Main objective

To ascertain the viability of the E-beam treatment to avoid, on the one hand, the late blowing defect of cheeses and, on the other hand, to achieve the soft cheeses sanitation with respect to *L. monocytogenes*.

Methodology

Two cheese types were selected to perform the studies included in this thesis; one among those classified as soft cheese (moisture >40%), with lactic curd and surface-mould ripening (Camembert and Brie cheeses) and the other one amid the semi-hard/hard (36-40% moisture) with enzymatic curd (Cheddar and pressed paste cheeses types).

The samples were treated at the IONISOS IBERICA S.A. plant (Tarancón) with an E-beam generator (Rhodotron type) at doses between 0.2 and 8 kGy, depending on the intended analyses. Aliquots of cheese were contaminated with *C. tyrobutyricum*, *L. monocytogenes* or *L. innocua* and then were irradiated at different doses to establish the death kinetics of these microorganisms. Likewise, in control (uncontaminated) samples the changes during storage of the surviving microbiota (counts in PCA), physic-chemical characteristics (pH and water activity, a_w), colour parameters (CIELab system, L^* , a^* and b^*) and texture profile (TPA) were analyzed. Finally, triangular and rank order tests were carried out to establish the sensory quality of the irradiated cheeses.

Results

The results are summarised as follows:

- The application of ionizing radiation to semi-hard cheeses at a dose of 3 kGy caused a 96% reduction in the number of *C. tyrobutyricum* spores, thus avoiding, or at least minimizing, the late blowing defect.
- In Camembert and Brie cheeses, the elimination of *L. monocytogenes* to safe levels according to the EU criterion (100 cfu/g) and the 'absence in 25 g' criterion

in some countries (e.g. USA) was achieved with E-beam treatments of 1.28 kGy and 2.60 kGy, respectively.

- The lactic acid bacteria counts in the irradiated cheeses decreased proportionally to the applied dose (between 1.5 and 4.5 log units at 1 and 3 kGy, respectively). However, the surviving population recovered the initial levels during storage at both 4 and 14 °C in Cheddar-type and semi-hard pressed cheeses treated with doses of up to 2 kGy. In Camembert and Brie cheeses, recovery was only achieved at 14 °C.
- The effects of the E-beam treatment on the physicochemical properties (pH and a_w) of the cheese were negligible.
- The changes in the texture and colour parameters of the irradiated cheeses were dependent on the combined effect of the applied dose and the storage conditions (time and temperature). The colour parameters were significantly affected ($p < 0.05$) by the air exposure time after the package was opened.
- Ionizing radiation gave rise off-odours and off-flavours in the treated cheeses, which intensity was of intensity proportional to the dose. However, these nuances dissipated during storage, in such a way that cheeses treated with 2 kGy were sensorially accepted after 20 days (soft cheeses) and 28 days (Cheddar type) of storage at temperatures between 4 and 14 °C.
- Anomalous sapid and aromatic nuances were appreciated in the semi-hard pressed cheese irradiated with 3 kGy, but it was sensorially acceptable for consumption. However, the application of 3 kGy to the Camembert, Brie and Cheddar cheeses generated odours and flavours that led to their rejection by panellists.

General conclusion

The E-beam treatment could be an effective alternative in the cheese industry for controlling the late blowing defect of semi-hard/hard cheeses and *L. monocytogenes*

in soft cheeses. Nevertheless, slight sensory changes could condition its use to achieve the most demanding microbiological criterion (absence in 25 g). However, during the storage of the cheeses, the sensory changes are dissipated to a great extent, so the extension of marketing times is a valid strategy for recovering their sensory quality.

1.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento no es una vasija que se llena, sino un fuego que se enciende.

Plutarco (46-120 d. n. e.)

1.1. EL QUESO

1.1.1. DEFINICIÓN DEL QUESO

La palabra «queso» tiene su origen en el latín. Procede del vocablo *caseus* —que probablemente proviene, a su vez, de la raíz sánscrita *kwā:t-* (fermentar)—, que es también la raíz de las proteínas lácteas mayoritarias, las caseínas. Con los años, según el idioma, el vocablo se transformó en queso (castellano), *queijo* (portugués), *käss* (alemán), *kaas* (holandés), *caws* (galés), *queixo* (gallego) y *cheese* (inglés). En otros países, su fuente etimológica es la expresión latina *caseus formaticus* (queso moldeado), un término que en Roma se generalizó cuando se empezaron a preparar quesos duros. Al transcurrir el tiempo, se perdió el sustantivo original *caseus* y se conservó, como sustantivo, el adjetivo *formaticus* del que proceden las denominaciones *formaggio* (italiano), *fromage* (francés) y *formatge* (catalán). Otros autores opinan que estos vocablos tienen su origen en el término griego *phormos* (cesta usada para, entre otros fines, el desuerado), que luego pasaría al latín. En el diccionario de la Real Academia Española figura la palabra *formaje*, con dos acepciones: molde para hacer queso y, simplemente, queso. Fuera cual fuese el origen del nombre, lo cierto es que el queso es un alimento que se conocía varios milenios anteriores a nuestra era y siempre ha estado presente en la tradición gastronómica de numerosas culturas.

Para describir un producto cuya elaboración está tan extendida temporal y geográficamente se han propuesto muchas definiciones. La más sencilla considera al queso como el producto, fresco o madurado, obtenido por separación del suero después de la coagulación de la leche (Ordóñez y col., 1998). Esta definición, sin embargo, no permite conocer qué ingredientes y cuáles son las múltiples operaciones del proceso de elaboración que, a partir de un producto relativamente homogéneo como la leche, dan lugar a una gran variedad de quesos. Por ello, se ofrece la descripción dada por Ordóñez y col. (1998): «*el queso es la cuajada formada al*

coagular la leche de ciertos mamíferos por la adición de cuajo o enzimas coagulantes y/o por el ácido láctico producido por la actividad de determinados microorganismos normalmente presentes en la leche (microbiota natural) o intencionadamente añadidos a ella (cultivos iniciadores); la cuajada se desuera por corte, calentamiento y/o prensado, dándole forma en moldes y sometiéndola después a maduración (en la que participan bacterias lácticas y, a veces, también otros microorganismos) durante un tiempo determinado a temperaturas y humedades relativas definidas».

1.1.2. ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y SITUACIÓN ACTUAL

Uno de los avances cruciales de la Humanidad fue la domesticación de animales durante la revolución neolítica, que se inició en Occidente en el Creciente Fértil entre el 8000 y 10 000 a.n.e. Si bien no se conoce con exactitud el origen de la fabricación de queso, se cree que fue en esa zona, en los valles de los ríos Tigris y Éufrates, hace unos 8000 años. Los primeros registros que mencionan la leche y el ganado vacuno aparecen en los escritos sánscritos de los sumerios (4000 a.n.e.). De hecho, en la tablilla sumeria del periodo Uruk IV (3100-3000 a.n.e.) se observan (figura 1.1) piezas de queso y unas figuras que se han interpretado como grasa láctea (Englund, 1995).

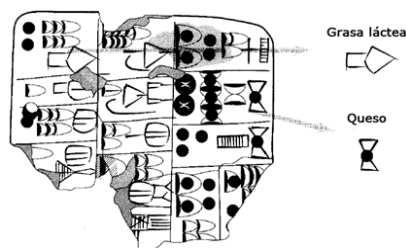


Figura 1.1. Signos cuneiformes para el queso y grasa láctea en una tablilla sumeria del periodo Uruk IV (3100-3000 a. n. e.). Adaptado de Englund (1995).

Es verosímil que el queso y las leches fermentadas surgieran de forma accidental. Por un lado, su obtención se debería a una probable contaminación de la leche con bacterias lácticas durante el ordeño o en los recipientes donde se guardaba; por otra parte, un gel similar se encontró en el estómago de animales lactantes tras su sacrificio o en bolsas confeccionadas con este órgano, a modo de

odres. Transcurridas unas horas, se produciría la coagulación de la leche aún templada y, después de drenar el suero, se obtendría una masa compacta que se podría consumir en fresco o almacenarse para su consumo días o meses después (Ordóñez y col., 1998). De esta forma, a partir de un producto altamente perecedero, la leche, se obtenía un alimento más digerible, duradero y con unas características sensoriales muy apetecibles. Con el tiempo, el ser humano relacionaría el contacto de la leche con el extracto procedente del estómago de los rumiantes jóvenes y su coagulación. Así, se convirtió en una práctica habitual añadir a la leche trozos de estómago de rumiantes lactantes y el suero de una elaboración anterior, que podría considerarse como el uso, inconsciente, de un cultivo iniciador. Muchos años después se prepararía cuajo para fabricar queso de forma dirigida.

El proceso de elaboración del queso se difundió por todas las civilizaciones antiguas de Oriente Medio y de la cuenca mediterránea. Así, se han encontrado pinturas e incluso restos en las tumbas egipcias, como uno de los quesos más antiguos encontrados hasta la fecha, elaborado hace unos 3200 años (Greco y col., 2018). Existen, además, numerosas menciones al queso en los himnos védicos (aprox. 1700 a.n.e.), en el Antiguo Testamento (p.ej., el libro de Job en 1520 a.n.e.) y en las odas griegas (p.ej., la *Ilíada* y la *Odisea* de Homero en 1184 a.n.e.). En el Imperio romano el queso era un alimento muy apreciado y plenamente incorporado a su economía, hasta el punto de que el emperador Diocleciano, en el año 301 d.n.e., fijó su precio en el *Edictum de pretiis rerum venalium* (Kent, 1920). Su proceso de elaboración, aunque de forma empírica, era bien conocido, como lo demuestran los escritos del siglo I de Plinio, Varro y, especialmente, Columella, quien en su tratado *De re rustica* (50 d.n.e.) lo describe de forma detallada. La expansión del Imperio romano y las grandes migraciones ocurridas tras su caída contribuyeron aún más a su difusión. Posteriormente, en la Edad Media, los desplazamientos de los cruzados y las peregrinaciones a otros lugares sagrados continuaron expandiendo la forma de fabricar queso. En esa misma época, es muy probable que los monjes, en

sus monasterios, contribuyeran de forma notable al perfeccionamiento de la tecnología y al desarrollo de nuevas variedades.

En muchas regiones, y hasta épocas muy recientes, la elaboración de queso se ha seguido haciendo de forma artesanal. Los avances científicos del siglo XIX, sobre todo en Microbiología, permitieron pasar del conocimiento empírico y la elaboración artesanal a una producción normalizada. Además, el desarrollo tecnológico impulsó la producción industrial: las primeras fábricas de queso se fundaron en Estados Unidos (1851) y Reino Unido (1870), a las que pronto se sumaron muchas más en otros países (Robinson y Wilbey, 2018).

Ya se ha mencionado que el queso ha sido un alimento presente en muchas civilizaciones y su consumo se ha extendido y ha ido creciendo siglo tras siglo. Los datos de las últimas décadas indican que la producción mundial ha seguido una tendencia creciente (figura 1.2). Obsérvese en la gráfica que en Europa y América la producción se ha multiplicado por un factor de alrededor de 4 en el periodo comprendido desde 1961 al 2014. Así, y según las últimas cifras de la FAO, el queso es el segundo producto más demandado de los derivados lácteos, solo por detrás de la leche de consumo, alcanzando 22,7 millones de Tm en el 2014 (FAO, 2020).

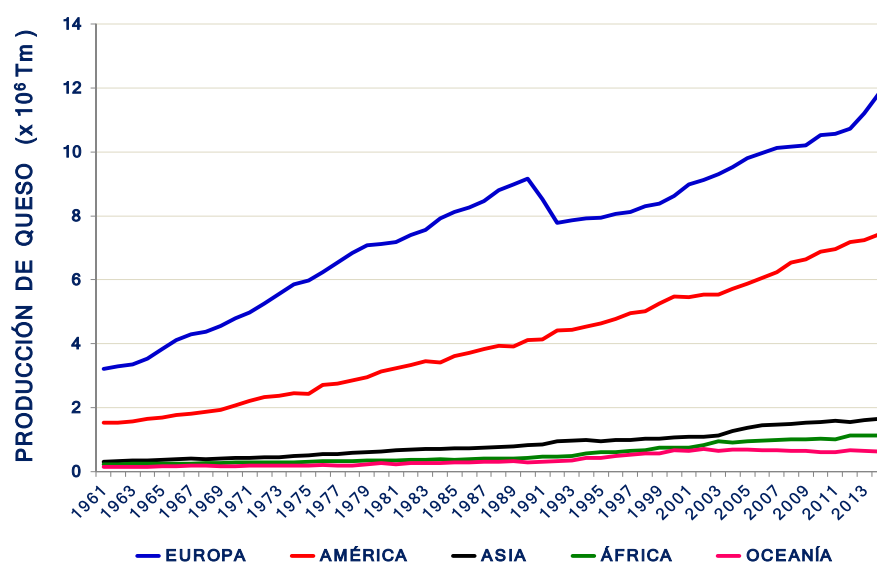


Figura 1.2. Evolución (1961-2014) de la producción de queso, en millones de toneladas, en los distintos continentes (FAO, 2020).

La producción de queso está geográficamente muy concentrada; Europa y Norteamérica elaboran el 75% del volumen mundial, siendo Estados Unidos, Alemania y Francia los mayores productores en 2013 (FAO, 2020). También se observan diferencias notables en su consumo (figura 1.3); en 2013, el 43,5% de los países europeos superaron los 15 kg/habitante/año, siendo los principales consumidores Islandia, Grecia y Francia con 30,8, 25,5 y 23,7 kg/habitante/año, respectivamente. En el resto de continentes, solo el 3% de los países de Asia y América (entre ellos EE. UU. y Canadá) alcanzó los 15 kg/habitante/año, mientras que en Oceanía y África ningún país llegó a tal cifra de consumo de queso (FAO, 2020).

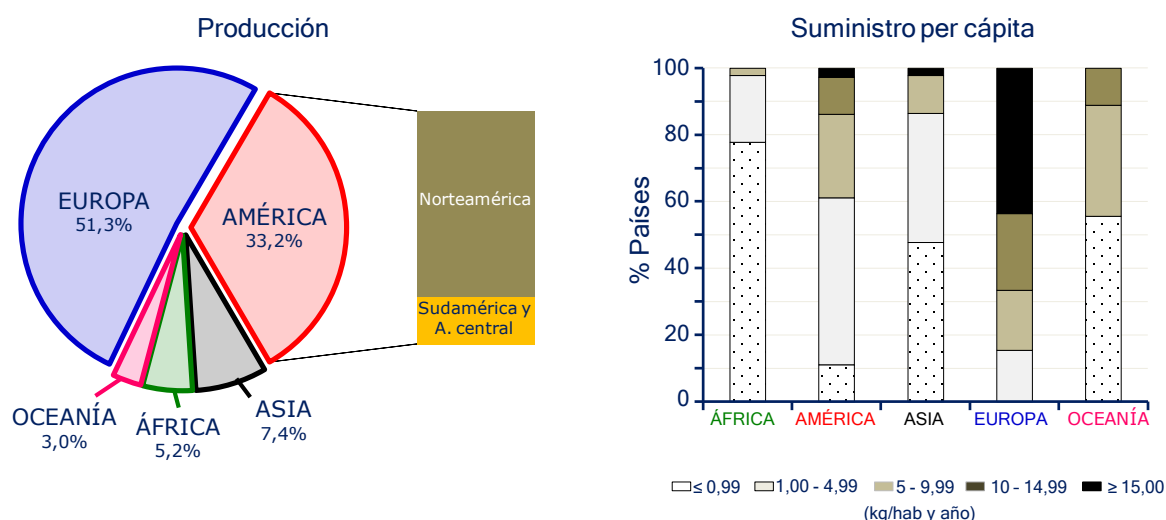


Figura 1.3. Distribución mundial de la producción y el suministro per cápita de queso en 2013 (FAO, 2020).

Los pronósticos a medio plazo para la Unión Europea estiman un crecimiento del sector, tanto en el consumo como en la producción de queso. En 2019, los países miembros produjeron 10,8 millones de Tm de queso y el consumo medio per cápita fue de 19,4 kg/habitante/año; para el 2030 se prevé que la producción aumentará en casi un millón de Tm y se consumirá un promedio de 20,2 kg/habitante/año (CE, 2019a).

1.1.3. ELABORACIÓN DEL QUESO

1.1.3.1. Composición general de la leche

El número de ingredientes que normalmente se utiliza para la elaboración de queso es muy reducido (leche; cuajo tradicional u otro agente coagulante, como cipsosina o cuajo microbiano; cultivos de bacterias ácido lácticas y otros microorganismos, como mohos o propionibacterias, dependiendo de la variedad que se pretenda fabricar, y sal). A la hora de describir un producto, es lógico empezar exponiendo los aspectos más relevantes de la materia prima, en este caso la leche, que es el ingrediente mayoritario. El resto de ingredientes son minoritarios pero imprescindibles y, más bien, pueden considerarse como coadyuvantes tecnológicos, ya que, acorde con el criterio de la AESAN (2020), estas sustancias no se consumen como alimentos en sí mismos sino que se utilizan para transformar las materias primas, alimentos o ingredientes con un determinado propósito tecnológico.

La leche es la sustancia líquida secretada por las hembras mamíferas para la alimentación de las crías recién nacidas. Desde el punto de vista fisicoquímico, la leche consiste en una mezcla homogénea de tres fases: una disolución acuosa que contiene los componentes solubles (lactosa, sales minerales, proteínas séricas, vitaminas hidrosolubles, etc.), una emulsión de ésta con la grasa y sustancias asociadas, y una suspensión coloidal (las caseínas ligadas a sales minerales).

En las tablas de composición general se recogen, centesimalmente, los valores habituales de materia grasa, proteínas, carbohidratos (cuantitativamente este valor es equivalente al de la lactosa), cenizas y extracto seco. En la tabla 1.1 se ofrece la composición típica de la leche utilizada para la producción de queso, procedente de las especies que se mencionan. La grasa es el componente más variable, alcanzando en la leche de oveja el valor más alto entre las leches de consumo. La grasa es, igualmente, el componente que más varía entre razas. Por ejemplo, el contenido en grasa (g/100 g) típico de la leche de vaca de las razas Pardo suiza, Guernsey, Holstein y Jersey es del orden de 3,98, 4,46, 3,64 y 4,64, respectivamente. Las

variaciones son mucho menores en el resto de componentes, incluso entre especies; puede observarse en la tabla 1.1 que la lactosa varía de 4,4 a 4,9 g/100 g entre las cuatro especies consideradas y las cenizas, de 0,7 a 1,0 g/100 g.

Además de las diferencias debidas a la especie y a la raza, la composición de la leche también puede variar individualmente dependiendo de diversos factores (p. ej., edad y alimentación, número de partos, clima, etc.) siendo el más importante el momento de la lactación. Tras el parto, empieza a segregarse calostro, cuya composición es muy diferente a la de la leche, pues contiene el doble del extracto seco y cenizas, la mitad de la lactosa de la leche y el contenido en proteínas y la grasa es 4 y 1,5 veces mayor, respectivamente. Además, el calostro también tiene una gran concentración de vitamina A (Ordóñez y col., 1998). Después, durante el primer tercio de la lactación, aumenta paulatinamente el volumen de leche. En el pico de lactancia se registran en la leche las menores concentraciones de grasa, proteína y sólidos, situación que revierte al final de la lactancia.

Tabla 1.1. Composición química típica (g/100 g) de la leche de distintas especies y producción mundial de queso (%) que se fabrica con cada tipo de leche.

Leche	Humedad	Lactosa	Cenizas	Proteínas	Grasa	% Producción mundial
Vaca	87,3-87,5	4,6	0,7	3,3-3,4	3,9-4,4	95,5-96,4
Oveja	79,6-84,6	4,7-4,8	0,9-1,0	4,8-5,5	7,6-9,0	1,6-2,2
Cabra	84,6-86,7	4,4-4,6	0,8	3,2-3,9	4,5-6,0	1,2-1,4
Búfala	82,2-84,2	4,5-4,9	0,8	1,2-1,3	6,0-7,8	0,7-0,9

Fuente: Adaptada de Robinson y Wilbey (2018) y FAO (2020)

La **lactosa** es el carbohidrato mayoritario de la leche; los restantes (ácido n-acetilneuramínico, n-acetilglucosamina y n-acetilgalactosamina) se encuentran en muy pequeña concentración. Por tanto, el total de carbohidratos se puede considerar equivalente al contenido en lactosa. Este disacárido es el componente más sensible frente a la acción microbiana, ya que es un buen sustrato para ciertas bacterias, las

ácido lácticas, que la transforman en ácido láctico, imprescindible para la fabricación de queso.

Las **sales minerales** incluyen las cenizas y las sales orgánicas. Los componentes mayoritarios de las cenizas son fosfatos, cloruros, sulfatos, carbonatos y bicarbonatos de sodio, potasio, calcio y magnesio. En cantidades menores también se encuentran elementos como cobre, hierro, boro, manganeso, zinc, yodo, etc. El contenido en cenizas de la leche es, en valores totales, bastante constante (0,7-0,8% de la leche de vaca en peso húmedo). El contenido de sales orgánicas es ligeramente inferior a 0,2 g/100 ml, por lo que el conjunto de las sales minerales supone aproximadamente el 1% de la leche (Ordóñez y col., 1998). Entre todas estas sustancias, destacan los fosfatos y citratos de calcio y magnesio, pues estas sales se encuentran tanto en la fase acuosa como en dispersión, formando el «fosfato cálcico coloidal», denominado abreviadamente CCP (del inglés *colloidal calcium phosphate*). Entre ambas fracciones existe un equilibrio químico —denominado equilibrio salino de la leche— que incide directamente en la estabilización de las micelas de caseína y, por tanto, en la formación del gel (etapa de coagulación) del proceso de elaboración del queso.

Las **proteínas séricas** y las **caseínas** son los principales tipos de proteínas lácteas. En una concentración mucho menor (2% del total proteico) se encuentra un tercer grupo compuesto esencialmente por enzimas. Las proteínas séricas (β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, seroalbúmina, inmunoglobulinas, etc.) se distinguen de las caseínas por su estabilidad frente a la coagulación por acidificación o acción de la quimosina y otras enzimas coagulantes. Por tanto, estas proteínas permanecen en disolución y se eliminan con el suero.

Las caseínas (α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína y κ -caseína) suponen un 80% del contenido proteico de la leche y están agrupadas en micelas, que son partículas coloidales de 50-250 nm de diámetro. Los diferentes modelos propuestos para explicar la estructura de la micela coinciden en la unión de las caseínas mediante el CCP y la ubicación de la κ -caseína en la superficie. Desde el punto de vista de la

tecnología del queso, su importancia radica en su sensibilidad a la acidificación (precipita a pH próximo a 4,6), donde participan activamente las bacterias ácido lácticas, y a las enzimas coagulantes (quimosina, cipsosina y cuajos microbianos). La acción de ambas ocasiona, respectivamente, la precipitación ácida y enzimática de las caseínas.

La **materia grasa** se encuentra emulsionada en la leche en forma de glóbulos grasos, partículas esféricas con un diámetro de 1,5-10 μm dependiendo de la especie y de la raza. Constan de un núcleo central de triglicéridos rodeado de una membrana lipoproteica que los protege de la acción enzimática y previene su coalescencia. La mayor parte de la grasa pasa al queso cuando se produce la coagulación de la leche, ya que queda atrapada en la red tridimensional, la cuajada, formada por las caseínas.

1.1.3.2. Proceso general de elaboración del queso

La leche es la materia prima que se utiliza para la fabricación de queso y resulta asombroso cómo un producto relativamente homogéneo origina la gran variedad de quesos existente en el mundo, cuyo número se estima en un par de millares. El proceso general de la elaboración de queso es bien conocido (figura 1.4) y se encuentra descrito en numerosas publicaciones. El esquema de la figura se ha adaptado a partir de las publicaciones de Ordóñez y col. (1998), Law y Tamime (2010) y Fox y col. (2017). No obstante, en alguna fase de este esquema general se introducen ciertas modificaciones que permiten, junto a otros agentes/factores (microorganismos, tipo de cuajada y manipulaciones de la misma, condiciones de maduración, etc.), obtener las características propias de cada tipo de queso.

Los consumidores, siempre exigentes, demandan alimentos nutritivos, microbiológicamente seguros y con unas características que satisfagan la calidad sensorial que se espera de ellos. Por ello, según los hábitos actuales de adquisición de productos alimenticios por los consumidores, la elaboración de queso, al igual que la de cualquier otro alimento, pretende desde el punto de vista comercial la obtención de un producto final normalizado. Para lograr este objetivo es necesario partir de una

materia prima que tenga unas propiedades (composición química, calidad higiénica, parámetros fisicoquímicos, etc.) definidas para que la leche de origen sea, de unas partidas a otras, lo más homogénea posible. Ya se ha mencionado anteriormente que diversos factores pueden afectar a la composición de la leche.

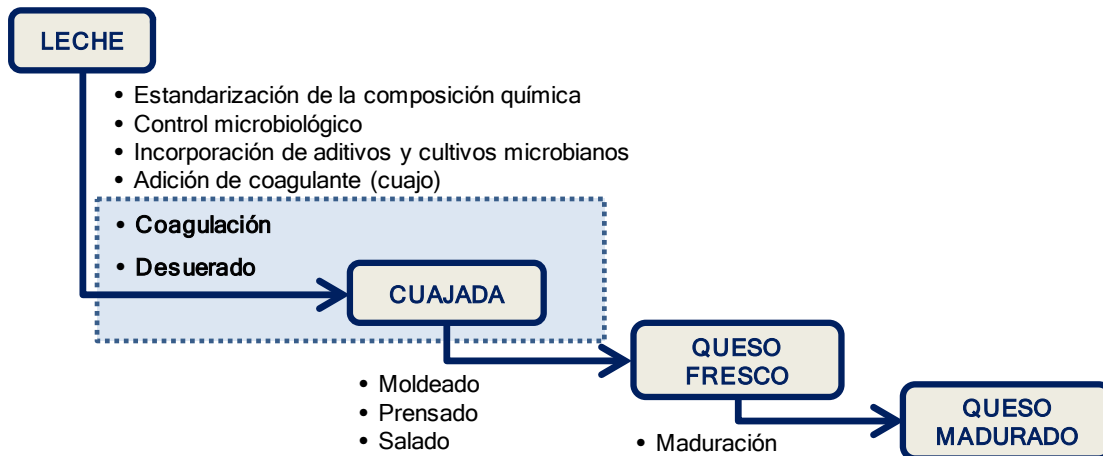


Figura 1.4. Esquema general del proceso de elaboración de queso.

Dado que habitualmente varias explotaciones ganaderas suministran a una misma industria quesera, se requiere acondicionar la leche (figura 1.4). Para ello, en primer lugar, es necesario eliminar las partículas macroscópicas por filtración o clarificación. A continuación, se precisa estandarizar la composición química de la leche para minimizar posibles fluctuaciones. Se trata de una etapa esencial en aquellas variedades de queso cuyo contenido en grasa y/o extracto seco están fijados por reglamentación. Esta operación se realiza mediante el desnatado por centrifugación o, en caso contrario, con la adición de nata, leche desnatada, leche en polvo entera, etc. según la fracción que se pretenda normalizar.

1.1.3.3. Procedencia y control de la microbiota de la leche

No es posible obtener leche exenta de microorganismos aunque el ordeño sea extremadamente higiénico porque, incluso si el animal está sano, siempre hay microorganismos, aunque su carga sea escasa, en el canal y la cisterna del pezón. Una vez abandona la ubre, la leche está expuesta a un sinfín de contaminaciones: del

exterior de la glándula mamaria y de la piel del animal, del entorno atmosférico, de la persona que realiza el ordeño si es manual y de las ordeñadoras si es mecánico, de las aguas utilizadas en la granja, del alimento, etc. En las modernas explotaciones en las que el ordeño se lleva a cabo manteniendo las debidas condiciones higiénicas, el equipamiento (máquinas ordeñadoras, tuberías, tanques refrigerantes, cántaras, etc.) constituye la principal fuente de contaminación de la leche. La carga bacteriana puede ser de millones de células si se realiza una limpieza inadecuada o un secado insuficiente de las superficies del utillaje. Los microorganismos más frecuentes son bacterias lácticas y psicrotrofas, siendo habitual la presencia de coliformes. De acuerdo al Reglamento (CE) 853/2004, las medidas higiénicas durante el proceso han de ser suficientes para garantizar un recuento total inferior a 10^5 ufc/ml para la leche de vaca, y de $1,5 \cdot 10^6$ o $5 \cdot 10^5$ ufc/ml para leche procedente de otras especies, según vaya a someterse a un tratamiento térmico o no, respectivamente, durante su procesado.

La temperatura es un factor importante para asegurar la calidad microbiológica de la leche cruda. A la salida de la ubre, su temperatura es muy favorable para el crecimiento de microorganismos, por lo que para inhibir su proliferación es necesario refrigerar la leche lo antes posible. Para ello, en las propias granjas, se suele intercalar en el circuito de recogida de la leche un intercambiador de calor o se almacena en tanques refrigerantes. De esta forma se consigue que la temperatura descienda a 5 y 7 °C, valores a los que se conservará hasta el momento de su recogida. Al llegar a la industria de destino, la leche se procesará en las primeras 24-48 horas y, hasta ese momento, se mantendrá en torno a 5 °C. Con este proceder se logra controlar eficazmente el desarrollo de las bacterias lácticas y de otras de crecimiento rápido como los coliformes. No obstante, un almacenamiento prolongado (3-4 días) bajo refrigeración propicia un crecimiento excesivo de las bacterias psicrotrofas presentes, en especial las aerobias Gram negativas, siendo las más frecuentes las pertenecientes al género *Pseudomonas*, cuyas lipasas y proteasas

producen defectos en el sabor y aroma y disminuyen el rendimiento queso (Ordóñez y col., 1998; Fox y col., 2017).

En la industria, la leche se puede someter a un tratamiento térmico suave en flujo continuo denominado termización (57-65 °C, 5-15 s) con el objetivo de mantener un nivel bajo de bacterias psicrotrofas. Este tratamiento no inactiva la fosfatasa alcalina, la lipasa natural, la lactoperoxidasa y la plasmina. Tampoco las lipasas y proteasas de las bacterias Gram negativas psicrotrofas, lo que puede repercutir desfavorablemente en el sabor y aroma de algunos tipos de quesos.

Por otra parte, no se puede descartar que algunas bacterias patógenas alcancen la leche cruda. Generalmente, en los quesos que se someten a maduración más allá de 60 días, se considera tácitamente que estas bacterias desaparecen, aunque algunos estudios apuntan a que pueden persistir durante más tiempo (AECOSAN, 2015). Sin embargo, una gran variedad de quesos se consumen en tiempos inferiores a los mencionados. En tal caso, se requiere pasteurizar la leche, normalmente a 72 °C durante 15 segundos, para destruir las posibles bacterias patógenas que pudieran estar presentes y, al tiempo, reducir la carga microbiana total. Sin embargo, este tratamiento produce la precipitación de parte del calcio iónico, cuya presencia es esencial para la formación de la cuajada. Este efecto se contrarresta añadiendo cloruro cálcico a dosis de 0,1-0,2 g/l a la leche pasteurizada.

Otro aspecto a considerar es la presencia de esporas bacterianas, las cuales sobreviven a los tratamientos pasteurizantes, por lo que puede ser necesario recurrir a operaciones adicionales como la **bactofugación** o la **microfiltración** para reducir su número. En el apartado 1.2 se consideran más ampliamente ambos procesos. Además de los tratamientos físicos para el control de bacterias no deseables, se pueden emplear **aditivos** con actividad antimicrobiana. De acuerdo con el *Codex Alimentarius* (2011), se permite la adición de nitratos (E 251, E 252), lisozima (E 1105) y nisina (E 234) en algunos quesos para inhibir las bacterias butíricas (véase apartado 1.2). El listado de aditivos autorizados para la elaboración de quesos

también incluye colorantes, tanto aquellos que aportan tonalidades anaranjadas [p. ej., los carotenoides (E 160)] como los blanqueantes, principalmente derivados de la clorofila, que enmascaran los matices amarillentos de ciertos quesos.

Bacterias ácido lácticas (BAL)

Entre la gran diversidad de microorganismos que pueden encontrarse en la leche cruda, las BAL son, desde un punto de vista tecnológico, el grupo más notable. Su papel en la industria láctea ha de considerarse bajo dos puntos de vista completamente opuestos, dado que pueden comportarse como microorganismos alterantes o beneficiosos. La acción deletérea se debe a la fermentación no deseada de la lactosa rindiendo ácido láctico que, al acumularse en la leche, produce su acidificación. Si el descenso del pH es suficiente para alcanzar un valor próximo al punto isoeléctrico de las caseínas (4,6), éstas precipitan y se produce la alteración de la leche. Ya se ha comentado que este efecto puede minimizarse mediante la refrigeración al inhibirse el crecimiento de las BAL.

Los efectos beneficiosos derivan de la misma facultad de las BAL. En este caso, la metabolización de la lactosa es un fenómeno deseable ya que es imprescindible para la elaboración de diversos productos, entre ellos el queso o el yogur. Además, estas bacterias participan en las degradaciones proteicas que acontecen durante los procesos madurativos y, algunas especies (p. ej., *Lactococcus lactis* sp. *diacetylactis*), potencian al sabor y aroma de ciertos quesos (Ordóñez y col., 1998).

La pasteurización de la leche destinada a la producción de queso requiere la posterior inoculación de las especies de BAL (cultivos iniciadores) necesarias dependiendo del producto que se pretenda fabricar. En la tabla 1.2 se recogen las especies más destacadas, así como la temperatura de crecimiento y las formas en las que pueden adicionarse a la leche. Si bien el uso de estos cultivos iniciadores permite una mayor normalización del proceso, se obtienen quesos con aromas y sabores menos intensos que los producidos con leche cruda, debido a la menor variedad de microorganismos (microbiota secundaria) y enzimas que intervienen en su desarrollo.

Tabla 1.2. Características de los cultivos iniciadores para la elaboración de queso.

TEMPERATURA ÓPTIMA DE CRECIMIENTO	FORMA DE INCORPORACIÓN
<p>Mesófilos (20-32 °C)</p> <p>Género <i>Lactococcus</i> <i>L. lactis</i> (spp. <i>cremoris</i> y <i>lactis</i>)</p> <p>Género <i>Leuconostoc</i> <i>L. mesenteroides</i> sp. <i>cremoris</i> <i>L. lactis</i> sp. <i>lactis</i></p>	<p>Cultivo directo a cuba</p> <p>Adición directa del cultivo concentrado (congelado o liofilizado)</p> <p>Tanque de cultivo</p> <p>Una etapa de propagación en medio de cultivo (leche desnatada estéril)</p>
<p>Termófilos (39-45 °C)</p> <p><i>Streptococcus thermophilus</i></p> <p>Género <i>Lactobacillus</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. delbrueckii</i> (spp. <i>bulgaricus</i> y <i>lactis</i>)</p>	<p>Tradicional</p> <p>Varias etapas de propagación</p>
DIVERSIDAD MICROBIANA	METABOLITOS DE FERMENTACIÓN
<p>Cultivo puro</p> <p>Una sola cepa</p>	<p>Homofermentativos</p> <p>Ácido láctico¹</p>
<p>Cultivo mixto</p> <p>Mezcla de distintas especies y/o cepas</p>	<p>Heterofermentativos</p> <p>Ácido láctico Dióxido de carbono Diacetilo Ácidos grasos de cadena corta Acetaldehído</p>

¹ Cuando en el medio existen bajas concentraciones de glucosa puede desviarse el metabolismo del piruvato, originándose pequeñas cantidades de ácido fórmico, ácido acético y etanol que, aunque sean minoritarios, alcanzan relevancia dado que, como sustancias volátiles que son, con umbrales de detección muy bajos (entre aproximadamente 0,05 y 5 µg/mg), pueden contribuir al sabor y aroma de los quesos.

Las BAL utilizan diferentes rutas para metabolizar la lactosa dependiendo de si son homo o heterofermentativas. Algunas BAL homofermentativas (*Streptococcus thermophilus* y algunos lactobacilos) desdoblan la lactosa en sus dos monosacáridos (glucosa y galactosa) merced a la enzima β -galactosidasa. La glucosa entra directamente en la ruta de Embden-Mayerhof-Parnas (EMP) mientras que la galactosa lo hace a través de la vía de Leloir. En este último caso, el monosacárido se fosforila en una reacción catalizada por la galactoquinasa y después de transformarse en UDP-galactosa, sufre una epimerización (catalizada por uridiltransferasa) convirtiéndose

en glucosa-6-P que ingresa en la ruta EMP. Otras BAL homofermentativas (*Lactococcus* spp. y algunos lactobacilos) hidrolizan la lactosa con la enzima fosfo- β -galactosidasa. La galactosa queda fosforilada (galactosa-6-P) y por la vía de la tagatosa se incorpora en la ruta EMP a nivel de gliceraldehído-3-P. La glucosa libre ingresa directamente en la vía EMP. El producto final mayoritario es ácido láctico (tabla 1.2). Las heterofermentativas (*Leuconostoc* spp. y algunos lactobacilos) escinden la lactosa con la β -galactosidasa y la galactosa ingresa por la vía Leloir, a nivel de glucosa-6-P, en la ruta heteroláctica, denominada ruta de la fosfocetolasa, de los fosfatos de pentosa o de Warburg-Dickens. Los principales productos finales son ácido láctico, ácido propiónico y dióxido de carbono. Todas estas rutas pueden consultarse en varias publicaciones, aunque se recomienda al lector la obra de Ordóñez y col. (2019a) en la que se describen detalladamente las fermentaciones que se utilizan en la industria alimentaria.

En algunos tipos de queso se requiere, junto al cultivo iniciador, el concurso de otros microorganismos diferentes a las BAL; son los **cultivos adjuntos** o **secundarios** que incluyen ciertas bacterias (*Propionibacterium freudenreichii* en quesos con «ojos», *Brevibacterium linens* en quesos de maduración superficial) o mohos (*Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti* en quesos de moho blanco y azul, respectivamente). Su objetivo fundamental es participar en el desarrollo de las características sensoriales del queso durante la maduración. Se ha propuesto también el uso de microorganismos probióticos o productores de sustancias antimicrobianas, como las bacteriocinas, que inhiben el crecimiento de microorganismos no deseables (véase apartado 1.2).

1.1.3.4. Cuajada: coagulación de la leche y desuerado

La cuajada puede formarse por vía láctica o enzimática. La primera se logra por la acidificación debida al ácido láctico formado a partir de la lactosa por la acción de las BAL (naturalmente presentes en la leche cruda o intencionadamente inoculadas como

cultivo iniciador) y, la enzimática, por la actividad del cuajo o cualquier otra enzima coagulante.

El cuajo tradicional es un extracto obtenido del abomaso del estómago de rumiantes lactantes. La enzima proteolítica mayoritaria es la quimosina junto con pequeñas cantidades de pepsina. Debido a la escasez de cuajo tradicional, se ha recurrido al uso de enzimas coagulantes de origen fúngico (*Rhizomucor* spp.) y, más recientemente, a quimosina recombinante. En algunos quesos, como la Torta del Casar, otras variedades extremeñas y ciertos quesos portugueses, el agente coagulante es la ciprosina existente en extractos de ciertas plantas. Normalmente se obtiene de flores de unas pocas especies del género *Cynara*, principalmente *C. cardunculus*.

La cuajada láctica se forma al disminuir el pH como consecuencia de la acumulación de ácido láctico, lo que determina la solubilización del CCP de las micelas caseínicas. El calcio y los fosfatos migran progresivamente hacia la fase acuosa, produciéndose la desmineralización paulatina de las caseínas, que es total a un pH próximo a 4,6, punto isoeléctrico de estas proteínas. Además, las cargas negativas de la κ -caseína se neutralizan, por lo que disminuye la repulsión electrostática entre ellas y se forman agregados que dan lugar a la cuajada. El coágulo obtenido es el resultado de la formación de un retículo proteico (caseínico) insoluble que atrapa la grasa y la totalidad de la fase en suspensión coloidal. La cuajada láctica se caracteriza por ser frágil, poco contráctil y difícil de desuerar.

La coagulación enzimática de la leche consta de dos fases. En la fase primaria, la quimosina hidroliza el enlace Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de la κ -caseína, rindiendo por un lado la *para*- κ -caseína (fragmento 1-105) que permanece unida a la micela y, por otro, el glicomacropéptido (fragmento 106-169) que pasa al suero. Su pérdida conlleva la reducción de las repulsiones electrostáticas y estéricas responsables de la estabilidad de las micelas, ya que contiene la mayor parte de cargas negativas de la κ -caseína y se produce un acortamiento de la capa proteica superficial. Cuando un porcentaje

elevado (85-90%) de la κ -caseína se ha hidrolizado, comienza la fase secundaria, la de coagulación: las micelas colisionan y la *para*- κ -caseína y el calcio iónico interactúan formándose una red tridimensional junto a las otras caseínas (α_{s1} , α_{s2} y β). El coágulo se hace cada vez más firme, lo que implica la formación de más enlaces entre las micelas caseínicas que quedan más empaquetadas, produciéndose la expulsión del suero del gel, proceso que se conoce como sinéresis del coágulo. La cuajada enzimática presenta unas características totalmente opuestas a las de la cuajada láctica; es impermeable, flexible, compacta, contráctil y, en definitiva, fácil de desuerar.

La mayoría de los quesos se elaboran con cuajadas mixtas. La predominancia de un tipo u otro de cuajada depende de la variedad de queso que se pretenda elaborar. Como regla general, las cuajadas mayoritariamente lácticas dan lugar a quesos de pasta blanda mientras que los quesos duros se obtienen de cuajadas eminentemente enzimáticas.

La sinéresis de la cuajada se produce espontáneamente, conllevando la deshidratación de la masa. No obstante, para potenciar la expulsión de suero se realizan distintas operaciones, como el corte y la cocción con agitación de la cuajada.

El **corte** de la cuajada favorece la expulsión del suero al aumentar la relación superficie/volumen de la misma. Para ello, la cuajada se divide con las denominadas «liras» (bastidores con hilos o cuchillas metálicas dispuestas horizontal o verticalmente). El tamaño de corte suele describirse con símiles vegetales. En los quesos duros, como el Manchego, la cuajada se corta hasta el tamaño de *grano de arroz* (aprox. 5-10 mm), mientras que para variedades con mayor humedad se requieren granos con tamaños crecientes, como por ejemplo *garbanzo*, *haba*, *nuez*, etc. En los quesos de pasta blanda, como el Camembert o el Brie, de cuajada mayoritariamente láctica, el corte es mínimo y se limita al llenado de los moldes con un cucharón.

La **cocción** de la cuajada consiste en la aplicación de una temperatura superior a la de coagulación a las porciones obtenidas durante su corte. Se practica normalmente en la cuba de cuajar inyectando vapor en su doble camisa o, simplemente, sustituyendo el suero por agua caliente. Durante la cocción de la cuajada se favorece la formación de nuevos enlaces entre las caseínas, por lo que aumenta el grado de contracción del gel con una expulsión adicional del lactosuero. En quesos blandos esta operación no se lleva a cabo, mientras que en los quesos muy duros, como el Parmesano, se alcanzan temperaturas de 52-55 °C. En todos los casos, durante el calentamiento se lleva a cabo la agitación de los granos de cuajada para impedir su aglomeración y homogeneizar la temperatura del medio. Durante todas las etapas anteriormente descritas, las BAL se están multiplicando y produciendo ácido láctico, incluso continuarán más tarde, en el queso, hasta que prácticamente se agote el disacárido.

1.1.3.5. Queso: moldeado, salado y maduración

El moldeado consiste en introducir la cuajada en moldes adecuados para darle la forma típica de cada variedad. Los moldes están provistos de orificios para la salida del suero. En los quesos de pasta blanda, el drenaje de suero es el que fluye por el propio peso de la masa. En las variedades semiduras y duras, los moldes se colocan en prensas mecánicas o neumáticas.

Tras el tiempo de prensado adecuado para cada variedad, los quesos se desmoldan. El salado de los quesos es una operación que se realiza en algún momento de la fabricación con el fin de potenciar el sabor, inhibir el crecimiento de bacterias no deseables, potenciar el crecimiento de las deseables y favorecer los cambios fisicoquímicos de la cuajada. La sal puede aplicarse por inmersión de los quesos recién fabricados en salmueras (18-27% de cloruro sódico) en las que flotan, distribuyendo sal seca en la superficie de los quesos o bien adicionando sal seca a los granos de cuajada, con la que se mezcla hasta su disolución antes del moldeado. Las

condiciones de salado (tiempo, temperatura, etc.) dependen del tamaño de las piezas y el tipo de cuajada.

Al finalizar el salado, y de acuerdo con el Real Decreto 1113/2006, los «quesos frescos» estarían listos para su envasado y comercialización. No obstante, la mayoría se mantienen en condiciones de temperatura y humedad relativa controladas para su maduración, que puede prolongarse desde las 2 semanas en el queso Mozzarella hasta unos 2 años en el queso Parmesano y algunos tipos de Cheddar.

La maduración del queso es un fenómeno muy complejo. De acuerdo con la descripción de Ordóñez (1974) «... *un queso en maduración es un sistema bioquímico muy complejo donde se establecen numerosos equilibrios y se entrecruzan múltiples rutas de degradación y síntesis; el producto de una de estas reacciones se convierte con frecuencia en sustrato de otras. La composición de un queso a lo largo del proceso madurativo sufre, por ello, múltiples cambios. (...) En el curso de la maduración se van acumulando en grado diverso los numerosos contribuyentes de su "bouquet": péptidos, aminoácidos libres, aminos, amoníaco, cetonas —especialmente metil cetonas—, aldehídos, ácidos grasos libres, los β -ceto e hidroxiderivados de los mismos, etc., etc. Estos compuestos, generalmente ausentes o en bajas concentraciones en la leche original, surgen como consecuencia de las transformaciones metabólicas sufridas por los compuestos mayoritarios de la leche: lactosa, triglicéridos y otros lípidos menos abundantes y proteínas, especialmente las caseínas».*

Durante la maduración, además de formarse los componentes sápidos y aromáticos, el queso adquiere la textura típica de su variedad. Por ejemplo, la característica corteza blanca y la textura cremosa de los quesos Camembert y Brie se deben al micelio y la intensa actividad proteolítica de *Penicillium camemberti*, que crece en su superficie a lo largo de esta etapa. En el interior de algunos quesos duros y semiduros, la aparición de oquedades (ojos) se debe al gas generado por la microbiota presente al metabolizar el lactato, la lactosa u otros azúcares.

1.1.4. PROCESO DE ELABORACIÓN DEL QUESO CHEDDAR, QUESO SEMIDURO DE PASTA PRENSADA Y QUESOS DE PASTA BLANDA MADURADOS POR MOHO SUPERFICIAL

En el apartado anterior se ha descrito el proceso general de la fabricación del queso y en éste se expondrán, de forma muy resumida, las fases específicas del proceso de elaboración de los quesos utilizados para el desarrollo de este trabajo: un queso duro anaranjado (tipo Cheddar), un queso semiduro de pasta prensada y quesos de pasta blanda (Camembert y Brie).

Queso Cheddar

El método de elaboración de este queso se conoce como *cheddarización*. Se emplea habitualmente leche estandarizada de vaca, con una relación caseína:grasa de 0,67-0,72:1 (Fox y col., 2017). Una vez pasteurizada la leche, se enfría a 30 °C y se añade cuajo y un cultivo iniciador mesófilo, constituido por bacterias del género *Lactococcus*. El gel resultante se corta y se somete a una cocción de 37-39 °C para potenciar la expulsión de suero y la generación de distintos matices de sabor. Tras el drenaje del suero, los granos de cuajada se dejan reposar hasta alcanzar la acidez suficiente (pH 5,4) y una textura gomosa y flexible (Fox y col., 2017). Durante la *cheddarización*, la cuajada se distribuye en bloques que se voltean y apilan progresivamente, lo que ayuda a mantener la temperatura y favorecer la fusión y acidificación de los granos. Después, se lleva a cabo la molienda de los bloques y el salado por adición directa de sal. Posteriormente, la masa se moldea y se prensa durante unas 8-12 horas, adquiriendo su forma definitiva. El proceso continúa con la maduración de las piezas a 6-10 °C durante un periodo que oscila, según el grado de maduración deseado, entre 3-4 meses (*Mild Cheddar*, de sabor cremoso y textura flexible) y los 2 años (*Vintage Cheddar*, con un sabor más fuerte y una textura más firme y desmenuzable) (Banks and Williams, 2004).

El queso Cheddar presenta un color homogéneo que puede variar desde blanco hasta naranja intenso. El color naranja se obtiene mediante la adición de achiote

(E160b), un colorante extraído de las semillas de la planta *Bixa orellana*, o de otros colorantes similares, como los carotenoides (E 160).

Quesos semiduros de pasta prensada

Se elabora según el proceso general descrito en el apartado 1.1.3 con la adición de un cultivo iniciador mesófilo. La maduración se realiza a 12-14 °C y con una humedad relativa del 88% durante alrededor de 3 meses. El resultado es un queso suave, que se comercializa tanto en bloques enteros, normalmente destinados a comercios minoristas, como en lonchas ya envasadas.

Quesos de pasta blanda madurados por moho superficial

Los quesos Camembert y Brie son las variedades más populares de estos quesos. Cuando no están amparados por las respectivas denominaciones de origen, se elaboran normalmente con leche pasteurizada de vaca, que se acidifica con un cultivo iniciador mesófilo. Después de la coagulación, proceso que dura unos 45 min, la cuajada resultante se distribuye en los moldes —bien con un cucharón en la elaboración artesanal o cortada en cubos de 2-2,5 cm de arista en el proceso industrial— donde desuera simplemente por gravedad (Spinnler y Gripon, 2004). Las piezas se salan superficialmente en seco o en salmuera. En los quesos tradicionales, la sal lleva incorporadas las esporas de *Penicillium camemberti*, mientras que a nivel industrial se suelen añadir junto a las BAL del cultivo iniciador (Fox y col., 2017). A continuación, se mantienen a temperatura ambiente para el secado de la superficie. La maduración de estos quesos consta de dos etapas. En primer lugar, los quesos se mantienen a una temperatura (12-13 °C) y una humedad relativa (92-95%) adecuadas para favorecer el desarrollo del moho. Transcurridos 9-15 días, los quesos se envuelven en film y se almacenan a 4 °C hasta su distribución (Fox y col., 2017). Durante los primeros días de maduración, el crecimiento de *P. camemberti* en la superficie da lugar a la característica capa de micelio blanco y a un incremento del pH. Esta desacidificación se debe a que el moho, con la eventual participación de levaduras como *Geotrichum candidum*, metaboliza rápidamente el ácido láctico. La

solubilidad del fosfato cálcico disminuye al aumentar el pH, por lo que precipita formando una capa en la corteza del queso. La diferencia de concentración resultante produce la migración del fosfato cálcico del interior a la superficie del queso, lo que contribuye al ablandamiento de la masa. De forma simultánea, el gradiente de pH y de concentración que se establece provoca que el lactato migre desde el centro del queso a la superficie. Una vez consumido este sustrato, *P. camemberti* metaboliza las proteínas, y el amoníaco que se forma difunde al interior, aumentando el pH. Como consecuencia, se estimula la acción de la plasmina que, junto con el cuajo residual, es responsable de la proteólisis en el interior del queso, ya que las proteinasas producidas por los microorganismos superficiales difunden de forma muy limitada en el queso (McSweeney y Fox, 2004).

1.2. PRINCIPALES DEFECTOS DE LOS QUESOS

La calidad global de un queso se evalúa observando, mediante el análisis sistemático de la pieza, la presencia de los rasgos propios de la variedad y la ausencia de defectos (geométricos, físicos, texturales y sensoriales). En la tabla 1.3 se recogen algunos ejemplos al respecto reconocidos por la Federación Internacional de Lechería (IDF, *International Dairy Federation*). No obstante, la tipificación pormenorizada de defectos no puede aplicarse de forma general a todos los quesos, ya que cada variedad tiene su propia tipología y, además, un mismo atributo puede constituir un defecto en una variedad y ser característico de otra, como, por ejemplo, los pequeños ojos irregulares debidos a la formación de gas, típicos del queso Havarti, es una característica cuestionable en el queso Cheddar o el moho típico de los quesos azules es un defecto en los quesos en los que estos microorganismos no participan.

Las variaciones en el mismo proceso de fabricación —tanto en lo relativo a los ingredientes como a los parámetros tecnológicos— pueden originar defectos en los quesos si se desvían de los típicos establecidos para la variedad de que se trate. A modo de ejemplo se pueden mencionar, entre otras desviaciones, un cultivo iniciador excesivamente o, por lo contrario, poco acidificante, un mayor contenido de

humedad, un salado insuficiente o excesivo, una mayor expulsión de suero por haber aplicado una temperatura de cocción de la cuajada mayor que la adecuada, un sabor amargo demasiado intenso (asociado a la acumulación excesiva de péptidos hidrófobos), etc.

Tabla 1.3. Guía para la evaluación de la calidad global de los quesos.

Aspectos evaluables	Posibles defectos
Forma	Cóncavo, convexo, deformado, oblicuo, hinchado, etc. Exceso o falta de altura
Corteza	Ausente, fina, gruesa Seca, húmeda, grasienta, pegajosa, rugosa, áspera, agrietada, etc. Color anómalo, color sin uniformidad Presencia de mohos o limos extraños, ausencia de mohos o limos propios, cobertura microbiana irregular
Orificios/oquedades de la pasta	Ausencia, escasez o exceso de agujeros Distribución heterogénea Tamaño anormal Grietas, «ojos» irregulares, etc. Mohos o podredumbre en su superficie
Color de la pasta	Falta de uniformidad (marmoleado, moteado, manchas) Intensidad o tonalidad anormal
Consistencia y textura de la pasta	Falta o exceso de cohesión (friable, gomosa) Firmeza anormal (demasiado dura o blanda) Uniformidad de la pasta (granulada, estratificada, lisa, pastosa) Jugosidad impropia (seca, húmeda, fluida, grasienta)
Flavor, olor y sabor	Intensidad anormal de sabor (insípido, ácido, salado, amargo, dulce) Flavor impropio (amoniacal, rancio, a moho, jabonoso, a butírico, a ácido acético, quemado, pútrido, sulfuroso, etc.)

Adaptado de Drake y Delahunty (2017)

En cualquier caso, la mayoría de los defectos en los quesos suelen tener un origen microbiano. El crecimiento de mohos o bacterias no deseables procedentes del ambiente de las instalaciones puede alterar la superficie de las piezas (coloraciones anormales, presencia de micelio, limosidad superficial, etc.). En muchas variedades, estos defectos se controlan mediante la aplicación de agentes antifúngicos, como la natamicina (E 235), el recubrimiento de la corteza con aceites, ceras o resinas o el envasado con materiales de baja permeabilidad a los gases.

El interior de los quesos resulta un ambiente hostil para un amplio número de microorganismos debido a las condiciones de pH, actividad de agua (a_w), potencial redox, etc. No obstante, además de las BAL, existen otras especies que pueden multiplicarse y algunas producir gas. Como consecuencia, la masa del queso presenta distintas oquedades (orificios de diverso tamaño, ojos, hendiduras) cuyo número, tamaño y distribución dependen del microorganismo, tipo y cantidad de gas generado y de la elasticidad de la pasta y, en algunos casos, se produce un abombamiento e incluso puede tener lugar el agrietado de la pieza (Sheehan, 2011). El exceso de gas puede producirse en las primeras fases de la maduración (hinchamiento precoz) o manifestarse cuando la maduración está más avanzada (hinchamiento tardío). El origen de una y otra es distinto.

El hinchamiento precoz se caracteriza por la aparición temprana (a las 24-48 horas de la fabricación) de numerosos ojos pequeños repartidos irregularmente por la masa, debidos a los gases (dióxido de carbono e hidrógeno) generados principalmente por coliformes aunque, ocasionalmente, las causantes de la alteración son levaduras del género *Kluyveromyces* (Sheehan, 2011). Además, el queso afectado presenta sabores cuestionables y a veces desagradables. La presencia de estos microorganismos en el queso se debe al empleo de leche cruda de mala calidad microbiológica, a una incorrecta higiene de las instalaciones y/o a la contaminación postratamiento de la leche pasteurizada. Por otra parte, una acidificación insuficiente de la cuajada, por la inhibición del cultivo iniciador por antibióticos en la leche o fagos, favorece el crecimiento excesivo de coliformes y la consiguiente alteración. El hinchamiento tardío merece una descripción más detallada por ser un tema contemplado en esta tesis.

1.2.1. HINCHAMIENTO TARDÍO DE QUESOS DUROS Y SEMIDUROS

El hinchamiento tardío de los quesos (en adelante LBD, del inglés *late blowing defect*) puede manifestarse desde las 2 semanas de fabricación hasta después de varios meses de maduración. Se asocia normalmente con ciertas especies del género

Clostridium que generan ácido butírico a partir del ácido láctico que se ha acumulado por la actividad de las BAL. Un tipo de hinchamiento tardío de distinto origen se ha detectado en queso Cheddar y se ha asociado a la presencia de lactobacilos heterofermentativos, específicamente *Lactobacillus brevis* y *L. fermentum* (Sheehan, 2011). Igualmente, el defecto se ha observado en queso Emmental, debido al exceso de dióxido de carbono procedente de la descarboxilación del ácido aspártico merced a la acción de la L-aspartato-4-descarboxilasa, presente en ciertas cepas de propionibacterias, que rinde alanina y dióxido de carbono (Fröhlich-Wyder y Bachmann, 2007).

El LBD por fermentación butírica está asociado a quesos de pasta elástica, resultante de una cuajada eminentemente enzimática; son, por tanto, quesos duros y semiduros, de maduración media o larga, obtenidos por coagulación enzimática que han sido salados por aplicación superficial de sal o inmersión en salmuera. Cabe mencionar los quesos Gruyère y Emmental (Daly y col., 2010), Gouda y Edam (Walstra y col., 1999), Manchego (Garde y col., 2011a) e italianos tipo Grana y similares (Gobbetti, 2004), entre otros (véase tabla 1.4).

Tabla 1.4. Condiciones aproximadas de maduración de quesos susceptibles de presentar hinchamiento tardío.

Variedad	Condiciones de maduración
Beaufort	3 meses a 12-15 °C + 6 meses mín. a 10-12 °C
Comté	3-4 semanas a 8-12 °C + 6-8 semanas a 16-18 °C + 3 meses mín. a 5-7 °C
Edam	6 meses a 12-15 °C
Emmental	40-60 días a 20-24 °C + 2-12 meses a 10-13 °C
Gouda	4-6 semanas a 15 °C + 6-12 meses a 10 °C
Grana Padano	12-16 meses a 18-20 °C
Gruyère	3 semanas a 10 °C + 2-3 meses a 15-20 °C + 8-12 meses a 12-15 °C
Manchego	8-12 meses a 10-12 °C
Parmigiano Reggiano	18-24 meses a 18-20 °C

Una baja acidificación y la presencia de lactato y aminoácidos libres en estos quesos favorecen la germinación de las esporas de *Clostridium* spp. (Bassi y col., 2009). Estos microorganismos pueden multiplicarse en la matriz del queso mientras la sal difunde progresivamente desde la superficie hasta el interior, con la consiguiente reducción de la a_w hasta valores que inhiban su crecimiento (McSweeney y Fox, 2004). En este periodo los signos de la alteración pueden aparecer a partir de varias semanas de maduración.

Como se ha mencionado, la cuajada enzimática proporciona quesos con una masa elástica e impermeable que impide la disipación del gas producido durante la maduración, por lo que queda retenido en su interior dando lugar a la formación de ojos en la masa y, eventualmente, a un abombamiento perceptible externamente. Se ha informado de que 2 gramos de ácido láctico dan lugar a 1 litro de una mezcla de dióxido de carbono e hidrógeno (Fröhlich-Wyder y Bachmann, 2007). En el caso de los quesos Emmental y Gruyère, el volumen de CO₂ formado en la fermentación butírica excede al procedente de la fermentación propiónica (McSweeney y Fox, 2004), lo que, unido a la baja solubilidad del hidrógeno en la fase acuosa del queso (Daly y col., 2010), da lugar a un hinchamiento manifiesto. La acumulación de los ácidos butírico (Bergère y Favreau, 1987) y acético (Fröhlich-Wyder y Bachmann, 2007) confiere al queso un aroma y sabor cuestionables.

1.2.2. BACTERIAS ÁCIDO BUTÍRICAS (BAB)

La fermentación butírica fue descubierta por Louis Pasteur en 1861 en un microorganismo que llamó *Vibron butirique*. Poco después, Auguste Trécul utilizó por primera vez el nombre de *Clostridium* (del griego *klōstēr*, vástago, huso y el sufijo *idion*, pequeño) y en 1880 Adam Prazmowski describió a *Clostridium butyricum*. En las siguientes décadas se incluyeron en este género multitud de especies que, con el avance a través de los años en Microbiología, Biología Molecular y Genética Microbiana, se fueron reordenando. Actualmente hay alrededor de centenar y medio

de especies incluidas en el género *Clostridium*, siendo la cepa aislada por Prazmowski la especie tipo (LPSN, 2020).

Dentro del grupo *Clostridium sensu stricto* se encuentran las denominadas «bacterias ácido butíricas» (BAB) —formado por *C. butyricum*, *C. beijerinckii*, *C. sporogenes* y *C. tyrobutyricum*— por su capacidad de producir dicho ácido (Brändle y col., 2016).

Las BAB han sido aisladas de quesos con signos visibles de LBD (Cocolin y col., 2004; Le Bourhis y col., 2005; Bassi y col., 2015). Dentro de este grupo, *C. tyrobutyricum* —del griego *tyros*, queso, y aislado por Van Beymun y Pette (1935)— está considerado como el principal responsable del LBD (Klijn y col., 1995), aunque no se puede descartar la implicación de otras especies. Así, en queso Grana Padano, la especie de mayor crecimiento al comienzo de la maduración es *C. butyricum* debido a la presencia de lactosa residual pero, cuando se agota el disacárido, el sustrato existente es el lactato, lo que unido a un pH más bajo, favorece el crecimiento de *C. tyrobutyricum* (Gobbetti y Di Cagno, 2007). La ruta metabólica principal de la fermentación butírica está descrita en varias publicaciones, por ejemplo en la de Ordóñez y col. (2019a).

Según diversos autores, la contribución de estos clostridios al LBD no solo depende de la especie, sino también de la cepa. Arias y col. (2013) observaron que ciertos genotipos de *C. sporogenes* solo pueden producir gas en caldo Bryant Burkey con lactato, pero no en leche. De igual forma, Le Bourhis y col. (2007) y Garde y col. (2011a) encontraron diferencias significativas entre cepas en la producción de ácido butírico en quesos Emmental y Manchego.

1.2.3. ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DEL HINCHAMIENTO TARDÍO

Los estudios realizados en las últimas décadas muestran una incidencia de BAB superior al 50% —llegando, a veces, incluso al 100%— en tanques de leche destinada a la fabricación de queso (tabla 1.5), pudiendo pasar a la masa del mismo

y multiplicarse, incluso si la leche se ha pasteurizado. Téngase en cuenta que las esporas sobreviven a este tratamiento. Otra posible vía de contaminación, aunque minoritaria, puede ser la salmuera (Su e Ingham, 2000).

Tabla 1.5. Concentración de BAB en tanques de leche cruda de distintas especies.

Tipo de leche	Log esporas BAB/litro	Referencias
Vaca	2,33 – 3,14	Vissers y col., 2007; Zucali y col., 2014
Oveja	2,56 – 5,38	Scintu y col., 2004; Garde y col, 2011a; Arias y col., 2013
Cabra	2,40 – 3,70	Gonzalo, 2017

Las estrategias seguidas por la industria para minimizar la carga de BAB en la leche se basan en la implementación de medidas en la granja destinadas a la prevención de la contaminación o en la aplicación de tratamientos a la leche para disminuir el número de esporas.

1.2.3.1. Prevención de la contaminación de la leche en la granja

Los clostridios, procedentes del suelo, alcanzan con frecuencia las plantas que sirven de alimentación al ganado. Tras la digestión, la concentración de esporas en las heces supera entre 3 y 10 veces a la ingerida, ya que resisten el paso por el aparato digestivo de los rumiantes (Brändle y col., 2016) de donde pueden pasar a la ubre. Por tanto, para reducir el número de esporas en la leche es necesario, en primer lugar, aplicar Buenas Prácticas Ganaderas (BPG), Buenas Prácticas Higiénicas (BPH) y Buenas Prácticas Productivas (BPP) en la cría de los animales productores de leche. Del mismo modo, es esencial aplicar BPH en la sala y equipo de ordeño (Arias y col., 2013). Además, las medidas higiénicas a tomar deben extenderse al resto de las instalaciones, ya que normalmente el ambiente es favorable para el crecimiento de *Clostridium* spp.

Dado que las heces son el principal vehículo de las esporas, la alimentación que recibe el ganado está directamente relacionada con la presencia de *Clostridium* spp. en la leche. De hecho, en un estudio realizado en Francia, se observó que el número

de esporas en la leche era proporcional al porcentaje de ensilado que recibía el ganado, alcanzando el máximo en los meses de febrero y marzo (Coulon y col., 1991). De igual forma, en España, Garde y col. (2011a) observaron que la leche de oveja recogida en verano contenía mayor número de esporas debido a la necesidad de suplementar con ensilado la dieta de estos animales. La evidente relación entre el ensilado y el LBD ha llevado a prohibir, en Suiza y varias regiones francesas, el uso de leche de vaca para la fabricación de queso si procede de animales que reciben este tipo de alimentación (Gouet, 1963; Demarquilly, 1998).

1.2.3.2. Reducción del número de esporas de BAB en la leche

Entre los métodos físicos, las dos tecnologías más frecuentemente utilizadas para reducir el número de esporas de BAB presentes en la leche son la bactofugación y la microfiltración.

La bactofugación, patentada por Simonart (1962), consiste en la centrifugación de la leche a aceleraciones del orden de 10 000*g*. En el bactofugado se recogen las partículas de mayor densidad, entre ellas las esporas (pueden recogerse hasta el 80-98% del contenido inicial), acompañadas de parte de las caseínas (Brändle y col., 2016). Las líneas de procesado actuales pueden incluir dos bactófugas en serie, con lo que se logra reducir hasta el 99% de las esporas presentes inicialmente. El bactofugado se esteriliza mediante un tratamiento UHT (130-140 °C, 2-4 s) y, después de enfriarlo, se mezcla con el resto de la leche (Guinee y O'Callaghan, 2010) para recuperar en lo posible el material caseínico pero, aun así, siempre hay alguna pérdida de rendimiento quesero (Bylund, 2003).

La microfiltración se basa en el uso de membranas con poros de 1,4 µm de diámetro, suficiente para impedir el paso de los microorganismos de la leche (Holm y Malmberg, 1986; Piot y col., 1987). El tamaño de los glóbulos grasos es mayor que el de los poros, por lo que se requiere un desnatado previo para no colmatar la membrana. En la industria, el sistema «Bactocatch» calienta la leche desnatada a unos 50 °C antes de pasar por la unidad de membranas. El retentado —que contiene

el 99,5% de los microorganismos— se mezcla con la nata necesaria para la estandarización de la leche y se somete a tratamiento UHT en flujo continuo a 115-130 °C durante 3-4 s. Tras su enfriamiento, se incorpora a la leche desnatada para continuar con la elaboración de queso (Mistry y Maubois, 2004). La alternativa al desnatado requiere dos etapas sucesivas de homogeneización para disminuir el tamaño de los glóbulos grasos (Leconte y col., 2014).

1.2.3.3. Prevención de la germinación y crecimiento de BAB durante la maduración

Las células vegetativas de las BAB son las responsables de la fermentación butírica, por lo que una estrategia alternativa para controlar el LBD es impedir la germinación de las esporas y, con ello, el crecimiento de estas bacterias. Si bien una concentración del 3% NaCl (en peso seco) en el queso es suficiente para inhibir la germinación de los clostridios (Düsterhöft y Van den Berg, 2007), el tiempo necesario para alcanzar dicha concentración varía según el método de salado y dimensiones de la pieza. Así, en los quesos salados superficialmente se requieren semanas para lograr una concentración inhibitoria de NaCl en zonas alejadas de la superficie. Sin embargo, en el queso Cheddar, debido a que la sal se añade directamente a la cuajada, su distribución es uniforme antes del prensado, lo que explica la baja incidencia del LBD debido a las BAB (McSweeney y Fox, 2004).

Los nitritos son reconocidos inhibidores de los clostridios. Si bien su adición directa a la leche no está permitida, pueden generarse *in situ* por la reducción enzimática de los nitratos sódico (E 251) o potásico (E 252), cuyo uso está autorizado por el Reglamento (UE) 1129/2011, aunque no en la legislación particular de Francia, Grecia, Italia y EE. UU. (Klantschitsch, 1999; Schöbitz y col., 2005). Con la dosis máxima permitida (150 mg/litro de leche) se consigue retrasar la germinación de 10^4 esporas/litro hasta que se alcanza la suficiente concentración de sal en el interior del queso (Düsterhöft y Van den Berg, 2007). No obstante, los nitratos también inhiben a las propionibacterias, de manera que su uso es incompatible con la elaboración de quesos tipo Emmental (Brändle y col., 2016).

En el reglamento mencionado se autoriza el uso de lisozima (E 1105) y nisina (E 254) en la elaboración de quesos madurados. La lisozima está permitida de acuerdo al principio de *quantum satis*, siendo la dosis habitual de 500 unidades/ml (equivalentes a 25 mg/l) de leche (Brändle y col., 2016). Una dosis mayor de lisozima podría afectar a las BAL del cultivo iniciador, debido a que la enzima hidroliza el peptidoglicano de la pared celular inhibiendo en mayor grado, por tanto, el crecimiento de las bacterias Gram positivas (Brändle y col., 2016). Así, la lisozima es efectiva para el control del LBD cuando el número de esporas en la leche es bajo, inferior a unas 500 esporas/l (Brändle y col., 2016). Otro aspecto importante es que la lisozima puede provocar reacciones alérgicas en la población sensible a las proteínas del huevo (EFSA-NDA, 2014) pues procede mayoritariamente de la clara (Silvetti y col., 2017). Por tanto, debe declararse la presencia de este alimento en el etiquetado del queso (Reglamento (UE) 1169/2011).

La nisina es la única bacteriocina autorizada en la elaboración de quesos, con un límite máximo de 12,5 mg/kg de queso madurado (Reglamento (UE) 1129/2011). La nisina destruye las células vegetativas de *Clostridium* spp. mediante la creación de poros en la membrana citoplasmática. Si bien las esporas no se ven afectadas, la nisina impide la germinación de las mismas (Chen y Hoover, 2003). Para mantener su concentración en la matriz del queso, se ha probado la incorporación de cepas productoras de nisina, principalmente *Lactococcus lactis* (Rilla y col., 2003; Garde y col., 2011b). Además de estos cultivos, se ha estudiado el uso de BAL que sintetizan otras bacteriocinas, como *Streptococcus thermophilus* (Mathot y col., 2003), *S. macedonicus* (Anastasiou y col., 2009), *Lactobacillus gasseri* (Bogovič Matijašić y col., 2007), *L. plantarum* (González y Zárate, 2015) y *L. reuteri* (Ávila y col., 2017). También se ha informado del potencial de ciertas levaduras, como *Debaryomyces hansenii* y *Candida pelliculosa*, que producen metabolitos que inhiben a dichos clostridios en el queso (Fatichenti y col., 1983; Deiana y col., 1984; Gamal-Eldin y col., 2017).

El uso de tecnologías no térmicas es una alternativa a la adición de bioconservantes. Recientemente, Garde y col. (2016) han patentado un tratamiento con altas presiones hidrostáticas (APH) en quesos de oveja para el control del LBD. La aplicación de un ciclo de presurización (≥ 300 MPa, 14 °C, 10 minutos) a quesos de 7 días eliminó las células vegetativas e inhibió la germinación de las esporas que sobrevivieron al tratamiento, de manera que los quesos no presentaron signos de hinchamiento tras 60 días de maduración (Ávila y col., 2016).

1.3. MICROORGANISMOS PATÓGENOS POTENCIALMENTE PRESENTES EN QUESOS

Son muchos los microorganismos patógenos que se han encontrado en el queso. No es éste el momento para realizar un estudio pormenorizado, ya que se desvía del objetivo de la tesis. En cualquier libro de Microbiología de los Alimentos puede encontrarse una detallada información al respecto, por ejemplo Jay y col. (2009). Sin embargo, a modo de resumen se ofrece la figura 1.5 donde se pueden observar las notificaciones de patógenos en quesos durante el periodo 1983-2019 registradas por la Red de Alerta Alimentaria de la Unión Europea (RASFF, 2020). Obsérvese que *Listeria monocytogenes* fue la causante de cerca del 70% de la notificaciones. Uno de los objetivos de esta memoria es el control de *L. monocytogenes* en el queso. Es, pues, en esta bacteria en la que se realizará un análisis más detallado.

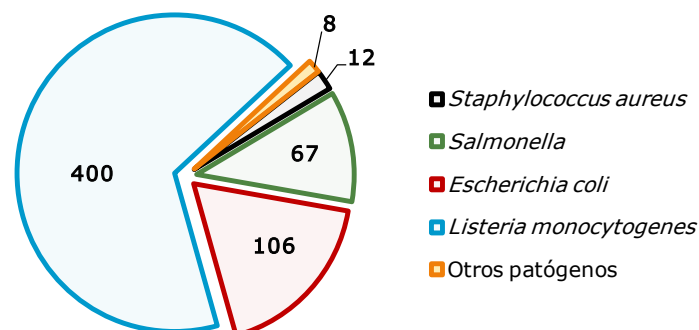


Figura 1.5. Número de notificaciones registradas en la Red de Alerta Alimentaria de la Unión Europea debidas a la contaminación de queso con bacterias patógenas durante 1983-2019.

1.3.1. *Listeria monocytogenes*

La primera descripción de este microorganismo se atribuye a Murray y col. (1926), quienes señalaron a una nueva especie, *Bacterium monocytogenes*, como el agente causante de la muerte por monocitosis de animales de experimentación. Por otra parte, Pirie aisló en 1927 del hígado necrosado de unos roedores una bacteria con las mismas características y más tarde la denominó *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940) en honor a lord Joseph Lister, el padre de la asepsia en la cirugía.

Durante varias décadas, *L. monocytogenes* fue la única especie del género, pero en la actualidad figuran 22 especies en la lista de nomenclatura de procariotas (LPSN, 2020). Morfológicamente, son bacilos cortos y regulares, dispuestos individualmente o formando cadenas cortas. Estos microorganismos son Gram positivos, microaerófilos o anaerobios facultativos, no esporulados, catalasa positivos y oxidasa negativos. En lo que respecta a su caracterización bioquímica, reaccionan de forma positiva a las pruebas de Voges-Proskauer y rojo de metilo; hidrolizan la esulina, pero no la urea ni la gelatina; no producen indol ni sulfuro de hidrógeno. Producen ácido de la D-glucosa y de otros azúcares. En su ADN, el contenido de guanina+citosina no supera el 40% (McLauchlin y Rees, 2015).

L. monocytogenes es una bacteria ubicua y está presente en ambientes muy diversos como suelos y entornos agrícolas (Sauders y Wiedmann, 2007) y ensilados (Ryser y col., 1997); en ecosistemas acuáticos, como aguas superficiales y residuales y en sistemas de depuración de agua (Sauders y Wiedmann, 2007). También se ha aislado en mamíferos, aves, peces y crustáceos (Wesley, 2007). Además de localizarse en entornos naturales, *L. monocytogenes* también se encuentra en instalaciones industriales (McLauchlin y Rees, 2015) y ha sido aislada de una gran variedad de alimentos. Asimismo, se ha descrito que entre un 0,6 y un 10% de los humanos son portadores asintomáticos de *L. monocytogenes* (Painter y Slutsker, 2007). Ante este escenario puede deducirse la extremada dificultad para conseguir alimentos libres de *L. monocytogenes* sin que exista una etapa listericida en alguna

fase de su procesado. Si este microorganismo alcanza los alimentos y las condiciones son favorables puede crecer hasta niveles potencialmente peligrosos.

El control del crecimiento de un microorganismo requiere conocer las condiciones que afectan a su supervivencia, es decir, las características intrínsecas del producto (principalmente pH y a_w) y del entorno donde se encuentra (temperatura de almacenamiento, humedad relativa, etc.), al igual que las técnicas de procesado, térmicas o no térmicas, empleadas en su elaboración. En este sentido, *L. monocytogenes* tolera valores de pH y a_w inhibidores para otros microorganismos. Se ha comprobado que puede crecer a intervalos de pH comprendidos entre 4,1-4,4 y 9,6, presentando un crecimiento óptimo a pH cercanos a la neutralidad (Lado y Yousef, 2007; Jay y col., 2009). El valor de a_w óptimo para su crecimiento es de 0,97, y el valor mínimo es 0,90, 0,92 o 0,93, según se emplee glicerol (Farber y col., 1992), NaCl o sacarosa (ICMSF, 1996), respectivamente, como soluto para alcanzar dicho valor.

En cuanto a la temperatura, *L. monocytogenes* se considera una bacteria mesófila, con una temperatura óptima de crecimiento entre 30 y 35 °C. Sin embargo, se ha comprobado que puede multiplicarse a temperaturas entre -0,4 y 45 °C (Walker y col., 1990). Barbosa y col. (1994) estimaron los parámetros de crecimiento de *L. monocytogenes* a 4, 10 y 37 °C, obteniendo unos tiempos de duplicación de 43, 6,6 y 1,1 h y unas fases de latencia de 151, 48 y 7,3 h, respectivamente.

L. monocytogenes presenta una termorresistencia elevada, solo ligeramente inferior al patógeno *Mycobacterium tuberculosis*, y superior a la de muchos microorganismos patógenos no esporulados, como *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. (Farber y Peterkin, 1991; Farber y col., 1998).

Los factores mencionados (pH, a_w y temperatura) son los más relevantes en el crecimiento microbiano. Existen regulaciones microbiológicas que contemplan el pH, la a_w y la vida útil del producto, por ejemplo, el Reglamento (CE) 1441/2007 de la UE que, en relación con la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos refrigerados

listos para el consumo, establece una carga de 100 ufc/g en alimentos que tengan unos valores de a) $\text{pH} \leq 4,4$ o $a_w \leq 0,92$; b) $\text{pH} \leq 5,0$ y $a_w \leq 0,94$ y c) vida útil < 5 días y vayan dirigidos a individuos sanos.

1.3.2. LISTERIOSIS

Desde su descubrimiento, *L. monocytogenes* se ha relacionado con casos de meningitis, septicemias e infecciones neonatales en humanos sin que se conociese su vía de transmisión (González-Zorn y Suárez, 2009). Su categorización como patógeno alimentario quedó establecida en la década de 1980 tras la aparición de varios brotes asociados al consumo de alimentos en Europa y Norteamérica (Jay y col., 2009).

El Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAs) —actualmente AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición)— publicó en el número 2 de su revista que *«Listeria monocytogenes es el agente causal de una enfermedad que se adquiere por su ingestión con los alimentos aunque también puede transmitirse de la madre al feto. La enfermedad puede ser leve o severa y... se manifiesta, en su versión leve, con fiebre, dolores musculares y a veces náuseas. La modalidad severa (invasiva) se caracteriza por fiebre repentina, dolor de cabeza intenso, rigidez del cuello y mareos, pudiendo invadir el sistema nervioso con la aparición de pérdidas del equilibrio y convulsiones, meningitis y encefalitis y, finalmente, septicemia»* (AESAs, 2005).

Cabe pensar, dada la ubicuidad de *L. monocytogenes*, que la exposición a este microorganismo es muy frecuente y, por tanto, la probabilidad de contraer la enfermedad es muy elevada. Los tenues síntomas de la manifestación leve (gastroenteritis febril), que además suelen remitir por sí solos a los pocos días, podrían hacer que su incidencia esté subestimada. Por el contrario, la listeriosis es una enfermedad que llega a ser letal cuando afecta a mujeres embarazadas (pueden sufrir abortos o partos prematuros) y personas inmunodeprimidas por razones fisiológicas (edad avanzada o muy temprana), patológicas (cáncer, sida, diabetes, etc.) o por efecto de tratamientos terapéuticos (quimioterapia, inmunosupresión

previa a un trasplante, etc.) (AESAs, 2005; González-Zorn y Suárez, 2009; Radoshevich y Cossart, 2018).

Según los últimos datos publicados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), durante 2018 se registraron en la UE 0,47 casos de listeriosis por cada 100 000 habitantes; valor muy inferior a los 64,1 y 20,1 casos/100 000 habitantes de campilobacteriosis y salmonelosis, respectivamente (EFSA, 2019). A pesar de su baja incidencia, la listeriosis es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más preocupantes por su elevada mortalidad. El mismo informe de la EFSA recoge una tasa de mortalidad por listeriosis (15,6%) unas cien veces superior a la de campilobacteriosis (0,03%) y salmonelosis (0,19%) en ese mismo año.

En cifras absolutas, de acuerdo con el mencionado informe de la EFSA, en la Unión Europea se confirmaron 2549 casos en 2018, cifra comparable (2183-2479) a la de los cuatro años anteriores (EFSA, 2019) pero, globalmente, ha ido en aumento desde la década de 1980. Obsérvese la evolución desde 2007 en la figura 1.6.

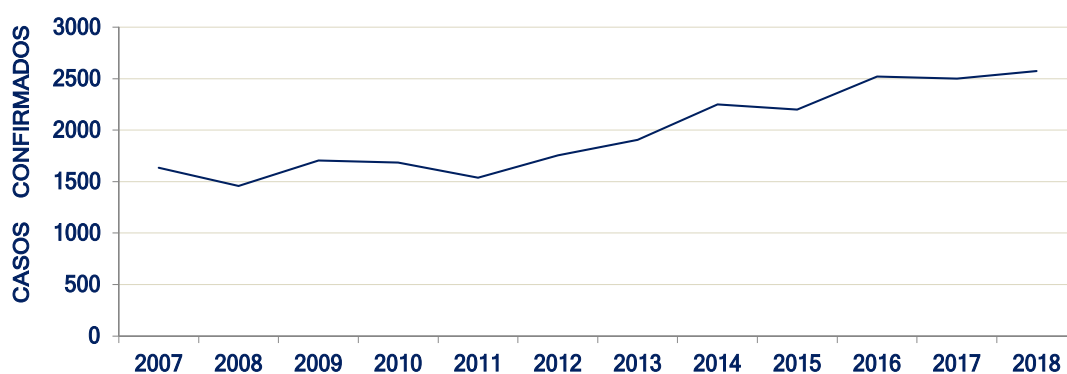


Figura 1.6. Evolución (2007-2018) del número de casos confirmados de listeriosis en la Unión Europea (ECDC, 2020).

Los productos implicados de forma habitual en los casos de listeriosis son los «alimentos listos para el consumo» (también conocidos por sus siglas en inglés como RTE, *ready-to-eat*). Estos productos se caracterizan por no cocinarse antes de ser ingeridos (p. ej., quesos, fiambres, ahumados, etc.) o requerir, si acaso, un simple calentamiento (p. ej., caldos preparados, mariscos *sous vide*, etc.).

Tabla 1.6. Brotes de listeriosis asociados al consumo de queso (1983-2019).

Año	País	Tipo de queso	Casos (muertes)	Ref. ^a
1983-87	Suiza	Vacherin Mont-d'Or	122 (33)	1
1985	EE. UU.	Fresco	152 (52)	1
1989	Luxemburgo	Camembert	2 (0)	1
1995	Francia	Brie de Meaux	36 (11)	1
2002	Canadá	Camembert, Tomme	135	2
2002-05	Alemania	Quargel (pasta blanda/semiblanda)	189 (26)	2
2005	Suiza	De pasta blanda (Tomme)	10 (5)	2
2006	Rep. Checa	De pasta blanda	78 (13)	2
2007	Noruega	Camembert	17 (3)	2
2008	Chile	Brie	91 (5)	2
2012	Australia	Camembert, Brie	26 (4)	3
2013	EE. UU.	Camembert	6 (1)	4
2015	EE. UU.	De pasta blanda	30 (3)	5
2019	Francia	Camembert, Brie	2 (2)	3

^a [1] De Buyser y col., 2001; [2] Martínez-Ríos y Dalgaard, 2018; [3] Bourdichon y col., 2019; [4] Jackson y col., 2018; [5] CDC, 2020.

Para conocer los brotes de listeriosis debidos al consumo de queso en el periodo 1983-2019 (tabla 1.6) se han consultado los artículos de los autores que se citan: De Buyser y col., 2001; McLauchlin y col., 2004; Amato y col., 2017; De Oliveira y col., 2017; Fox y col. 2017; EFSA-BIOHAZ, 2018; Jackson y col., 2018; Martínez-Ríos y Dalgaard, 2018; Bourdichon y col., 2019 y CDC, 2020; incluyen los brotes producidos en varios países europeos (Suiza, Reino Unido, Francia, Luxemburgo, Dinamarca, Italia, Austria, Alemania, República Checa, Bélgica, Noruega y España) y Estados Unidos, Canadá, Chile y Australia. El resultado ha revelado un total de 1344 casos, con 229 muertes, lo que representa un preocupante 17% de mortalidad. En la tabla 1.6 solo se han incluido los brotes mayores (los que afectaron a más de 40 individuos) y todos los debidos expresamente al grupo de quesos Brie y Camembert, en el que se ha incluido también el Vacherin Mont-d'Or, elaborado en el Canton de Jura (Suiza) y en el Departamento de Jura (Francia), porque es una variedad similar a los anteriores (cuajada láctica, textura blanda, moho blanco superficial). Los causantes de todos los brotes son quesos frescos o de pasta blanda y, de los 896

casos recogidos en la mencionada tabla, 437 (un 50%) corresponden al tipo de queso de pasta blanda madurado con moho superficial (*P. camemberti*) como el Brie, Camembert y Vacherin Mont-d'Or. Probablemente también habría que incluir los casos por consumo de quesos clasificados simplemente como de «pasta blanda» (108) y el Quargel (189). Por tanto, los brotes debidos a quesos, genéricamente, de pasta blanda representarían el 82%. No obstante, también se han detectado, aunque solo ocasionalmente, brotes de listeriosis producidos por quesos semiduros/duros o madurados, p. ej., en Portugal (De Oliveira y col., 2017), o por quesos con moho azul, p. ej., en Dinamarca (Jensen y col., 1994).

1.3.3. CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA DE *L. monocytogenes* EN QUESO

En general, *L. monocytogenes* tolera las condiciones ambientales que reinan durante la elaboración de diversas variedades de quesos, especialmente los de pasta blanda. Martínez-Ríos y Dalgaard (2018) observaron una alta prevalencia (1,9-13,1%) de *L. monocytogenes* en los quesos donde predomina una maduración en superficie por mohos (p. ej. *P. camemberti* en Camembert y Brie) o por bacterias (p. ej. *Brevibacterium linens* en quesos Taleggio, Pont l'évêque y Livarot), pues estos quesos favorecen el crecimiento de microorganismos al tener un pH próximo a la neutralidad.

Como se ha mencionado, *L. monocytogenes* crece a valores relativamente bajos de a_w , incluso a valores del orden de 0,90 (Jay y col., 2009) aunque habitualmente se considera el valor de 0,92 como a_w mínima para el crecimiento de este microorganismo a 4 °C. Así lo ha entendido la EFSA y lo ha establecido para los alimentos RTE (véase apartado 1.3.1). No obstante, aunque no pueda multiplicarse en salmueras, puede sobrevivir durante tiempos relativamente largos, desde 7 a más de 259 días (Melo y col., 2015).

Existen otros factores intrínsecos al queso que podrían contribuir al control de *L. monocytogenes*. Un ejemplo es el sistema lactoperoxidasa (LPS) presente de forma natural en la leche. Gay y Amgar (2005) observaron que la fase de latencia y

el tiempo de generación de las listerias en quesos Camembert elaborados con leche cruda duplicaron a los exhibidos en quesos elaborados con leche pasteurizada, lo que atribuyeron a la inactivación del sistema LPS durante el tratamiento térmico.

Las bacteriocinas sintetizadas por las BAL pueden participar también en la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*. Se han llevado a cabo varias investigaciones al respecto (Gálvez y col., 2008; Arqués y col., 2015; Silva y col., 2018). De forma resumida, puede decirse que, salvo excepciones, la presencia de bacteriocinas, o del microorganismo productor, inhibe el crecimiento del patógeno y/o reduce su carga inicial sin afectar al cultivo iniciador.

Los efectos combinados de pH, contenido en sal (en relación directa con la a_w) y temperatura pueden explicar la baja prevalencia de *L. monocytogenes* en quesos duros (y si son de muy larga maduración, sería suficiente con la reducción de la a_w) así como el escaso número de casos de listeriosis en los que han estado implicados (D'Amico y col., 2008; Little y col., 2009; EFSA, 2019). De hecho, las legislaciones alimentarias de varios países permiten la comercialización de quesos duros fabricados con leche cruda, tanto por los riesgos asociados a la presencia de *L. monocytogenes* como de otros microorganismos patógenos.

1.3.4. CONTROL DE *L. monocytogenes* EN LA INDUSTRIA QUESERA

La presencia de *L. monocytogenes* en el queso se debe a una insuficiente calidad higiénica de la leche cruda, a una pasteurización inadecuada de la misma o a una contaminación durante la elaboración del queso con listerias procedentes de la materia prima, el equipamiento, las instalaciones y/o el personal (Melo y col., 2015). Por tanto, la principal estrategia para controlar este patógeno es el cumplimiento riguroso del sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC). Además, es posible complementar estas medidas con la aplicación de tratamientos listericidas a los quesos obtenidos.

1.3.4.1. *Listeria monocytogenes* en leche cruda

L. monocytogenes alcanza recuentos muy bajos (0,05-0,1 ufc/ml) en la leche cruda (Meyer-Broseta y col., 2003). En general, su presencia se debe al uso de piensos de insuficiente calidad microbiológica y a la falta de higiene durante el ordeño, de forma que la leche se contamina por contacto de la ubre con restos de heces y/o la cama del ganado (Hunt y col., 2012; Melo y col., 2015).

En los quesos de leche cruda, el crecimiento o disminución de las listerias depende de las características fisicoquímicas y microbiológicas del medio (pH, a_w , cultivos competidores, bioconservantes) así como de las condiciones establecidas en su elaboración. Un ejemplo son los quesos suizos y los italianos extra-duros; su proceso de fabricación incluye la cocción de la cuajada a temperaturas elevadas (52-55 °C), lo que en la práctica supone la aplicación de un tratamiento térmico (D'Amico y col., 2017).

1.3.4.2. Pasteurización de la leche

Las condiciones del binomio tiempo/temperatura para la pasteurización de la leche de consumo se establecieron hace muchos años a 62,8 °C, 20 min (LTH) o 71,7 °C, 15 s (HTST), derivadas del centenar de estudios que se hicieron entre los años 1930 y 1960 sobre la termorresistencia de *Mycobacterium tuberculosis*, entre ellos los de Ball (1943) y Kells y Lear (1960). En la práctica comercial, el tratamiento térmico HTST que se aplica a la leche destinada a la fabricación de quesos es generalmente de 72 °C, 15 s. Con este binomio se reduce el número de *L. monocytogenes* hasta niveles seguros, ya que se ha sugerido que la leche cruda podría contener 1 célula/ml de *L. monocytogenes* (Lovett y col., 1987) y el tratamiento térmico mencionado ocasionaría una disminución de la carga de 5,5 reducciones decimales (Mackey y Bratchell, 1989). Es decir, el número final de listerias sería del orden de 1 célula cada 100 litros de leche, lo que se encuadraría en el término de «tolerancia cero» (1 célula viable en 25 ml).

1.3.4.3. Control de la contaminación durante la elaboración del queso

Un gran número de contaminaciones de alimentos con *L. monocytogenes* tienen su origen en las plantas de fabricación. La principal estrategia para minimizar este riesgo es la implementación de un plan de limpieza y desinfección que incluya un control de las superficies, un plan de mantenimiento de los equipos e instalaciones y un diseño de los flujos de personas, equipos y procesos que evite las contaminaciones cruzadas (Buchanan y col., 2017; FDA, 2017).

Cuando las listerias acceden a las instalaciones de procesado —vehiculadas normalmente por las materias primas, el personal y/o el equipamiento— pueden concentrarse en puntos de difícil acceso para las operaciones de limpieza y desinfección (Buchanan y col., 2017). En el caso de las queserías es frecuente encontrar listerias en los tanques y llenadoras de leche y de salmuera; cubas, paños, moldes y liras; baños y equipos para el salado; cintas transportadoras y equipos de reducción de tamaño (loncheadoras, picadoras, etc.); mobiliario auxiliar (carros, mesas) y sistemas de lavado; suelos y desagües, etc. (Bourdichon y col., 2019).

Una vez que *L. monocytogenes* se acantona en algún punto de la planta de procesado, es muy difícil su completa eliminación de las instalaciones a corto plazo (Bourdichon y col., 2019). En este contexto, se utiliza el término «persistente» para referirse a una población determinada de listerias que se aísla de forma recurrente en un mismo lugar de la instalación durante un tiempo prolongado (Ferreira y col., 2014), lo más probable embebidas en biofilms (Carpentier y Cerf, 2011) donde se encuentran protegidas frente a los agentes de limpieza (Orgaz y col., 2013; Buchanan y col., 2017).

1.3.4.4. Higienización del producto final

Una vez que el queso ha alcanzado el grado de maduración deseado puede comercializarse en piezas enteras o en otros formatos más pequeños, como cuñas, lonchas, dados, rallado, etc. Las operaciones de reducción de tamaño implican un

riesgo añadido de contaminación con *L. monocytogenes*. Puesto que la refrigeración y el envasado en anaerobiosis no impiden la multiplicación de este patógeno, es necesario recurrir a otros métodos para su control. La elección de la tecnología a aplicar ha de tener en cuenta, además de su efectividad, las siguientes premisas: ser compatible con las características del queso y no sustituir el cumplimiento de unas prácticas higiénicas correctas.

Además de las bacteriocinas, se ha propuesto (Han y col., 2014; Gouvea y col., 2017) el uso de otras sustancias con efecto antimicrobiano, como los extractos de plantas aromáticas y aceites esenciales (orégano, tomillo, ajo, romero, etc.), aunque según estos mismos autores se requieren más estudios para solventar la aparición de olores residuales no deseados en el queso debidos al uso de estos productos.

La EFSA evaluó el uso del fago P100, que presenta actividad antilisteria y fue patentado por Loessner y Carlton (2008), para la higienización de productos RTE con respecto a dicho patógeno (EFSA-BIOHAZ, 2016). Según este informe, la aplicación superficial de una suspensión con una carga aproximada de fago de 10^9 ufp/g (unidades formadoras de placas/g) podría conseguir entre 2,68 y 4,16 reducciones decimales del número de listerias presentes, dependiendo de la dosis exacta y tiempo de aplicación del fago, características del producto, etc. Si la carga inicial de *L. monocytogenes* es elevada (10^2 – 10^4 ufc/g), las células supervivientes podrían crecer durante el almacenamiento. Por tanto, la EFSA recomienda, por un lado, el uso del fago como una medida adicional para el control de listeria y, por otro, la validación de la eficacia del fago en cada producto antes de su distribución (EFSA-BIOHAZ, 2016).

Las tecnologías no térmicas se han aplicado con éxito a un gran número de alimentos RTE, y los quesos no han sido una excepción. Se han utilizado APH solas o en combinación con fagos, bacteriocinas o cultivos protectores (Medina y Núñez, 2011) para la eliminación de diversos patógenos en el queso. Se ha informado que, de acuerdo con los datos recogidos en las revisiones de diversos autores (O'Reilly y col., 2001; Martínez-Rodríguez y col., 2012; Picón, 2017), las APH permiten una

disminución de al menos 5 reducciones decimales en el número de listerias en quesos semiduros o duros. Los tratamientos evaluados fueron de 500-700 MPa durante 5-15 minutos a distintas temperaturas (10-30 °C).

El tratamiento con pulsos de luz permite la descontaminación superficial de los alimentos (Fernández y col., 2016); por tanto, una de las aplicaciones con mayor potencial sería la higienización de queso loncheado, aunque por el momento el número de trabajos publicados al respecto es escaso. No obstante, se ha demostrado que su uso consigue unas 3 reducciones decimales de *L. innocua* y *L. monocytogenes* en distintas variedades de queso, como el Cheddar (Proulx y col., 2017; De Moraes y col., 2020), el *American cheese* (Can y col., 2014) y el Gouda (Fernández y col., 2016). Sin embargo, el tratamiento pierde eficacia cuando la superficie de las lonchas presenta pequeños ojos irregulares, como es el caso del queso Manchego (Fernández y col., 2016).

La aplicación de radiaciones ionizantes es un tratamiento no térmico que se utiliza en la industria alimentaria con fines muy diversos, incluyendo la higienización de alimentos. Dada su importancia en el contexto de esta tesis, se tratará con mayor detalle en el apartado siguiente.

1.4. IRRADIACIÓN DE ALIMENTOS

Por radiación se entiende la emisión, propagación y transferencia de energía a través de cualquier medio, bien como ondas electromagnéticas (rayos UV, rayos X, rayos γ , etc.) o partículas subatómicas (partículas α , partículas β , neutrones). La radiación ionizante es un fenómeno natural. Aunque el ser humano ha estado expuesto a estas radiaciones desde su aparición en el proceso evolutivo, hasta el siglo XIX no se descubrió la naturaleza de este fenómeno. El premio Nobel de Física en 1903, Antoine Henri Becquerel, unos años antes de ser galardonado, en 1895, arrancó a la Naturaleza uno de los muchos secretos que guarda, la radioactividad, al observar que se velaban las placas fotográficas guardadas en un cajón junto a sulfato de uranio.

Poco después, en 1898, Marie y Pierre Curie (Marie fue la primera persona en concedérsele dos premios Nobel, en Física y Química) demostraron la radioactividad del uranio al observar que este metal por sí solo, sin el concurso de otras moléculas, se transformaba enigmáticamente en otros elementos, a uno de ellos lo «bautizaron» con el nombre de polonio (en referencia al país de origen de Marie) y, a otro, radio (del latín *radius*, rayo). En esa década, en 1895, se descubrieron también los Rayos X a cargo del físico alemán Wilhelm C. Roentgen que los denominó así por desconocer (incógnita) su naturaleza, solo sabía que se generaban por rayos catódicos al chocar contra ciertos materiales.

La frecuencia asociada a estas emisiones energéticas permite distinguir entre radiaciones ionizantes y no ionizantes, dependiendo de si tienen o no suficiente energía —proporcional a su frecuencia— para romper enlaces y producir la ionización de los átomos y las moléculas de la materia sobre la que inciden. Dentro de las radiaciones ionizantes se encuentran las partículas alfa (^4He), las partículas beta (electrones), los rayos X y los rayos gamma.

La irradiación de alimentos es un método físico no térmico de conservación de alimentos basado en la acción letal de las radiaciones ionizantes. La intensidad del tratamiento de irradiación viene dada por la energía que absorbe el material por unidad de masa (dosis absorbida). Su unidad en el Sistema Internacional es el gray (Gy, radiación necesaria para la absorción de 1 julio por kg de producto). La dosis que se aplica en el tratamiento depende del efecto que se desee conseguir (tabla 1.7). Se considera un tratamiento no térmico dado que el incremento de la temperatura del agua tratada con 10 kGy es de tan solo 2,5 °C.

En la historia de la irradiación de alimentos se diferencian, *grosso modo*, tres periodos (Diehl, 2001). El primero (en la primera mitad del s. XX) corresponde a los estudios iniciales sobre el potencial de este tratamiento para la conservación de alimentos. Sobre los conocimientos adquiridos, se establecieron las bases para la aplicación de las radiaciones ionizantes en alimentos y, a principios del siglo XX, se

registraron varias patentes en Estados Unidos (1905), en el Reino Unido (1906) y, algo más tarde, en Francia (1930). Sin embargo, en la práctica no tuvieron aplicación industrial, ya que las fuentes de radiación eran insuficientes para el tratamiento de grandes cantidades de alimentos (Diehl, 2001; Ehlermann, 2016).

Tabla 1.7. Dosis requeridas en las principales aplicaciones de la irradiación de alimentos.

Dosis	Aplicación
Dosis bajas (0,1-1 kGy)	Inhibición de la germinación y brote de tubérculos y bulbos Desinsectación de granos, frutas, hortalizas y frutos secos Retraso de la maduración de frutas Desparasitación (helmintos y protozoos) de productos cárnicos y vegetales
Dosis medias (1-10 kGy)	Descontaminación microbiológica de hierbas secas y especias Control de microorganismos patógenos no esporulados Aumento de la vida útil por destrucción de microorganismos alterantes Mejora de las propiedades tecnológicas del producto
Dosis altas (>10 kGy)	Esterilización de alimentos para vuelos espaciales y pacientes hospitalizados que requieran dietas estériles

Fuente: Adaptado del informe del Organismo Internacional de Energía Atómica (2017)

En un segundo periodo (1950-1970) se produjo un importante avance a raíz de la invención de distintos equipos de aceleradores de electrones (Diehl, 2001) y del desarrollo de la energía nuclear en EE. UU. que, entre otras cosas, suponía la disponibilidad de material emisor de radiación gamma (Ehlermann, 2016). A partir de estos progresos, tanto en EE. UU. como en otros países (Reino Unido, Alemania, Bélgica, Canadá, Francia, Unión Soviética, etc.) se fomentaron programas de investigación para la aplicación de radiaciones ionizantes en alimentos (dosis necesarias, envasado del producto, temperatura y atmósfera durante el tratamiento, efecto sobre la calidad sensorial, etc.) (Diehl, 2001). Sin embargo, el Comité Mixto FAO/OMS/OIEA esgrimió serias dudas acerca de los posibles efectos tóxicos derivados de estos tratamientos al no haber estudios suficientes. En la década de 1970 se realizaron estudios al respecto, siendo el más destacado el Proyecto Internacional para la Irradiación de Alimentos (IFIP, siglas de *International Project in the Field of*

Food Irradiation) en el que, desde 1970 hasta 1982, un total de 24 países aunaron recursos, con el patrocinio de la FAO y el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), para evaluar los efectos en la salubridad de los alimentos irradiados en respuesta a las cuestiones planteadas por el Comité Mixto FAO/OMS/OIEA (Elias, 1980). Estas investigaciones permitieron concluir que *«la irradiación de cualquier artículo alimenticio con una dosis total media de 10 kGy no presenta riesgos toxicológicos; por esto, no se requiere hacer más pruebas toxicológicas de los alimentos así tratados»*. Así mismo, se declaró que la aplicación del tratamiento a esas dosis *«no plantea problemas microbiológicos o nutricionales especiales»* (OMS, 1981). En este mismo informe, se indicaba la necesidad de ampliar el estudio a dosis por encima de 10 kGy. Finalmente, en 1997 el Grupo Mixto FAO/OIEA/OMS de Estudio sobre la Irradiación a Dosis Altas concluyó que *«los alimentos irradiados se consideran saludables en todo el intervalo de dosis tecnológicamente útil, desde menos de 10 kGy hasta las dosis previstas mayores de 10 kGy»* (OMS, 1999). Este último estudio señala que, para el tratamiento de alimentos a cualquier dosis, podrían utilizarse como fuente de irradiación los rayos gamma, los rayos X y los electrones acelerados (rayos beta), siempre que la energía asociada se mantenga en niveles establecidos, como seguidamente se menciona.

Los rayos gamma son fotones emitidos por isótopos radiactivos, estando únicamente autorizados para la irradiación de alimentos el cobalto-60 (^{60}Co) y el cesio-137 (^{137}Cs). El ^{60}Co se obtiene al someter al cobalto-59 a un bombardeo de neutrones en un reactor nuclear. El isótopo radiactivo emite rayos gamma a dos longitudes de onda, con energías de 1,17 y 1,33 MeV. El ^{137}Cs procede del tratamiento del combustible consumido en los reactores nucleares, por lo que su disponibilidad es limitada y genera residuos contaminantes (Melero y Pagán, 2007). Estos aspectos y su menor energía (0,66 MeV) explican que el uso del ^{137}Cs se reduzca prácticamente a instalaciones de laboratorios, a pesar de tener una mayor vida media (30,1 años) que el ^{60}Co (5,26 años) (Cleland, 2013; OIEA, 2017). Los

isótopos se desintegran de forma ininterrumpida, por lo que su actividad decae progresivamente, lo que obliga a reajustar el tiempo de tratamiento o de permanencia del alimento en contacto con la fuente de irradiación, para asegurar la absorción de la energía requerida. Otra consecuencia del uso de isótopos es la necesidad de mantenerlos sumergidos en piscinas de agua cuando es necesario acceder a la zona de tratamiento.

Los rayos X son también un tipo de radiación electromagnética pero su fuente es distinta; se generan de manera artificial al hacer incidir un haz de electrones de alta energía sobre una placa metálica (p. ej., de oro, tantalio, tungsteno), lo que provoca su frenado, surgiendo los rayos X por el otro lado de la placa. La radiación emitida está compuesta por un amplio intervalo de energía que, para su uso en alimentos, está limitada a 5 MeV, salvo en EE. UU. donde se permite operar con 7,5 MeV (OIEA, 2017). En el proceso de generación de los rayos X, una parte importante de la energía se pierde en forma de calor, por lo que es necesario refrigerar la placa metálica (Grandison, 2006).

Los electrones acelerados (rayos beta) se generan también a partir de electricidad en un acelerador de electrones. A diferencia de los dos tipos de radiación anteriores, los rayos beta están compuestos por partículas cargadas que, al ser sometidas a campos electromagnéticos, alcanzan la energía cinética suficiente para excitar y desplazar a los electrones más externos de las moléculas sobre las que inciden. En el caso de la irradiación de alimentos, la energía máxima permitida es de 10 MeV.

Si bien las características de las radiaciones ionizantes condicionan la interacción con la materia en la que inciden, tanto los efectos químicos como las consecuencias biológicas en el producto tratado vienen determinados por la dosis, independientemente de la fuente utilizada (Urbain, 1986; Mittendorfer, 2016). Por tanto, la selección de las condiciones de tratamiento vendrá condicionada por las dimensiones y densidad del producto, la disponibilidad de la fuente y la velocidad de

emisión o dosis a aplicar. En la tabla 1.8 se recogen las singularidades de los diferentes tipos de radiaciones.

Tabla 1.8. Tipos y características de las radiaciones ionizantes aplicables en alimentos.

	Rayos gamma	Rayos X	Electrones acelerados
Fuente	^{137}Cs , ^{60}Co	Electricidad	Electricidad
Naturaleza	Fotones	Fotones	Electrones
Masa y carga	Ninguna	Ninguna	Sí
Frecuencia	$>10^{19}$ Hz	$>10^{16}$ Hz	-
Energía	0,66 MeV (^{137}Cs) 1,33 y 1,77 MeV (^{60}Co)	≤ 5 MeV (UE) $\leq 7,5$ MeV (EE. UU.)	≤ 10 MeV
Dirección	Isotrópica	Dispersión hacia adelante	Unidireccional
Velocidad de emisión	0,0028 kGy/s	0,27 kGy/s	100 kGy/s
Penetración	Muy buena (aprox. 40 cm)	Muy buena (aprox. 30 cm)	Limitada (5 - 7 cm)
Formato de producto	Palés (densidad media)	Palés (densidad media)	Cajas (densidad baja)
Emisión	Ininterrumpida	Solo con sistema encendido	Solo con sistema encendido
Eficiencia energética	Baja	Media	Excelente

Fuente: Adaptado de OIEA (2017) y Ordóñez y col. (2019b)

Debido a su naturaleza corpuscular, la radiación con electrones acelerados tiene un menor poder de penetración que los rayos gamma y los rayos X, carentes de masa y de carga eléctrica. Como consecuencia, estas radiaciones permiten el tratamiento simultáneo de volúmenes mayores que los electrones acelerados, que no suelen penetrar más allá de los 5-7 cm de espesor (Mittendorfer, 2016). Sin embargo, este inconveniente puede subsanarse aplicando tratamientos bilaterales cuando el producto no puede distribuirse en capas finas. Por otra parte, el tiempo de tratamiento con electrones acelerados es del orden de segundos, mientras que para alcanzar la misma dosis con rayos X o gamma se tardan horas.

Otro aspecto diferenciador de las fuentes de radiación es su eficiencia energética. Los rayos gamma emiten de forma continua, por lo que la rentabilidad de la instalación es máxima en funcionamiento en continuo. No hay que olvidar que las plantas de tratamiento que utilizan isótopos radiactivos requieren de fosos de confinamiento cuando no son utilizados. Por otra parte, estas fuentes emiten en todas las direcciones, por lo que el diseño de estas instalaciones puede ser circular en torno a la fuente de emisión.

La conversión de la energía eléctrica en rayos X es un proceso poco rentable y en la actualidad apenas se emplea en la irradiación de alimentos (Melero y Pagán, 2007).

1.4.1. PRINCIPIOS BÁSICOS DE LOS ACELERADORES DE ELECTRONES

Una de las principales ventajas de los rayos X y los electrones acelerados es que solo requieren de energía eléctrica para su generación. Es decir, la radiación ionizante cesa accionando el interruptor de electricidad del equipo. El funcionamiento de un equipo de electrones acelerados se basa en el incremento de la velocidad que experimentan estas partículas cuando se someten a un campo eléctrico paralelo a su trayectoria, adquiriendo energía cinética en un sistema al vacío. Así, cuanta más distancia recorran las partículas, mayor energía acumularán a la salida del acelerador. Los electrones pueden adquirir la energía siguiendo una trayectoria lineal, como en el caso de los aceleradores tipo Dynamitron o LINAC, o circular, como en los aceleradores tipo ciclotrón. Basado en este último diseño, Pottier (1989) describió un acelerador de electrones del tipo circular, el Rhodotron, mucho más compacto y capaz de generar haces de electrones con una energía de salida entre 1 y 20 MeV. En la figura 1.7 se muestra el esquema de una planta de irradiación equipada con un acelerador de electrones de este tipo, utilizado en los trabajos de esta tesis doctoral, y que opera a 10 MeV.

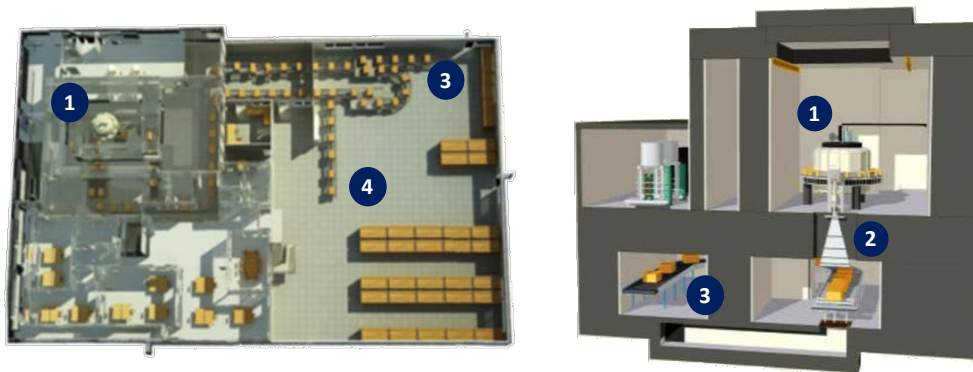


Figura 1.7. Plano general (izquierda) y transversal (derecha) de una planta de irradiación equipada con un acelerador de electrones Rhodotron (1). El producto a irradiar avanza hacia el cono de barrido (2) en una cinta transportadora (3) que lo devuelve a la zona de carga/descarga (4). Adaptado de Jongen (2009).

El acelerador de electrones Rhodotron (figura 1.8) consta de un generador o cañón de electrones (A) y 9 electroimanes deflectores (B) acoplados a una cámara (C) con el interior revestido de cobre y en cuyo centro se encuentra el núcleo que genera un campo electromagnético. A diferencia de otros aceleradores, el campo eléctrico creado entre este núcleo y las paredes de la cámara es radial y toma su valor máximo en el plano medio, por donde circula el haz de electrones. A la salida de la cámara se encuentra otro electroimán (D). Los electrones se generan en una rejilla metálica incandescente (cátodo) dentro del cañón (A) y son propulsados al interior de la cámara (C), donde se acoplan con el campo eléctrico variable con una frecuencia de 107 MHz, de manera que ganan velocidad hasta llegar al núcleo central. La polaridad de dicho campo cambia cuando los electrones pasan por el centro de la cámara, por lo que se aceleran de nuevo hasta llegar a la pared de la cavidad. Cada uno de los nueve electroimanes deflectores (B) desvía la trayectoria de los electrones al punto diametralmente opuesto pasando de nuevo por el núcleo central, de manera que la proyección de la trayectoria recorrida en varios bucles conforma el dibujo de una flor, que da nombre al equipo (Rhodotron, del griego *rhodos*, rosa).

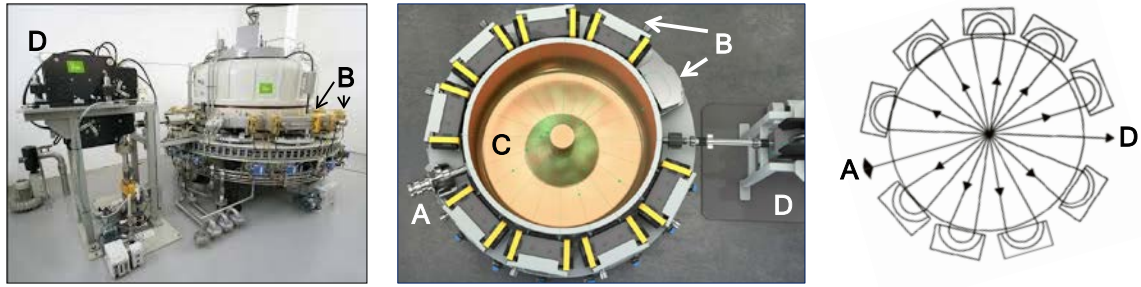


Figura 1.8. Acelerador de electrones Rhodotron TT200 y trayectoria del haz en su interior.

En el recorrido de cada diámetro se gana 1 MeV, por lo que el haz de electrones finalmente abandona la cámara con una energía de 10 MeV. En ese punto, el décimo electroimán (D) desvía su trayectoria 90° para entrar en el cono de barrido donde se dispersa, alcanzando una anchura aproximada de 1 m, e incide sobre los productos a tratar dispuestos en la cinta transportadora que, tras el tratamiento, los devuelve a la zona de carga/descarga (figura 1.7).

Los parámetros que determinan la dosis de tratamiento son, además de la energía del haz de electrones a la salida de la cámara, la potencia del haz, la longitud de barrido (anchura de la salida del cono) y la velocidad del paso del producto bajo el haz de electrones (Melero y Pagán, 2007).

1.4.2. EFECTO DE LAS RADIACIONES IONIZANTES EN LOS MICROORGANISMOS

Los efectos letales de las radiaciones ionizantes se deben principalmente a las alteraciones químicas del ADN y otras moléculas relacionadas con la viabilidad celular, como las enzimas y ciertas proteínas (Dickson, 2001). En general, se considera que la ruptura de los enlaces que mantienen la doble hélice del ADN conducen a la muerte celular (Grandison, 2006). Los cambios químicos producidos por las radiaciones —sean rayos gamma, rayos X o electrones acelerados— en los componentes celulares tienen lugar mediante dos mecanismos. Por un lado, el impacto del haz de electrones en puntos aleatorios de la doble cadena de ADN y en otras moléculas produce su excitación e ionización (efecto directo o primario) (Dickson, 2001; Tahergorabi y col., 2012; Ordóñez y col., 2019b). Por otro, la interacción de los electrones con el material sensible y las moléculas adyacentes

genera iones y radicales libres, que a su vez pueden desencadenar una cascada de reacciones hasta que se forman compuestos estables, denominados productos radiolíticos (Ordóñez y col., 2019b). Este efecto indirecto o secundario es especialmente relevante en el caso del agua. Los productos formados —radicales hidroxilo (OH·), superóxido (HO₂·) y moléculas como peróxido de hidrógeno (H₂O₂)—son altamente reactivos y oxidantes (Tahergorabi y col., 2012), por lo que interfieren en los procesos celulares de oxidación-reducción (Ordóñez y col., 2019b). El daño celular es la suma de ambos efectos aunque, en función del contenido en agua de la matriz irradiada, predominará uno u otro mecanismo. En cualquier caso, la muerte celular tiene lugar por la ruptura de los ácidos nucleicos o por la imposibilidad de reparar dicho daño. También puede producirse una reducción de la viabilidad celular mediante tres fenómenos: los cambios químicos pueden interferir en los procesos de expresión génica y/o síntesis de enzimas necesarias para la división celular; los productos oxidantes de la radiolisis del agua u otras moléculas ocasionan un desequilibrio metabólico y, por último, tanto la radiación como los productos radiolíticos pueden alterar la permeabilidad de la membrana celular (Ordóñez y col., 2019b).

La cinética de muerte de una población microbiana sometida a radiaciones ionizantes se ajusta, como en el caso de los tratamientos térmicos, a una reacción de primer orden. Se define por la *dosis de reducción decimal* (valor D), esto es, la dosis necesaria para reducir la población microbiana en un 90%, que viene dada por la siguiente expresión matemática:

$$D = \frac{d}{\log N_0 - \log N}$$

Siendo:

D: dosis de reducción decimal (kGy);

d: la dosis de radiación absorbida (kGy) y

N₀, N: la carga microbiana antes y después del tratamiento, respectivamente.

La representación del logaritmo del número de supervivientes frente a la dosis absorbida se ajusta a una recta, cuya pendiente es la inversa del valor D. Habitualmente la inactivación microbiana por irradiación sigue un modelo exponencial. No obstante, en ocasiones se observan desviaciones a dosis bajas y altas conocidas como «hombros» y «colas», respectivamente. Para describir matemáticamente estos comportamientos se emplean modelos no lineales, como los usados en la distribución de Weibull (Mayer-Miebach y col., 2005). Los hombros son comunes en los microorganismos más radiorresistentes (p. ej., *Deinococcus radiodurans*), y podrían deberse a que las células tienen capacidad para reparar lesiones en el ADN u otras estructuras, aunque superada una dosis crítica de irradiación, éstas son irreversibles. En consecuencia, el número de microorganismos disminuye exponencialmente y el hombro desaparece. Las explicaciones para la aparición de colas son, en general, poco satisfactorias, aunque se ha hipotetizado que se trata de una respuesta al estrés medioambiental, ya que este comportamiento se ha observado en poblaciones sometidas a distintos tratamientos y condiciones microbicidas (Dickson, 2001).

La radiorresistencia depende tanto de factores intrínsecos al microorganismo como de las condiciones del tratamiento y de la matriz que lo contiene (Dickson, 2001), lo que explica las marcadas diferencias en los valores D dentro de una misma categoría de alimentos (tabla 1.9). No obstante, de forma general se asume que cuanto más complejo y mayor sea el tamaño del microorganismo, menor es su radiorresistencia. Por tanto, los más resistentes serían los virus y después, en orden decreciente y salvo excepciones, estarían las esporas bacterianas, las bacterias Gram positivas, las bacterias Gram negativas, los mohos y levaduras y finalmente, los parásitos (AESA, 2005). Los mohos presentan gran variabilidad entre géneros, ya que pueden producir metabolitos que les confieren cierta radiorresistencia, como pigmentos, compuestos sulfurados, alcoholes, ácidos, etc. (Cabo Verde, 2018). En el caso de las esporas bacterianas, su contenido en agua es típicamente inferior al de

las células vegetativas (10% vs. 70%, respectivamente), por lo que el daño por el efecto indirecto de la radiación es mucho menor (Dickson, 2001). Dentro de cada especie, e incluso cepa, pueden existir también variaciones debidas al tamaño de la población, así como a las condiciones y fase de crecimiento (Cabo Verde, 2018).

La presencia de oxígeno durante la irradiación aumenta la letalidad del tratamiento, probablemente por la mayor formación de radicales superóxidos y peróxidos que pueden potenciar el efecto indirecto de la radiación (Cabo Verde, 2018). Así, se ha descrito que el valor D puede ser entre 2,5 y 4,7 veces mayor en condiciones anaerobias que en presencia de oxígeno (Da Silva Aquino, 2012).

El contenido en humedad del producto irradiado tiene una gran influencia en la eficacia del tratamiento, ya que los radicales producidos a partir de la molécula de agua son los principales agentes responsables del efecto indirecto de las radiaciones en los microorganismos. Así, se ha comprobado en soluciones acuosas que el número de roturas en el ADN debido a los fenómenos de oxidación puede ser bastante mayor que en matrices con un bajo contenido en humedad. Por ejemplo, se producen 0,2 roturas/Gy/Mpb (roturas/gray/megapares de bases) de ADN del fago lambda cuando se irradia en presencia de agua, mientras que el número se reduce a <0,001 roturas/Gy/Mpb si el tratamiento se realiza en seco (Daly, 2012). Además del contenido en humedad, también es importante el estado en el que se encuentran las moléculas de agua. Se ha demostrado repetidas veces que la radiorresistencia de los microorganismos en alimentos congelados es mayor que la exhibida bajo refrigeración o a temperatura ambiente. Compárese, por ejemplo, los valores D ofrecidos en la tabla 1.9 para *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli* en helado a 0 y a -72 °C. Estas diferencias se han atribuido a una disminución de la a_w y a la menor difusión de los radicales libres (Da Silva Aquino, 2012). Cuando las temperaturas alcanzan valores subletales, por encima de 45 °C, se observa un efecto sinérgico con los tratamientos de irradiación, que se atribuye al daño en los sistemas de reparación celular (Cabo Verde, 2018).

Tabla 1.9. Radiorresistencia (valores D) de microorganismos en diversos productos lácteos

Microorganismo	Producto	Condiciones	Valor D (kGy)	Ref. ^a
<i>Bacillus cereus</i>	Helado	-78 °C	4,10	1
	Yogur	-78 °C	4,00	1
	Queso Mozzarella	-78 °C	3,60	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	Helado	-78 °C	2,00	2
	Queso Mozzarella	-78 °C	1,40	2
	Queso Anthotyros	4 °C	1,38	3
	Queso Feta	2 °C	1,33	4
	Queso fundido	10 °C	0,84-0,93	5
	Queso Cheddar	14 °C	0,64	6
	Queso Camembert	T ^a ambiente	0,50	7
	Queso pasta blanda	4 °C	0,49	8
	Queso corteza lavada	4 °C	0,41	8
	Leche cruda	-	0,16	9
<i>Listeria ivanovii</i>	Helado	-72 °C	0,71-0,77	10
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Leche de fórmula	Polvo	1,06-1,71	11
		Reconstituida	0,24-0,37	11
	Leche	3,5% grasa	0,74	12
		2% grasa	0,71	12
		1% grasa	0,65	12
		desnatada	0,54	12
<i>Staphylococcus aureus</i>	Queso fundido	10 °C	0,60-0,63	5
	Queso Cheddar	14 °C	0,54	6
	Leche cruda	-	0,13	9
<i>Penicillium cyclopium</i>	Queso Cheddar	20-22°C	0,42	13
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Helado	-72 °C	0,38	14
		0 °C	0,13	14
<i>Mycobacterium</i> spp.	Queso fresco	T ^a ambiente	0,37	15
<i>Escherichia coli</i>	Helado	-72 °C	0,28-0,31	10
		-72 °C	0,2	14
		0 °C	0,17	14
	Leche cruda	-	0,06	9
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Queso Cheddar	20-22°C	0,21	13
<i>Coxiella burnetii</i>	Leche cruda	-	0,15	9
<i>Campylobacter jejuni</i>	Leche cruda	-	0,07	9

^a [1] Hashisaka y col., 1990b; [2] Hashisaka y col., 1989; [3] Tsiotsias y col., 2002; [4] Konteles y col., 2009; [5] Kim y col., 2010; [6] Kim y col., 2007; [7] Bougle y Stahl, 1994; [8] Ennahar y col., 1994; [9] Ward y col., 2020; [10] Jo y col., 2007; [11] Osaili y col., 2007; [12] Mahmoud, 2009; [13] Blank y Corrigan, 1995; [14] Kamat y col., 2000; [15] Badr, 2011.

La composición de la matriz, aparte del contenido en agua, influye también en la dosis necesaria para la reducción microbiana, ya que algunos de sus componentes pueden tener un efecto protector o, alternativamente, potenciador de la acción letal de la radiación. Así, las sustancias que secuestran radicales libres disminuyen la actividad bactericida. Un ejemplo es el NaCl, ya que el ion cloruro puede interactuar con el radical hidroxilo (Cabo Verde, 2018). Por el contrario, la presencia de ciertos aditivos, como los nitritos y los nitratos, tienen un efecto sinérgico, potenciando la destrucción de microorganismos en los tratamientos de irradiación (Cabo Verde, 2018).

1.4.3. EFECTO DE LAS RADIACIONES IONIZANTES EN LOS ALIMENTOS Y SUS COMPONENTES

Cualquier método de conservación de alimentos produce cambios químicos, se trate de un proceso «clásico» —tratamiento térmico, fermentación, congelación, salado, ahumado, etc.— o de tecnologías más recientes, como la irradiación o las APH. En el caso de la irradiación, la magnitud de estos cambios depende de las condiciones del tratamiento (dosis aplicada, radiación absorbida, temperatura del proceso) y de factores relacionados con el alimento, como su estado físico o su composición (EFSA, 2011). Ya se ha mencionado que el tratamiento con radiaciones ionizantes es una tecnología no térmica, lo que constituye una ventaja frente a otros métodos de conservación de alimentos, especialmente el tratamiento térmico, por lo que se puede aplicar a productos que están crudos o congelados (Ehlermann, 2014).

1.4.3.1. Efecto en los componentes de los alimentos

En general, la matriz alimentaria ejerce una acción protectora frente a la radiación, de modo que el efecto sobre un compuesto aislado es mayor que cuando forma parte del alimento (Fan, 2013). En los siguientes apartados se describen brevemente los principales cambios provocados por las radiaciones ionizantes en los componentes mayoritarios de los alimentos.

Lípidos

La fracción lipídica es la más sensible a las radiaciones ionizantes. Estas radiaciones catalizan su oxidación, ya sea por el efecto de la incidencia directa de la radiación en las moléculas de los lípidos o por la acción de los radicales libres originados a partir del agua (Stewart, 2009). El alcance y naturaleza de estos cambios dependen de la dosis absorbida, del estado físico de los lípidos y su grado de insaturación, de la presencia de antioxidantes y humedad en el alimento, así como de las condiciones (temperatura, atmósfera, luz) durante el tratamiento y posterior almacenamiento (Stewart, 2009; EFSA, 2011).

El fenómeno de oxidación lipídica es más acusado en alimentos envasados en presencia de oxígeno y con un elevado contenido de ácidos grasos insaturados (EFSA, 2011). Seisa y col. (2004) no observaron cambios aparentes durante la maduración de queso Cheddar irradiado a 4 kGy en el contenido de ácidos grasos libres, pero sí un aumento de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA), quizás como resultado de la acción oxidativa de los radicales libres formados a partir de moléculas de agua. No obstante, al avanzar la maduración, el índice de TBA disminuía y no difería significativamente de las muestras no irradiadas.

Otro de los posibles efectos de la oxidación lipídica es la formación de óxidos de colesterol (COP). En general, a dosis medias (4-6 kGy) no se han encontrado diferencias significativas en el contenido de COP de distintos alimentos, incluido el queso blando (Zanardi y col., 2009; EFSA, 2011; Lozada-Castro y col., 2016). De acuerdo con el trabajo de Lozada-Castro y col. (2016), la suma de las concentraciones de COP detectadas en distintos alimentos tras la irradiación a una dosis mayor (8 kGy) oscilaron entre 0,478 µg/g (salmón ahumado) y 3,986 µg/g (carne picada de ternera). En cualquier caso, estas concentraciones son más de 100 veces inferiores a los niveles tóxicos indicados tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* (Zanardi y col., 2009; Lozada-Castro y col., 2016). El uso de bajas

temperaturas, la escasez de oxígeno, la presencia de antioxidantes y un envase adecuado minimizan la oxidación lipídica (EFSA, 2011).

En la radiolisis de los ácidos grasos libres y los triglicéridos —componentes mayoritarios de la fracción lipídica— se produce de manera preferente la escisión de los enlaces próximos al grupo carbonilo, dando lugar a distintos compuestos, como dióxido y monóxido de carbono, hidrógeno, aldehídos e hidrocarburos (Fan, 2013). Estos últimos componentes tienen uno o dos átomos de carbono menos y un doble enlace más (tabla 1.10), y su determinación es una de las pruebas analíticas de referencia adoptada por la UE para detectar alimentos irradiados (EFSA, 2011).

Tabla 1.10. Hidrocarburos y 2-alkilciclobutanonas (2-ACB) producidos por la radiolisis de los principales ácidos grasos presentes en los alimentos.

Ácido graso	Hidrocarburo C _{n-1}	Hidrocarburo C _{n-2:1}	2-ACB
Ác. palmítico (C _{16:0})	Pentadecano (C _{15:0})	1-Tetradeceno (C _{14:1})	2-dodecilCB
Ác. esteárico (C _{18:0})	Heptadecano (C _{17:0})	1-Hexadeceno (C _{16:1})	2-tetradecilCB
Ác. oleico (C _{18:1})	8-Heptadeceno (C _{17:1})	1,7-Hexadecadieno (C _{16:2})	2-tetradecenilCB
Ác. linoleico (C _{18:2})	6,9-Heptadecadieno (C _{17:2})	1,7,10-Hexadecatrieno (C _{16:3})	2-tetradeca-5',8'-dienilCB

Fuente: EFSA (2011)

Además de estos compuestos, la radiolisis de un triglicérido o de un ácido graso rinde 2-alkilciclobutanonas (2-ACB), cuya ruta de formación se muestra en la figura 1.9. Estas moléculas contienen el mismo número de átomos de carbono que el ácido graso de partida, y el grupo alquilo se encuentra en la posición 2 del anillo. En la tabla 1.10 se incluyen las 2-ACB resultantes de la irradiación de los principales ácidos grasos de los alimentos. Las 2-ACB únicamente se han detectado de forma consistente en productos irradiados, por lo que su análisis constituye la base del método estándar EN1785:2003 para determinar si ciertos alimentos han sido sometidos o no a radiaciones ionizantes (EFSA, 2011).

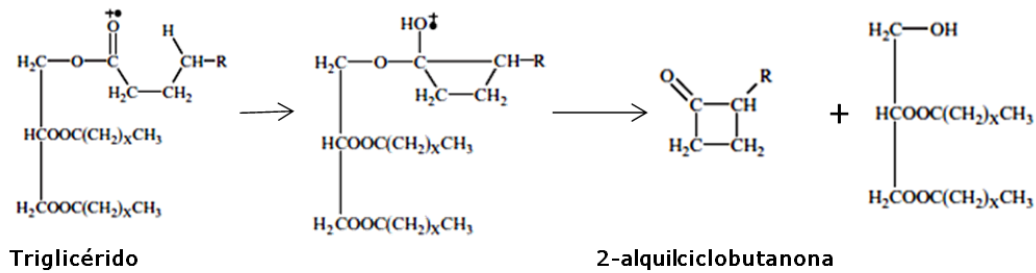


Figura 1.9. Ruta de formación de las 2-ACB. Adaptado de Stewart (2009).

Se ha informado (AESAN, 2010) que la isomerización *cis-trans* de los dobles enlaces de ciertos lípidos es otro posible efecto de las radiaciones ionizantes. De forma natural, las grasas insaturadas presentan la configuración *cis*, aunque la leche y la carne de los rumiantes contienen pequeñas concentraciones de ácidos grasos *trans* (Aro y col., 1998). Algunos autores han observado la aparición de isómeros *trans* en alimentos irradiados (Fan, 2013), aunque se requieren dosis muy elevadas (100 kGy) para su detección, muy alejadas de los máximos 10 kGy autorizados para aplicar a los alimentos. Sin embargo, se ha descrito un aumento de la concentración del isómero *trans* en carne de ternera tratada con dosis de irradiación de hasta 8 kGy (EFSA, 2011; Fan, 2013). En cualquier caso, el efecto es mínimo si se compara con las variaciones en el contenido de ácidos grasos *trans* que, de forma natural, presenta la carne de ternera (Fan, 2013) y, en general, los alimentos procesados (bollería, helados, etc.) que utilizan aceites vegetales hidrogenados.

Proteínas

Los cambios inducidos en las proteínas se deben a reacciones de disociación, agregación, entrecruzamiento y oxidación. La respuesta a estos procesos es muy diversa y está influida por la estructura de la proteína (fibrosa, globular), su grado de desnaturalización y los aminoácidos que la componen (EFSA, 2011). Se ha comprobado la resistencia a la radiación de ciertas proteínas; entre ellas, se ha descrito que las enzimas son bastante estables, incluso a dosis elevadas (Stewart, 2009). Żegota y Małolepszy (2008) concluyeron que la aplicación de tratamientos de

irradiación a dosis medias no modifica propiedades de la caseína como la acidez, solubilidad o adhesividad. Por el contrario, la radiación provoca un aumento de la viscosidad de la clara de huevo, lo que dificulta su batido (Stewart, 2009). Otra de las consecuencias de los tratamientos de irradiación es la posible modificación del potencial alergénico de ciertas proteínas debido a cambios de conformación (EFSA, 2011). Un ejemplo son los estudios que señalan una disminución de la alergenicidad de la α -caseína y la β -lactoglobulina de la leche al ser irradiadas (Lee y col., 2001b; Byun y col., 2002), aunque otros autores no han observado dicho efecto (Kaddouri y col., 2008).

A pesar de las modificaciones descritas, se puede asumir que la radiación no supone una pérdida de la calidad nutricional de las proteínas, ya que los aminoácidos que las componen sufren solo ligeros cambios por el tratamiento (Stewart, 2009). Sin embargo, los aminoácidos son bastante sensibles a la radiación cuando están libres o aislados (Ordóñez y col., 2019b). Según su naturaleza, pueden dar lugar a distintos productos radiolíticos como amoníaco, ácidos cetónicos, compuestos tipo amida y diaminoácidos (EFSA, 2011). Los aminoácidos azufrados —los más sensibles junto con los aromáticos— dan lugar a compuestos volátiles (metilmercaptano, sulfuro de hidrógeno) asociados al denominado «olor a irradiación» inducido en algunos alimentos tratados (Fan, 2013).

Hidratos de carbono

Los mono- y disacáridos pueden reaccionar con los radicales procedentes de la radiolisis del agua —especialmente con el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$)— formándose ácidos, cetonas y aldehídos (Stewart, 2009). Dentro de estos últimos, destaca el malondialdehído (MDA) (Fan, 2013). En un estudio realizado en zumo de manzana irradiado se observó una acumulación de MDA del orden $0,23 \mu\text{g/ml}$ por kGy, aunque se redujo a la mitad tras 72 horas de almacenamiento a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ (Fan, 2013), coincidiendo con la disipación de distintos componentes radiolíticos en diversos alimentos transcurrido cierto tiempo después del tratamiento (Seisa y col., 2004).

El análisis de soluciones acuosas de glucosa, fructosa o sacarosa irradiadas a 5 kGy reveló la formación de furanos en cantidades similares a las encontradas tras la esterilización en autoclave durante 25 min. En ambos casos, la formación de estas sustancias aumenta con la concentración de azúcares y valores bajos de pH (EFSA, 2011). Los furanos están incluidos en la categoría de «posibles carcinógenos para los humanos» por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer, por tanto la posibilidad de que un tratamiento pueda potenciar su formación es especialmente preocupante. Sin embargo, no se han detectado en ningún alimento irradiado, e incluso algunos autores (Fan, 2013) indican que su presencia en soluciones acuosas desaparece con este tratamiento, aun con dosis bajas.

La irradiación induce la degradación de polisacáridos como la celulosa, el almidón y la pectina, posiblemente por la ruptura del enlace glucosídico. Si bien el grado de despolimerización es reducido, los tratamientos a dosis bajas pueden producir una disminución de la viscosidad de soluciones de almidón o el ablandamiento de las frutas (Grandison, 2006).

Micronutrientes

El contenido en minerales no se ve afectado de forma significativa por la irradiación de los alimentos. Sin embargo, algunas vitaminas son sensibles a este tratamiento, siendo sus pérdidas dependientes de la dosis, de la naturaleza de cada vitamina y de la matriz que la contiene. Como ocurre con otros componentes, la sensibilidad de las vitaminas también depende de las condiciones en las que se aplique el tratamiento. Así, en un estudio realizado en carne de cerdo, se comprobó que la congelación reducía notablemente las pérdidas de tiamina; el tratamiento con 3,34 kGy a temperaturas de 20, 0 y -20 °C provocó reducciones del 47, 35 y 15%, respectivamente (Fox y col., 1989). En cualquier caso, los efectos producidos en las vitaminas por este tratamiento son equiparables a las que se dan en otros procesos, como la pasteurización o la esterilización (EFSA, 2011).

Las vitaminas hidrosolubles, atendiendo a su radiolabilidad, pueden ordenarse en la siguiente secuencia: tiamina > ácido ascórbico > piridoxina > riboflavina > ácido fólico > cobalamina > niacina (OMS, 1995). A pesar de la sensibilidad del ácido ascórbico, la radiación de muchas frutas y verduras ricas en esta vitamina no implica una pérdida de su valor nutritivo. Tras la irradiación, el ácido ascórbico se convierte en ácido dehidroascórbico que, si bien carece de propiedades antioxidantes, conserva aún actividad vitamínica (Fan, 2013).

Las vitaminas liposolubles presentan igualmente sensibilidades muy variables a las radiaciones ionizantes. Estas vitaminas presentan, en orden decreciente, la siguiente radiosensibilidad: vitamina E > β -caroteno > vitamina A > vitamina K > vitamina D (OMS, 1995). Además de los factores mencionados anteriormente, la presencia de oxígeno en la atmósfera durante la irradiación también acentúa las pérdidas de estas vitaminas, como se ha observado en el caso de la vitamina E de copos de avena y de la vitamina A en huevo deshidratado (OMS, 1995). Por otra parte, en distintos estudios sobre la vitamina E en carnes irradiadas, la cantidad de agua no tuvo influencia en su disminución, lo que sugiere que los radicales libres procedentes de la radiolisis del agua no participan en su degradación (Fan, 2013).

1.4.3.2. Toxicología de los productos radiolíticos

En 1981, el Comité Mixto FAO/OMS/OIEA concluyó que los alimentos irradiados en las condiciones permitidas no representaban un riesgo toxicológico (OMS, 1981). Desde entonces, distintos organismos internacionales han llevado a cabo numerosas revisiones sobre la inocuidad de estos productos. Sirvan como ejemplo las realizadas por el Grupo Mixto FAO/OMS/OIEA sobre la Irradiación a Dosis Altas (OMS, 1999), el Comité Científico de la Alimentación Humana de la Comisión Europea (CE 1986, 1994, 1998 y 2003a), la EFSA (2011) y la FDA (2012). A modo de conclusión puede decirse que si el tratamiento va acompañado de buenas prácticas de fabricación, la irradiación de alimentos a dosis inferiores o iguales a 10 kGy no presenta peligro alguno para la salud humana de tipo toxicológico o microbiológico más allá de los

derivados de las tecnologías convencionales que se aplican cotidianamente. Por tanto, la salubridad de los alimentos irradiados está ampliamente avalada.

La identificación y caracterización de los productos radiolíticos formados y su posible papel como marcadores de irradiación han sido los aspectos que más interés han suscitado. El desarrollo de técnicas analíticas, cada vez más sensibles, ha permitido la detección de compuestos químicos generados por la radiación a concentraciones muy inferiores a las que, según los correspondientes estudios toxicológicos, han mostrado tener algún efecto nocivo (Roberts, 2014).

Hasta la fecha, las **2-ACB** presentes en los productos irradiados son los únicos compuestos que no se han encontrado en alimentos sin tratar. De hecho, se han detectado en muchos alimentos irradiados, como puede deducirse del artículo de Sommers y col. (2013), quienes ofrecen una lista muy completa: carne (bovina, porcina, ovina), aves (pollo, carne recuperada mecánicamente), huevo entero líquido, quesos (Camembert, Brie y queso de leche de oveja), mariscos (gambas), pescado (sardina, trucha, salmón), fruta (mango, papaya, aguacate), frutos secos (cacahuetes), semillas (perilla o *shiso*), cereales (arroz) y otros productos sometidos a dosis muy bajas (0,05-0,1 kGy) como cebolla, ajo, arroz o alubias carillas. Desde 1990 se han realizado multitud de estudios para averiguar el potencial toxicológico de las 2-ACB (EFSA, 2011; Sommers y col., 2013; Song y col., 2014). Sin embargo, no está claro que la genotoxicidad *in vitro* que presentan algunas 2-ACB suponga un riesgo para la salud, debido a la falta de estudios *in vivo* adecuados (EFSA, 2011). En este mismo informe se indica, además, que dicho peligro, en caso de confirmarse, sería mínimo.

Otras especies químicas que han generado cierta controversia son los **radicales libres** inducidos por la radiación. Sin embargo, en un sistema que contiene agua en abundancia, como un alimento o la saliva durante la ingestión, los radicales libres presentan una vida muy corta al combinarse entre sí o con otros compuestos del alimento (Ehlermann, 2014).

Aparte de las sustancias anteriores, la irradiación de alimentos puede inducir la formación de otras, como hidrocarburos, furanos, óxidos de colesterol y aldehídos. Estos compuestos no son exclusivos de los alimentos irradiados ya que se forman también al someter a los alimentos a otras tecnologías utilizadas en su procesado y, además, no son cuantitativamente mayores que las que se forman en los tratamientos térmicos (EFSA, 2011).

1.4.3.3. Calidad sensorial de los productos lácteos irradiados

Cualquier proceso aplicado en la industria alimentaria ha de cumplir no sólo con el objetivo de conservación y/o transformación para el que fue concebido, sino que el producto resultante ha de ser seguro y con las características sensoriales que le son propias. En el caso de los alimentos irradiados, esta condición está recogida en la norma del *Codex Alimentarius* (2003): *«Para la irradiación de cualquier alimento, la dosis mínima absorbida deberá ser la suficiente para lograr la finalidad tecnológica, y la dosis máxima absorbida deberá ser inferior a la dosis que comprometería la seguridad del consumidor o la salubridad o que menoscabaría la integridad estructural, las propiedades funcionales o los atributos sensoriales».*

Como se ha mencionado, entre los componentes de los alimentos más afectados por la irradiación se encuentran los aminoácidos azufrados, que dan lugar al característico «olor a irradiación» (Fan, 2013). Otros olores anómalos se han asociado al acúmulo de aldehídos y cetonas procedentes de la fracción lipídica; estos se han descrito con diversos adjetivos, como «a perro mojado», «a pluma escaldada», «a medio de cultivo caliente» y «metálico» (Cabeza y col., 2007; Ordóñez y col., 2019b).

Los productos lácteos irradiados son, probablemente, los alimentos más susceptibles de presentar cambios sensoriales (Diehl, 1982). Se ha descrito que en leche líquida, ya sea entera o desnatada, tratada a dosis elevadas (45 kGy) se produce, al igual que en los procesos térmicos intensos, pardeamiento no enzimático y un sabor caramelizado (Urbain, 1986). No obstante, dosis de este nivel no están

permitidas y cabe apuntar, a título de curiosidad, que el fenómeno se puede evitar irradiando a $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Urbain, 1986). En cualquier caso, la irradiación de la leche no puede competir con las distintas modalidades de tratamientos térmicos y no se vislumbra que los pueda desplazar, ya que los procesos térmicos que se aplican para la higienización y esterilización de la leche están plenamente establecidos, se obtienen productos de buena calidad sensorial y son aceptados por los consumidores.

En el yogur natural, Ham y col. (2009) comprobaron que su calidad sensorial se mantenía prácticamente sin modificación alguna tras ser irradiado con dosis de hasta 10 kGy; únicamente se devaluó la apariencia de este producto tratado con al menos 3 kGy después de 1 semana de almacenamiento a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura muy alejada de la que habitualmente se emplea en refrigeración ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Por su parte, Hashisaka y col. (1990a) han descrito la aparición de olores cuestionables en helados de vainilla tras un tratamiento de 40 kGy a una temperatura de $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que no ocurrió en un helado de sabor más acusado, como el de menta.

Los fenómenos microbiológicos y bioquímicos que acaecen durante la maduración de los quesos inducen la generación de sustancias aromáticas y sápidas cuya concentración es mayor a medida que se alarga el tiempo de maduración. Teniendo en cuenta los escasos efectos negativos de la aplicación de dosis bajas de irradiación en algunos productos lácteos (como el yogur o los helados), cabría pensar que el elevado potencial aromático y sávido de los quesos podría enmascarar en gran medida la aparición de olores y sabores anómalos de utilizarse esta tecnología para su conservación. No obstante, existen discrepancias sobre el efecto de las radiaciones ionizantes en los atributos sensoriales de algunos quesos. Por ejemplo, Bongirwar y Kumta (1967) detectaron olores anómalos en muestras de queso Cheddar tratadas con 0,5 Mrad (5 kGy), pero no a dosis inferiores, del orden de 0,2 Mrad (2 kGy). Kim y col. (2007) establecieron en 3 kGy el punto de inflexión para la depreciación de la calidad de dicho queso, mientras que Seisa y col. (2004) no encontraron diferencias entre las muestras control y las irradiadas a 4 kGy. El olor y el color del queso Kashar

(un queso turco similar al Cheddar) empeoraron con un tratamiento de 1,5 kGy, aunque en las muestras irradiadas con 1,2 kGy el efecto no fue apreciable (Yüceer y Gündüz, 1980). Esta falta de consenso también se ha observado en otros tipos de queso, como el Camembert. Según Jones y Jelen (1988), la aparición de olores rancios y «a quemado» se produjo a dosis muy bajas (0,3 kGy), mientras que otros autores han indicado que la aplicación de tratamientos entre 2 y 3 kGy no afecta a sus características sensoriales (Langley, 1988; Chincholle, 1991; Bougle y Stahl, 1994). En otro queso de pasta blanda madurado superficialmente por bacterias no se observó un efecto significativo en el sabor y aceptación general tras la irradiación con 3 kGy (Ennahar y col., 1994). Los estudios realizados en otros quesos, como el Gouda (Rosenthal y col., 1983) o Mozzarella (Huo y col., 2013), revelaron que la aplicación de 3,3 y 2 kGy, respectivamente, no producía olores y sabores anómalos. En queso Feta, los efectos negativos en el perfil aromático provocados por un tratamiento a 4,7 kGy se disiparon después de 30 días de almacenamiento en refrigeración (Konteles y col., 2009). A modo de conclusión puede decirse que las radiaciones ionizantes a dosis bajas (inferiores a 3-4 kGy) no producen, al parecer, cambios sensoriales detectables en el queso. No obstante, resulta necesario estudiar, en cada variedad y condiciones de tratamiento y conservación, las posibles consecuencias para la optimización del tratamiento.

1.4.4. MARCO LEGAL Y SITUACIÓN ACTUAL DE LA IRRADIACIÓN DE ALIMENTOS

Con anterioridad a 1999, las autorizaciones para irradiar alimentos en Europa dependían de cada país, lo que dificultaba el funcionamiento del mercado interior en la UE. Para solventar esta situación, la Directiva 1999/3/CE decidió partir de una única lista común a todos los estados miembros, en la que solo se autorizaban para su tratamiento con radiaciones ionizantes las «hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales». En cualquier caso, la lista no era cerrada sino un punto de partida, ya que la norma prevé un procedimiento de solicitud para la inclusión progresiva de nuevos productos. En 2001 la Comisión publicó un comunicado en el

que, tras la consulta abierta a organizaciones de consumidores e industrias, se adoptaron los siguientes criterios para evaluar la posible inclusión de nuevos alimentos:

- tener el dictamen favorable del Comité Científico de la Alimentación Humana;
- existir un beneficio para el consumidor, entendiendo como tal la reducción del peligro para la salud o la prolongación de la vida útil del producto;
- estar justificada y ser necesaria desde el punto de vista tecnológico, tomando como indicador la irradiación de cantidades importantes del alimento en, al menos, un estado miembro;
- no usar para sustituir, bajo ningún concepto, las buenas prácticas de higiene, quedando restringidas las autorizaciones a aquellos productos que, sin tratar, representen un peligro inaceptable para la salud de los consumidores sin que existan métodos de descontaminación adecuados.

Finalmente, la Comisión no presentó ninguna propuesta de ampliación de la lista positiva, alegando que era necesario un debate más amplio. No obstante, algunos estados miembros de la UE (Bélgica, República Checa, Francia, Italia, Holanda, Polonia) y el Reino Unido han autorizado irradiar alimentos o ingredientes alimentarios en sus respectivos países que van más allá de los comprendidos en la lista aprobada por la mencionada directiva (tabla 1.11).

Una situación muy diferente es la que encontramos en EE. UU., cuya reglamentación contempla la irradiación de alimentos como un aditivo alimentario. En la norma 21CFR179.26 se recogen las fuentes de radiación permitidas, los productos susceptibles de ser tratados con radiaciones ionizantes y la limitación de la dosis absorbida. La FDA es el organismo responsable de la aprobación del empleo de las radiaciones ionizantes para cada fin. Entre los alimentos autorizados para este tratamiento se encuentran distintos tipos de carne y productos cárnicos, crustáceos y moluscos, vegetales (especies, condimentos, lechugas y espinacas, brotes y semillas), enzimas y huevos íntegros (LII, 2020).

Tabla 1.11. Lista de alimentos o ingredientes cuya irradiación está autorizada en algunos países de la UE ^a y en Reino Unido (UK) a la dosis máxima absorbida que se indica (kGy).

Producto	BE	CZ ^e	FR	IT	NL	PL ^e	UK
Hierbas aromáticas congeladas	10 ^d	10	10				
Patata	0,15	0,2		0,15		0,1	0,2
Ñame		0,2					0,2
Cebolla	0,15	0,2	0,075	0,15		0,06	0,2
Ajo	0,15	0,2	0,075	0,15		0,15	0,2
Chalote	0,15	0,2	0,075				0,2
Hortalizas y legumbres	1 ^c	1					1
Legumbres		1			1		
Frutas ^f	2 ^d	2					2
Fresas ^c	2	2					
Hortalizas secas y frutos secos	1 ^d	1	1		1		
Cereales	1 ^d	1					1
Frutas pasas ^e		1					
Copos y gérmenes de cereales para productos lácteos	10 ^d	10	10				
Copos de cereales		1			1		
Harina de arroz	4 ^d	4	4				
Goma arábica	3 ^c	3	3		3		
Carne de pollo		7			7		
Aves de corral, incluidos los menudillos	5 ^d	5	5				
Volatería ^g	7 ^d	7					7
Carne de aves de corral recuperada mecánicamente	5 ^b	5	5				
Ancas de rana congeladas	5	5	5		5		
Sangre y derivados ^h	10 ^d	10	10				
Pescados y mariscos ⁱ	3 ^d	3					3
Gambas congeladas ^j	5	5	5				
Gambas					3		
Clara de huevo	3 ^b	3	3		3		
Caseína y caseinatos	6 ^d	6	6				

^a Países UE: BE (Bélgica), CZ (Rep. Checa), FR (Francia), IT (Italia), NL (Holanda), PL (Polonia).

^{b, c, d, e} Autorización incorporada en 2002, 2003, 2006 y 2009, respectivamente.

^f Incluidos los hongos, el tomate y el ruibarbo.

^g Aves domésticas, gansos, patos, pintadas, palomas, codornices y pavos.

^h Plasma y coagulados deshidratados.

ⁱ Incluidos anguilas, crustáceos y moluscos.

^j Peladas o decapitadas.

Fuente: CE, 2002; 2003b; 2006 y 2009.

La directiva marco de la UE (1999/2/CE), además de las disposiciones para la irradiación de los productos, su comercialización e importación, establece la obligación de efectuar controles oficiales de los alimentos comercializados. Según el último informe elaborado por la Comisión a partir de los datos aportados por algunos países (CE, 2019b), de las más de 11 000 muestras analizadas en el periodo 2016-2017, el 0,8% resultó no conforme debido a un etiquetado incorrecto o a una irradiación no autorizada.

Los métodos analíticos estandarizados por el Comité Europeo de Normalización (CEN) para el control oficial son los siguientes (CE, 2020):

- UNE-EN 13708:2002. Análisis mediante resonancia de espín electrónico para alimentos que contengan azúcar cristalizado.
- UNE-EN 13751:2009. Detección de alimentos irradiados mediante luminiscencia fotoestimulada para detectar partículas minerales (p. ej. silicatos).
- UNE-EN 13783:2002. Detección de alimentos irradiados mediante epifluorescencia tras el filtrado y recuento en placa de la microbiota aeróbica (DEFT/APC). Método de cribado.
- UNE-EN 13784:2002. Ensayo cometa de ADN para la detección de alimentos irradiados. Método de cribado.
- UNE-EN 14569:2005. Cribado microbiológico para alimentos irradiados utilizando procedimientos LAL/GNB.
- UNE-EN 1784:2004. Detección de alimentos irradiados que contengan grasa. Análisis de hidrocarburos por cromatografía de gases.
- UNE-EN 1785:2004. Detección de alimentos irradiados que contengan grasa. Análisis de las 2-alkilciclobutanonas por cromatografía de gases-espectrometría de masas.
- UNE-EN 1786:1997. Detección de alimentos irradiados que contengan hueso. Método espectroscópico de resonancia electrónica (ESR).

- UNE-EN 1787:2001. Detección de alimentos irradiados que contengan celulosa mediante espectroscopía de resonancia electrónica (ESR).
- UNE-EN 1788:2002. Detección de alimentos irradiados de los que se pueden extraer silicatos minerales mediante termoluminiscencia (TL).

Además de estos análisis, los estados miembros de la UE son los responsables de controlar las instalaciones de irradiación, indicando la cantidad de producto tratado y la dosis aplicada. En 2017 se irradiaron en la UE un total de 5237 Tm de alimentos, destacando las ancas de rana congeladas (57%), las hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales (21%) y las aves de corral (16%) (CE, 2019b). En comparación con el resto del mundo, la irradiación de alimentos en Europa es una tecnología poco utilizada. Por ejemplo, en el año 2010, mientras que en la UE se irradiaron 9264 Tm de alimentos, en China y EE. UU. se trataron 68 000 y 103 000 Tm, respectivamente (Kume y Todoroki, 2013).

2.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La innovación requiere tres cosas: tener una buena idea, darse cuenta de que lo es, y convencer de ello a los demás... y casi nunca es una misma persona la que logra las tres.

Jorge Wagensberg (1948-2018)

El control microbiológico de los procesos de la industria alimentaria persigue varios objetivos: uno económico, al pretender reducir la pérdida de alimentos ocasionada por la microbiota alterante; otro de tipo sanitario, imperativo, destinado a garantizar la inocuidad de los alimentos que llegan a los consumidores, y un tercero, específico de los alimentos fermentados, encaminado a regular la microbiota tecnológica durante los procesos madurativos de los mismos para que el producto resultante presente las características sensoriales que le son propias. El alimento considerado en esta tesis es el queso, y su fabricación, ya sea en instalaciones industriales o en queserías artesanales, no es una excepción a esta regla. Las investigaciones que se describen en esta memoria constituyen un intento de lograr los dos primeros objetivos mencionados mediante la aplicación de radiaciones ionizantes manteniendo, a su vez, unas propiedades sensoriales adecuadas.

El hinchamiento tardío de los quesos, conocido en la bibliografía como LBD (del inglés *late blowing defect*), es una de las alteraciones microbianas que más pérdidas económicas produce en las variedades duras y semiduras. El principal agente de esta alteración es *Clostridium tyrobutyricum* (Klijn y col., 1995), que forma parte del grupo de las bacterias ácido butíricas (BAB) junto con *C. butyricum*, *C. sporogenes* y *C. beijerinckii* (Brändle y col., 2016). Las BAB utilizan el ácido láctico producido por las bacterias lácticas (BAL) rindiendo los ácidos acético y butírico, dióxido de carbono e hidrógeno. Los gases quedan atrapados en la masa elástica e impermeable resultante de la cuajada enzimática que intencionadamente se induce durante el proceso de fabricación de estos quesos. Como resultado, se observa un abombamiento de las piezas e incluso la formación de grietas si el crecimiento de las BAB es excesivo. Los quesos que presentan esta alteración se deprecian comercialmente y pueden ser rechazados por el consumidor, no sólo por su cuestionable apariencia externa sino también por los olores y sabores anómalos que se desarrollan por la acumulación de los ácidos formados.

El origen de dicha alteración es la contaminación de la leche con las esporas de los clostridios. Por tanto, el objetivo de las diferentes medidas de control es prevenir la presencia de esporas y/o su germinación en la leche y/o evitar el crecimiento de las células vegetativas en el interior del queso. Si estas medidas resultan insuficientes, los signos de la alteración aparecen tras varias semanas de maduración. La estrategia más habitual que utiliza la industria quesera es la adición a la leche de sustancias inhibidoras de las BAB, destacando la lisozima (E 1105) y los nitratos (E 251, E 252) (Garde y col., 2017). Sin embargo, ambos aditivos llevan algunos riesgos sanitarios asociados. La lisozima —procedente del huevo— puede dar lugar a reacciones alérgicas en los individuos sensibles (EFSA-NDA, 2014) y los nitratos están relacionados con la formación de nitrosaminas tras su reducción a otras especies nitrogenadas (nitrito y óxido nítrico). Aunque los nitratos están autorizados en la legislación alimentaria de la UE, en algunos países no está permitido su uso en la elaboración de queso (Brändle y col., 2016).

En cuanto a los riesgos microbianos, *Listeria monocytogenes* es uno de los patógenos que más preocupa y su asociación al consumo de lácteos es el tema que más literatura científica ha generado. Son diversos los factores que explican dicho interés, pero su carácter psicrotrofo, la posibilidad de multiplicarse a valores de a_w más bajas que otros patógenos y, sobre todo, la elevada mortalidad asociada a los brotes de listeriosis (EFSA, 2019), justifican sobradamente la alarma por la presencia de esta bacteria en los alimentos. La importancia de la incidencia de *L. monocytogenes* en el queso resulta incuestionable si se analizan los datos epidemiológicos de los últimos años (Martínez-Ríos y Dalgaard, 2018; EFSA, 2019; CDC, 2020) y los decomisos de las partidas registradas en las redes de alerta sanitaria de la UE (RASFF, 2020) y EE. UU. (FDA, 2020). Esta asociación resulta aún más preocupante en los quesos de pasta blanda, ya que se estima que en torno al 80% de los brotes de listeriosis en quesos se debe al consumo de estas variedades, en especial de aquellas maduradas superficialmente por mohos (Camembert, Brie y

similares) (véase 1.3.2). Estos tipos de queso reúnen las condiciones idóneas para el crecimiento de *L. monocytogenes* al presentar valores relativamente elevados de pH y de humedad.

Si bien este microorganismo no sobrevive a la pasteurización que habitualmente se aplica a la leche para la fabricación de queso, no se puede garantizar un queso libre de listerias debido a una eventual contaminación postratamiento (Gould y col., 2014; FDA, 2017). Uno de los factores determinantes de tal contaminación es la capacidad de *L. monocytogenes* para formar biofilms en zonas de equipos e instalaciones de difícil acceso para la limpieza, donde puede sobrevivir durante largos periodos (Carpentier y Cerf, 2011). Por ello, las operaciones de reducción de tamaño del queso, necesarias para su envasado en porciones individuales/domésticas, multiplican el riesgo de contaminación con las listerias presentes en el equipamiento (loncheadoras, picadoras, cortadoras, cintas transportadoras, etc.). Recientemente, el panel de riesgos biológicos de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha informado que el corte o loncheado de quesos blandos y semiblandos contribuye en gran medida al incremento del número de casos de listeriosis como consecuencia de una mayor prevalencia (EFSA-BIOHAZ, 2018). Aunque la contaminación con *L. monocytogenes* es crítica en los quesos de pasta blanda, no debe desestimarse el riesgo asociado a otras variedades debido a contaminaciones cruzadas, sobre todo cuando el queso es uno de los ingredientes de preparados RTE, como ensaladas, platos combinados, bocadillos, etc. (Buchanan y col., 2017). En este escenario, el *Codex Alimentarius* sugiere la aplicación de un tratamiento listericida al producto ya envasado (CAC, 2007) pero, debido a las características típicas del queso, no se pueden utilizar tratamientos convencionales, especialmente el térmico, y es necesario recurrir a otros métodos.

La aplicación de radiaciones ionizantes supone una alternativa eficaz para la eliminación de microorganismos patógenos no esporulados hasta niveles seguros y reducir la carga de alterantes (se amplía la vida útil) de los alimentos. En este

sentido, los supervisores de esta tesis vienen realizando desde 2007 (Cabeza y col., 2007; Ordóñez y col., 2007) numerosos estudios encaminados a la optimización del tratamiento con electrones acelerados para la higienización y/o el aumento de la vida útil de carne de pollo (Ordóñez y col., 2007; Cárcel y col., 2015), lomo de cerdo fresco (García-Márquez y col., 2012a) y adobado (García-Márquez y col., 2012b), hamburguesas (Cárcel y col., 2015), jamón cocido (Cabeza y col., 2007; Cabeza y col., 2010; Benedito y col., 2011), jamón curado (Hoz y col., 2008; Cambero y col., 2012; Escudero y col., 2012), cecina (Cambero y col., 2012), embutidos madurados (Cabeza y col., 2009), salmón (Herrero y col., 2009; Medina y col., 2009; Montiel y col., 2013) y atún (Cambero y col., 2012) ahumados y ensaladilla rusa (Cambero y col., 2011).

El tratamiento de productos lácteos con radiaciones ionizantes ha tenido una implantación más tardía que en otros alimentos. Realmente, son pocos los derivados lácteos autorizados para ser irradiados. A modo de ejemplo pueden mencionarse las caseínas y caseinatos, permitidos en la República Checa, Bélgica y Francia a dosis de hasta 6 kGy. En este último país, en 1993 también se autorizó el tratamiento con radiaciones ionizantes del queso Camembert elaborado con leche cruda con dosis de hasta 3,5 kGy. En respuesta al mandato establecido en la Directiva Marco 1999/2/CE, el Comité Científico de la Alimentación Humana emitió un dictamen favorable sobre el tratamiento con radiaciones ionizantes del queso Camembert elaborado con leche cruda (CE, 2001). Sin embargo, la Comisión Europea desestimó su inclusión en la lista de alimentos autorizados, ya que no existía suficiente justificación tecnológica basándose en el escaso volumen de producción de queso Camembert de leche cruda irradiado. Un año después, Francia derogó las disposiciones en las que se autorizaba la irradiación de ciertos alimentos, incluyendo el queso Camembert elaborado con leche cruda. En cualquier caso, las listas de productos que se pueden irradiar en la UE (Directiva 1999/3/CE) o en los diferentes

estados miembros están abiertas a nuevas autorizaciones de acuerdo con la legislación específica sobre el tema en los distintos países.

Cualquier estrategia que trate de evitar la alteración LBD sin que se produzcan efectos secundarios cuestionables y, del mismo modo, cualquier procedimiento que permita la reducción de la carga de *L. monocytogenes* hasta niveles seguros siempre serán avances tecnológicos que, respectivamente, beneficiarían a la industria quesera y salvaguardarían la salud del consumidor. Este es el propósito global de la presente tesis, referido a la aplicación de radiaciones ionizantes en la modalidad de electrones acelerados. Para la consecución de este objetivo se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Explorar si el tratamiento con electrones acelerados es una tecnología útil para el control del LBD en quesos susceptibles de presentar este defecto y, en su caso, establecer la dosis necesaria de radiación.
- Determinar la dosis necesaria de radiación para la consecución del Objetivo de Seguridad Alimentaria respecto a *L. monocytogenes* en quesos de pasta blanda.
- Estudiar el efecto de la aplicación de electrones acelerados a las dosis establecidas en los objetivos anteriores en la microbiota láctica y características fisicoquímicas (pH, a_w) de diferentes variedades de queso.
- Analizar los cambios acaecidos en la textura, color y propiedades sensoriales de diferentes variedades de quesos tras la aplicación de electrones acelerados y, en definitiva, determinar su aceptación por el consumidor.

3.

METODOLOGÍA

Imaginada la hipótesis, menester es someterla a la sanción de la experiencia, para lo cual escogemos experimentos u observaciones precisas, completas y concluyentes.

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)

3.1. MATERIAL GENERAL

3.1.1. MATERIAL Y EQUIPOS DE LABORATORIO

El instrumental de vidrio, de tipo «Pirex», las cápsulas de porcelana y el material de plástico fueron provistos por Vidrio Industrial Pobel, S.A. (España), Deltalab S.L. (España), Sarstedt (Alemania) y Thermo Scientific (EE. UU.), salvo el material estéril de plástico —placas de Petri y bolsas de *stomacher*— que fue suministrado por las firmas Nunc (EE. UU.) y Nirco (España), respectivamente. Las pipetas automáticas Pipetman® P200 (20-200 µl), P1000 (200-1000 µl) y P5000 (1-5 ml) suministradas por Gilson S.A.S (Francia) se emplearon para tomar volúmenes pequeños.

La conservación de microorganismos se realizó en arcones de congelación Liebherr (Suiza). Las muestras y reactivos que requerían refrigeración se almacenaron en frigoríficos Fagor (España) o Electrolux (Suecia).

Los equipos de laboratorio empleados en la parte experimental se recogen en la tabla 3.1.

3.1.2. REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Los reactivos empleados para las determinaciones fisicoquímicas fueron de calidad analítica de las firmas Panreac (España) y Merck (Alemania). Los medios de cultivo utilizados para el desarrollo de este trabajo (tabla 3.2) fueron suministrados por Difco (EE. UU.), Laboratorios Conda-Pronadisa (España) y Oxoid (Reino Unido). El agua destilada utilizada para la hidratación de medios de cultivos y preparación de disoluciones acuosas se obtuvo en un purificador por ósmosis inversa que proporciona agua destilada de una resistividad del orden de 15 MΩ·cm.

El recuento de las listerias supervivientes se realizó en Agar Palcam selectivo (Oxoid) adicionado de suplemento antibiótico (polimixina B, hidrocloreuro de acriflavina y ceftazidima) y emulsión de yema de huevo para la recuperación de las células dañadas, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tabla 3.1. Relación de equipos de laboratorio.

Equipo	Modelo	Fabricante
<i>Preparación de muestras, reactivos e inóculos (véanse apartados 3.1 y 3.2)</i>		
Agitadores con calefacción	MC-8	Bunsen, S.A. (España)
Autoclaves	Autester G y 43-G	J.P. Selecta, S.A. (España)
Balanzas monoplato	440-33	Kern & Sohn (Alemania)
Centrífuga	Sorvall RC-5B (rotores GSA, GS3)	Du Pont (EE. UU.)
Envasadora a vacío	Euvac	Vapta, S.L. (España)
Loncheadora	ES 300-DOM	Beckers Italy (Italia)
Purificador de agua por ósmosis inversa	Elix 3	EMD Millipore (EE. UU.)
<i>Análisis microbiológicos (véase apartado 3.4)</i>		
Baños termostáticos	BA-12	Bunsen, S.A. (España)
Contador de colonias	Digital S	J.P. Selecta, S.A. (España)
Estufas de incubación	B-6200	Heraeus (Alemania)
<i>Stomacher</i>	Basic	IUL Instruments (España)
<i>Análisis físicoquímicos (véase apartado 3.5)</i>		
Estufa de secado	KFTU-K	Heraeus (Alemania)
Horno mufla	MR 170	Heraeus (Alemania)
Balanza analítica	2443	Sartorius (Alemania)
Homogeneizador	Polytron PT 10-35 GT	Kinematica (Suiza)
Centrífuga	Digicen 20 (rotor RT 192)	Ortoarlesa (España)
Rotavapor	R-490	Büchi (Suiza)
Baño	B-200	
Bomba de vacío	A-3S	Eyela (EE. UU.)
Digestor Kjeldahl	K-435	Büchi (Suiza)
Lavador de gases (<i>scrubber</i>)	K-415	
Destilador Kjeldahl	B-324	
Higrómetro	CX-1	Decagon Devices Inc. (EE. UU.)
pH-metro	Digit-501	Crison Instruments, S.A. (España)
<i>Análisis instrumental de propiedades sensoriales (véase apartado 3.6)</i>		
Colorímetro triestímulo	CR-400	Minolta Co. (Japón)
Texturómetro	TA-XT 2i	Stable Micro Systems Ltd. (Reino Unido)

El medio RCM (*Reinforced Clostridial Medium*) comercial (Oxoid) contiene 0,5 g/l de agar, por lo que fue necesario modificar dicha concentración para usarlo como medio líquido o sólido, según el objetivo. Así, se eliminó el agar mediante decantación y filtración antes de la esterilización del medio para la recogida de esporas de *Clostridium tyrobutyricum* por centrifugación y se añadió Agar Bacteriológico Nº 1 (Oxoid) hasta alcanzar una concentración final de 15 g/l cuando se pretendía hacer un recuento de clostridios.

Tabla 3.2. Medios de cultivo empleados.

Medio de Cultivo	Uso	Fabricante
Caldo tripticaseína soja (<i>Tryptic Soy Broth</i> , TSB)	Revitalización y cultivo de cepas de <i>Listeria</i> spp.	Difco (EE.UU.)
Agar tripticaseína soja (<i>Tryptic Soy Agar</i> , TSA)	Control de <i>Listeria</i> spp. en los cultivos	Laboratorios Conda-Pronadisa (España)
Agar Palcam con antibióticos y emulsión yema de huevo	Recuento de listerias en queso	Oxoid (Reino Unido)
Medio reforzado para clostridios (<i>Reinforced Clostridial Medium</i> , RCM)	<ul style="list-style-type: none"> • Caldo RCM (modificado): cultivo y obtención de esporas de <i>C. tyrobutyricum</i>. • Agar RCM (modificado): recuento de <i>C. tyrobutyricum</i> 	Oxoid (Reino Unido)
Agar de recuento en placa (<i>Plate Count Agar</i> , PCA)	Recuento de microorganismos viables totales	Difco (EE.UU.)
Agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) acidificado (pH 5,5)	Recuento de lactobacilos	Laboratorios Conda-Pronadisa (España)

El diluyente empleado en la preparación de los inóculos, la homogeneización de las muestras y en las diluciones seriadas para los recuentos microbiológicos fue suero fisiológico (NaCl al 0,85%).

La esterilización de los medios de cultivo, de las disoluciones y del material general de laboratorio se llevó a cabo en autoclave a 121 °C durante 16 min.

3.1.3. MICROORGANISMOS

Los estudios de inactivación microbiana de las especies objeto de esta tesis doctoral –*Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* y *C. tyrobutyricum*– se llevaron a cabo con cepas de colección (tabla 3.3).

L. innocua presenta unos parámetros de crecimiento y supervivencia durante la maduración de queso similares a los de *L. monocytogenes* (Liu y col., 2009). Del mismo modo, exhibe mayor resistencia frente a diferentes tratamientos tecnológicos, como los térmicos (Fairchild y Foegeding, 1993) y las radiaciones ionizantes (Cabeza y col., 2007). Por ello, *L. innocua* se utilizó como sustituta de *L. monocytogenes* en algunas experiencias para evitar la manipulación de la especie patógena.

Tabla 3.3. Microorganismos empleados en los estudios de inactivación bacteriana.

Microorganismo	Cepa	Correspondencia con otras colecciones
<i>Listeria innocua</i> (ex Seeliger y Schoofs 1979) Seeliger 1983	CECT 910 ^T	NCTC 11288, ATCC 33090
<i>Listeria monocytogenes</i> (Murray y col. 1926) Pirie, 1940	Scott A	ATTCC 49594, CIP 103575
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> van Beynum y Pette 1935	CECT 4011 ^T	ATCC 25755 CIP 105092

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo; ATCC: *American Type Culture Collection*; NCTC: *National Collection of Type Cultures*; CIP: *Collection de l'Institute Pasteur*.

C. tyrobutyricum CECT 4011^T y *L. innocua* CECT 910^T fueron suministradas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). En el caso de *L. monocytogenes*, se empleó la cepa Scott A por pertenecer al serotipo 4b, responsable de la mayoría de casos de listeriosis invasiva y por ser una de las cepas de referencia para estudios en productos lácteos (72% de los registros incluidos en la base de datos de crecimiento bacteriano COMBASE relativos a *L. monocytogenes* en leche y queso).

3.1.3.1. Preparación de inóculos de *Listeria* spp.

La revitalización de *Listeria* spp. se llevó a cabo resuspendiendo los cultivos liofilizados en TSB y se comprobó la ausencia de contaminación de las suspensiones obtenidas mediante su siembra en TSA con un asa de platino. Las placas y tubos se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento (32 °C) y, transcurridas 24 horas, los cultivos se dispensaron en viales estériles de 2 ml adicionados de un 10% de glicerol como agente crioprotector. Dicho *stock* se mantuvo en congelación (-40 °C) hasta su posterior uso.

Los estudios de radiorresistencia de las listerias se realizaron en muestras de queso contaminadas con cultivos recientes. Para ello, se regeneraron las cepas congeladas inoculando una pequeña porción del cultivo congelado en tubos con TSB. Tras la incubación a 32 °C durante 24 horas se repitió la operación y el cultivo resultante se centrifugó bajo refrigeración (4 °C) a 3000g durante 30 minutos. El sedimento se resuspendió en 50 ml de suero fisiológico estéril, consiguiéndose así una suspensión con una concentración bacteriana del orden de 10⁸ células/ml (Cabeza y col., 2007).

3.1.3.2. Preparación de suspensión de esporas de *C. tyrobutyricum*

Partiendo de un cultivo en placa, se seleccionaron colonias aisladas de *C. tyrobutyricum* y se inocularon en tubos con caldo RCM, que se introdujeron en jarras de anaerobiosis junto con una bolsita (Anaerogen, Oxoid) que contenía ácido ascórbico y carbón activado para absorber el oxígeno de la jarra y enriquecer la atmósfera en dióxido de carbono. Siguiendo este protocolo, se consigue un porcentaje de esporulación del orden del 75% (Garde, comunicación personal). La incubación se realizó a 37 °C durante 72 horas. La suspensión de esporas se distribuyó en viales de 2 ml estériles y se añadió un 5% de glicerol como agente crioprotector. Los viales se almacenaron en congelación (-40 °C) hasta su uso.

La preparación del inóculo para la contaminación de las muestras se llevó a cabo transfiriendo el contenido de un vial con las cepas congeladas a tubos con caldo RCM, que se incubaron posteriormente a 37 °C en una jarra de anaerobiosis durante 72 horas. La suspensión de esporas resultante se centrifugó (13000g, 15 minutos, 4 °C) y el sedimento se resuspendió en 10 ml de suero fisiológico estéril, obteniéndose una carga aproximada de 10⁸ esporas/ml.

3.1.4. TIPOS DE QUESO EMPLEADOS

3.1.4.1. Quesos de pasta blanda

El efecto letal de los electrones acelerados en *Listeria spp.* se estudió en dos tipos de quesos de pasta blanda madurados por moho superficial (Camembert y Brie). Para ello, se adquirieron en supermercados locales quesos Camembert, en porciones individuales de 30 g, y Brie, en piezas de aproximadamente 1 kg, elaborados ambos con leche pasteurizada de vaca.

Paralelamente, se adquirieron piezas enteras (1-1,5 kg) de quesos Camembert y Brie para estudiar el efecto del tratamiento ionizante en la microbiota láctica, propiedades fisicoquímicas [pH, actividad de agua (a_w)], textura, color y propiedades sensoriales.

3.1.4.2. Quesos duros y semiduros

El estudio de la aplicación de electrones acelerados en la manifestación del hinchamiento tardío se realizó en queso semiduro de pasta prensada, fabricado con leche pasteurizada de vaca y comercializado en bloques prismáticos (30x12x12 cm, peso en torno a 3,5 kg).

La investigación del efecto de las radiaciones ionizantes en las características microbiológicas, fisicoquímicas y sensoriales se llevó a cabo en quesos como el descrito en el párrafo anterior, y en piezas de queso duro. Para ello, se adquirieron en un supermercado local barras de queso tipo Cheddar de pigmentación naranja (aprox. 2,5 kg por pieza).

3.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los quesos se cortaron, de forma higiénica, en unidades experimentales de diferente tamaño en función del análisis al que iban destinadas, empleando cuchillos para las variedades de pasta blanda y una loncheadora eléctrica para el resto de quesos.

Las muestras de queso Camembert y Brie destinadas al estudio de la cinética de destrucción de *Listeria* spp. por electrones acelerados se contaminaron con las suspensiones bacterianas descritas en el apartado anterior. Para ello, se eliminaron de forma aséptica las cortezas y con jeringas estériles desechables se inyectaron alícuotas de 0,1 ml de la suspensión correspondiente en cinco puntos distintos de la masa, alcanzándose una carga bacteriana de aproximadamente 10^7 - 10^8 ufc/g. En el caso de *C. tyrobutyricum*, las lonchas de queso madurado se contaminaron por inmersión durante 10 segundos en la suspensión de esporas preparada como se indica en el apartado anterior, consiguiéndose una concentración del orden de 10^6 esporas/cm². El elevado número de microorganismos con el que se contaminaron las muestras permitió obtener de forma fehaciente las gráficas de supervivencia correspondientes y determinar, a partir de ellas, los parámetros de destrucción frente al tratamiento con electrones acelerados.

Posteriormente, todas las muestras se envasaron a vacío hasta alcanzar 20 kPa en bolsas de plástico laminado, compuesto por poliamida y polietileno (Plastiñi, La Rioja, España), de 90 µm de grosor y de baja permeabilidad (transmisión de oxígeno y dióxido de carbono de 35 y 150 cm³/día·m²·atm, respectivamente). Una vez envasadas, las muestras se enfriaron (<5 °C) y se dividieron en diferentes lotes en función de la dosis de radiación, temperatura de almacenamiento y tipo de análisis previsto (tabla 3.4). Los lotes que no se irradiaron fueron considerados como muestras control.

Un experimento se define como cada una de las combinaciones de los niveles de cada factor (Bower, 2009), que en el plan de trabajo establecido vendría dado por

la dosis aplicada y las condiciones de almacenamiento (temperatura y tiempo). El número de unidades experimentales o muestras necesarias para cada análisis se calculó como el producto del número de experimentos a realizar por el número de réplicas establecidas para cada caso.

Tabla 3.4. Condiciones generales de los experimentos del plan de trabajo.

Análisis	Dosis (kGy)	T (°C)	d	Nº experimentos (dosis xTxd)
MICROBIOLÓGICOS				
<i>L. monocytogenes</i>	0;0,2;0,5;1;2	-	1	5
<i>L. innocua</i>	0;0,2;0,5;1;2	-	1	5
<i>C. tyrobutyricum</i>	0;1;2;3;4;6;8	-	1	7
Microbiota	0;1;2;3	4 y 14	10	80
FISICOQUÍMICOS				
pH	0;1;2;3	4	1	4
a_w	0;1;2;3	4	1	4
PROP. SENSORIALES				
Color	0;1;2;3	4 y 14	3	24
Textura	0;1;2;3	4 y 14	3	24
Apariencia	0;1;2;3	4 y 14	3	24
Olor	0;1;2;3	4 y 14	3	24
Sensación en boca	0;1;2;3	4 y 14	3	24

T: temperatura de almacenamiento; d: número de días de análisis durante el almacenamiento

3.3. TRATAMIENTO CON ELECTRONES ACELERADOS

Los lotes de muestras se transportaron en recipientes isoterms de polipropileno expandido a la planta de irradiación IONISOS IBÉRICA S.A., sita en Tarancón (Cuenca, España). Esta planta está equipada con un acelerador de electrones del tipo Rhodotron (modelo TT200; IBA Industrial; Bélgica), que opera a 10 MeV con una potencia máxima de 80 kW (figura 3.1).

Se aplicaron tratamientos a dosis entre 0,2 y 8 kGy. La dosis exacta absorbida se determinó con dosímetros de triacetato de celulosa CTA-125 (Fuji, Japón)

colocados en la superficie del envase de las muestras: la variación de la absorbancia de la película de triacetato de celulosa a una longitud de onda dada (280 nm) permite conocer la dosis absorbida por la muestra (Melero y Pagán, 2007).

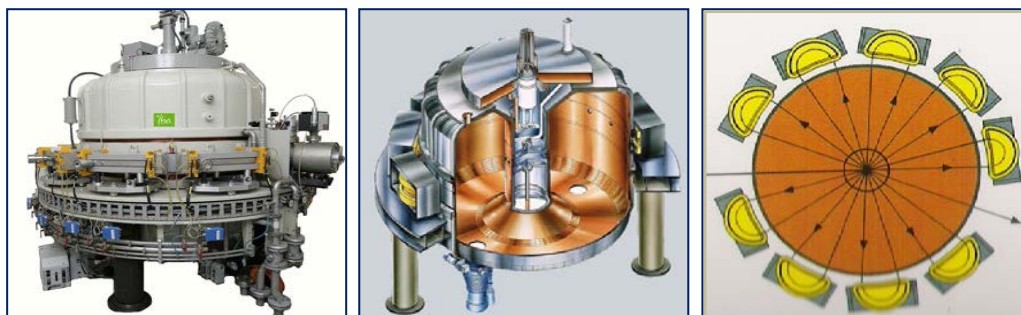


Figura 3.1. Imagen de un acelerador de electrones (izquierda) y corte longitudinal del mismo (centro). Representación transversal de su estructura y recorrido de los electrones en el interior hasta su salida (derecha)

Los tratamientos se llevaron a cabo por triplicado y a temperatura ambiente (20-24 °C), con un incremento inferior a 2 °C en las muestras durante su tratamiento. Inmediatamente después del tratamiento, las muestras se devolvieron en los mismos recipientes isoterms al laboratorio, donde se procedió a realizar los análisis correspondientes al día 0. Para estudiar su comportamiento en el tiempo, el resto de muestras se almacenaron a 4 y 14 °C, siendo ésta última una temperatura cercana a la de maduración del queso, así como un ejemplo de abuso de temperatura durante su distribución.

3.4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

3.4.1. CINÉTICA DE DESTRUCCIÓN DE *Listeria* spp. Y *C. tyrobutyricum* POR LAS RADIACIONES IONIZANTES

Las muestras de queso (aprox. 10 g) destinadas al recuento de supervivientes al tratamiento con electrones acelerados se pesaron en balanzas monoplato. A continuación se homogeneizaron durante 90 segundos en un *stomacher* con 20 ml de suero fisiológico estéril. En el caso de *C. tyrobutyricum*, las muestras

homogeneizadas se calentaron en un baño de agua a 80 °C durante 10 minutos, con el fin de activar las esporas y destruir las células vegetativas de la microbiota del queso. Transcurridos los 10 min de calentamiento, las muestras se enfriaron en un baño de agua-hielo.

Posteriormente se procedió a la siembra en masa de las diluciones adecuadas, de acuerdo al número de células viables esperadas, en agar Palcam (véase 3.1.2) para *Listeria* spp. y agar RCM para *C. tyrobutyricum*. Una vez sembradas, las placas se incubaron en las condiciones óptimas de crecimiento para cada microorganismo (tabla 3.5). Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió al recuento de colonias. Teniendo en cuenta la dilución y el volumen sembrados, se calculó el número de unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de producto.

Tabla 3.5. Condiciones de incubación para el recuento microbiológico.

Microorganismo	Medio de cultivo	Condiciones de incubación
<i>Listeria</i> spp.	Agar Palcam selectivo	37 °C; 48 horas
<i>C. tyrobutyricum</i>	Agar RCM	32 °C; 48 h; anaerobiosis
Viables totales	PCA	32 °C; 48 horas
Lactobacilos	Doble capa de agar MRS a pH 5,5	32 °C; 48 horas

Como se mencionó en el apartado 1.4.2, la destrucción de microorganismos con electrones acelerados se ajusta a una cinética de primer orden. A partir de la recta resultante de representar el logaritmo del número de supervivientes en función de la dosis aplicada (gráfica de supervivencia), se calculó la dosis de reducción decimal (valor D) como el valor inverso de su pendiente cambiado de signo.

3.4.2. EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA DEL QUESO DURANTE EL ALMACENAMIENTO

El recuento de supervivientes de la microbiota del queso (viables totales o bacterias ácido lácticas, BAL) y el cálculo de la dosis de reducción decimal se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado anterior para *Listeria* spp. y de acuerdo a las condiciones recogidas en la tabla 3.5.

Además del estudio de la resistencia de la microbiota frente al tratamiento ionizante se hicieron recuentos periódicos durante el almacenamiento desde el día cero (inmediatamente después del tratamiento) hasta que la microbiota alcanzó la fase estacionaria de crecimiento, con el fin de estudiar su capacidad de recuperación. Las curvas de crecimiento resultantes se construyeron de acuerdo con el modelo de Baranyi (Baranyi y Roberts, 1994), utilizando el complemento para Excel de ajuste de curvas *Dmfit*.

3.5. ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS

3.5.1. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA

La composición química (humedad, cenizas, grasa, proteínas) se determinó por triplicado en muestras de queso no tratadas con electrones acelerados.

3.5.1.1. Humedad

El contenido de humedad se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Case y col. (1985). Las cápsulas de porcelana se secaron previamente en estufa a 110 °C durante 2 h. Se dejaron enfriar en un desecador de vidrio con gel de sílice y, como indicador de la hidratación, se utilizó cloruro de cobalto. Tras pesar las cápsulas vacías (PC) se depositaron en su interior 2-3 gramos de la muestra de queso, y se pesaron de nuevo (peso de la cápsula con la muestra fresca, PCMF). Posteriormente, el conjunto (cápsula con la muestra) se introdujo en estufa a 110 °C hasta peso constante (aproximadamente 72 horas). Las muestras deshidratadas, tras enfriarse en el desecador de vidrio, se pesaron (peso de la cápsula con la muestra seca, PCMS). Todas las pesadas se realizaron en la balanza analítica indicada en la tabla 3.1. El contenido de humedad, expresado como porcentaje de agua perdida por la muestra, se determinó por diferencia entre el peso de la muestra fresca y la deshidratada:

$$\% \text{ humedad} = \frac{(\text{PCMF}-\text{PCMS})}{(\text{PCMF}-\text{PC})} \times 100$$

3.5.1.2. Cenizas

La determinación de las cenizas se llevó a cabo en las muestras deshidratadas del apartado anterior, que se introdujeron en un horno mufla a 550 °C hasta su total incineración (aproximadamente 48 horas). Las cápsulas con las cenizas (PCC) se pesaron en una balanza de precisión y el contenido mineral se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{(PCC-PC)}{(PCMF-PC)} \times 100$$

3.5.1.3. Grasa

La determinación de la grasa de las muestras se realizó de acuerdo al método de Bligh y Dyer (1959) modificado por Hanson y Olley (1963). Para ello, se homogeneizó una muestra de queso con metanol, cloroformo y suero fisiológico (1:4:4:2; m:v:v:v). La mezcla se centrifugó a 2000g durante 5 minutos a temperatura ambiente, obteniéndose tres fases: una fase superior y de naturaleza polar, una interfase sólida (proteínas no solubilizadas, principalmente) y una fase inferior, de naturaleza apolar (material lipídico). Se tomó la mitad del volumen de esta fase orgánica y se eliminó el disolvente por evaporación a vacío en un rotavapor. El porcentaje de grasa de las muestras se estimó por diferencia de pesada con el matraz vacío:

$$\% \text{ grasa} = \frac{(\text{peso matraz con grasa} - \text{peso matraz}) \times 2}{\text{peso muestra}} \times 100$$

3.5.1.4. Proteína

La cuantificación de proteína se realizó por el método de Kjeldahl (AOAC, 1995). Se introdujeron muestras de 2-3 g de queso en un tubo de vidrio junto con 20 ml de ácido sulfúrico 96%, 4 perlas de vidrio y una pastilla de catalizador (99,9% sulfato potásico, 0,1% selenio). Se calentaron a 350-400 °C en un digestor acoplado a un sistema de lavado de gases (*scrubber*) hasta observar un líquido transparente de color amarillo claro. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron unas

gotas de fenolftaleína al 0,1% en etanol. Al extracto se le añadió hidróxido sódico al 50% (p:v) hasta observar el viraje a rosa de la fenolftaleína. A continuación, se llevó a cabo la destilación de la mezcla, recogiendo el líquido destilado (amoníaco) en un matraz Erlenmeyer con 25 ml de ácido bórico al 4%. Por último, se valoró la solución con ácido clorhídrico 0,5 M y una mezcla etanólica de rojo de metilo (0,2%) y azul de metileno (0,1%). El porcentaje de nitrógeno de la muestra se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{(\text{VHCl}_M - \text{VHCl}_B) \times M_{\text{HCl}} \times \text{PA}_N}{P_M} \times 100$$

siendo:

- VHCl_M y VHCl_B , el volumen de ácido clorhídrico empleado en la valoración de la muestra y del blanco, respectivamente,
- M_{HCl} , la molaridad del ácido clorhídrico,
- PA_N , el peso atómico del nitrógeno y
- P_M , el peso de la muestra.

A partir del valor resultante, y asumiendo que las proteínas tienen un 16% de nitrógeno, se determinó el contenido en proteína de las muestras.

3.5.2. ACTIVIDAD DE AGUA (a_w)

La determinación de la a_w de las muestras se realizó por triplicado. Para ello, se empleó un higrómetro de punto de rocío a una temperatura de 25 °C calibrado con soluciones salinas saturadas de a_w conocida (Labuza y col., 1976). La muestra (aprox. 2 g) se introdujo en la cubeta del equipo en cápsulas de plástico, que se llenaron hasta un tercio de su capacidad y se registró el valor proporcionado por el higrómetro.

3.5.3. pH

El pH se determinó en un homogeneizado de la muestra con agua destilada en una proporción 1:9 (p:v), preparándose tres réplicas de cada muestra. El pH de la mezcla

resultante se midió a temperatura controlada con un pH-metro previamente calibrado con soluciones tampón de referencia de pH 7,0 y 4,0 (tabla 3.1).

3.6. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES SENSORIALES

3.6.1. DETERMINACIÓN INSTRUMENTAL DEL COLOR

La Comisión Internacional de Iluminación (CIE) definió en 1976 el espacio cromático $L^*a^*b^*$ CIE 1976 —más conocido como sistema CIE_{Lab} — para la medición del color (ISO, 2008). Este sistema está basado en tres coordenadas cromáticas (figura 3.2):

- Coordenada L^* o luminosidad (*lightness*), desde el negro (valor 0) a blanco (100).
- Coordenada a^* o tendencia al rojo (*redness*), que representa la medida del dominio del rojo (valor >0) o verde (valor <0).
- Coordenada b^* o tendencia al amarillo (*yellowness*), cuyos valores positivos indican cercanía al color amarillo y los valores negativos, al azul.

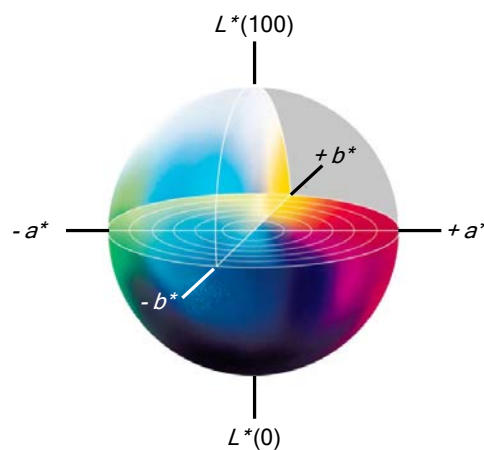


Figura 3.2. Representación gráfica del sistema CIE_{Lab} .

Estos parámetros se midieron con un colorímetro triestímulo dotado de una fuente de iluminación que simulaba la luz diurna (iluminante D65) y un ángulo de visión correspondiente al «observador estándar de 2º» definido por la CIE (ISO, 2008). El instrumento se calibró con dos placas con valores normalizados: una de

color rosado ($L^*=44,88$, $a^*=25,99$ y $b^*=6,67$) y otra de color blanco ($L^*=96,94$, $a^*=0,16$ y $b^*=2,02$).

Los cambios en el color se determinaron a 25 °C sobre la superficie de porciones de queso. La primera medida del color (tiempo 0 h) se realizó inmediatamente después de la apertura de las bolsas de envasado indicado en el punto 3.2. Seguidamente, las muestras se mantuvieron expuestas al aire y en oscuridad, repitiéndose la medición a las 4 y 24 h de exposición al aire. Este proceder se realizó de acuerdo al plan de trabajo recogido en la tabla 3.5. Se hicieron 8 réplicas de cada experimento.

3.6.2. DETERMINACIÓN INSTRUMENTAL DE LA TEXTURA

De acuerdo a la definición de la Norma Española de Análisis Sensorial sobre Vocabulario (AENOR, 2010), la textura de un alimento o producto alimenticio se define como *«todos los atributos mecánicos, geométricos, de cuerpo y de superficie de un producto perceptibles a través de los receptores cinestésicos y somáticos y (si corresponde) visuales y auditivos desde el primer bocado hasta la deglución final»*.

La medida instrumental de la textura se centra en los atributos mecánicos, definidos en la misma norma como *«aquellos relacionados con la reacción de un producto a un esfuerzo. Estos son: dureza, cohesión, viscosidad, elasticidad y adherencia»*. Por tanto, debe realizarse mediante pruebas que, imitando el proceso de masticación, permitan cuantificar dichos parámetros. De acuerdo con Bourne (1979), el análisis del perfil de textura (*Texture Profile Analysis*, TPA) es el ejemplo más notable de las técnicas que correlacionan determinaciones objetivas o instrumentales con valores sensoriales, por lo que esta metodología se empleó para la determinación de la textura de todos los quesos estudiados. De forma complementaria, dado que en las variedades de pasta blanda (Camembert y Brie) la corteza y el interior del queso presentan características reológicas claramente diferenciadas, se estudió el efecto de los tratamientos de irradiación sobre la firmeza de ambas zonas mediante ensayos de penetración durante el almacenamiento de las muestras. Ambas determinaciones

—TPA y ensayo de penetración— se llevaron a cabo a temperatura ambiente de acuerdo a los procedimientos descritos por Bourne (1978) y Szczesniak (1986) en un texturómetro (tabla 3.1) equipado con una célula de carga de 5 kg y controlado mediante el programa informático Texture Exponent 32, versión 6.0.7.0. (Stable Micro Systems, Reino Unido).

3.6.2.1. Análisis del perfil de textura

Para esta prueba se utilizó una sonda de aluminio cilíndrica, de 2,5 cm de diámetro y con la base plana en su extremo terminal (modelo P/25), que presiona a la muestra colocada sobre una plataforma de aluminio (modelo HDP/90). Tras calibrar la fuerza con una pesa de 5 kg y ajustar la posición de la sonda se establecieron las velocidades de la sonda (0,2 y 1 cm/s durante la compresión y el ascenso, respectivamente), así como el grado de compresión de la muestra (50%).

De cada unidad experimental se obtuvieron 5 muestras cilíndricas (probetas) de 1,5 cm de altura y 2,0 cm de diámetro con un sacabocados de acero inoxidable. Cada ensayo incluye dos compresiones consecutivas de la probeta, obteniéndose una gráfica (figura 3.3) en la que se representa su comportamiento frente a la fuerza aplicada (ordenadas) y al tiempo de ensayo (abscisas), y a partir de la cual se pueden calcular los siguientes parámetros:

- Dureza: altura máxima del primer pico de la curva, es decir, la fuerza máxima $F_{\text{máx}}$ (en newtons, N) obtenida en el primer ciclo de compresión. Durante la masticación, la dureza corresponde a la fuerza requerida para comprimir un alimento sólido entre los dientes molares o un producto semi-sólido entre la lengua y el paladar.
- Adhesividad: área negativa de la gráfica tras producirse el primer ciclo de compresión (A3). Indica la fuerza necesaria (N x s) para separar la sonda y la muestra después de la compresión inicial. Desde el punto de vista sensorial, este parámetro representa el trabajo requerido para retirar con la lengua el alimento que se queda adherido al paladar, dientes o labios.

- Elasticidad: altura que la muestra recupera entre el final de la primera y el principio de la segunda compresión que, teniendo en cuenta la velocidad de la sonda durante la compresión, se pueden calcular a partir de los tiempos t_1 y t_2 , respectivamente. Por tanto, se expresa en unidades de longitud (m, mm) y representa, a nivel sensorial, el grado en que un producto retorna a su forma original cuando es comprimido entre los dientes.
- Cohesividad: relación entre el área positiva correspondiente a la segunda compresión y la obtenida en la primera (A_2/A_1), por lo que es adimensional. Este parámetro puede tomar desde valores muy próximos a cero hasta 1, en relación con la extensión a la que un material puede ser deformado antes de que rompa. Desde un punto de vista sensorial, equivale al grado de deformación del alimento antes de fragmentarse cuando se mastica con los dientes molares.

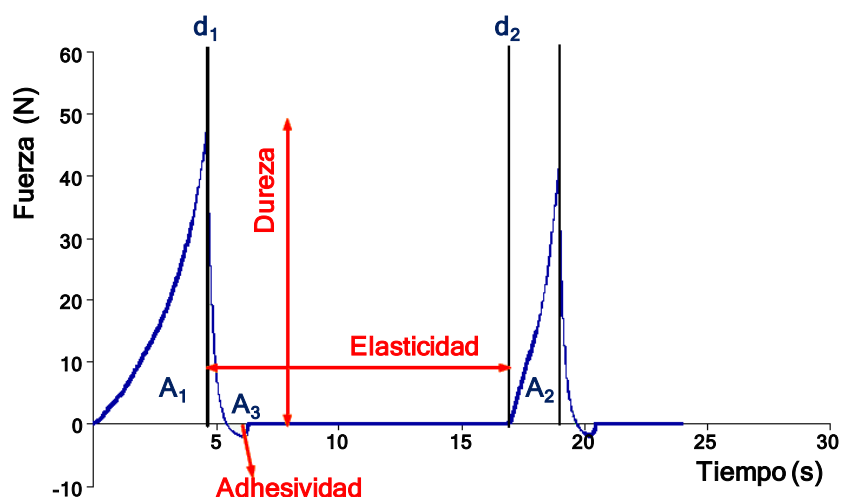


Figura 3.3. Representación gráfica de un ensayo del análisis del perfil de textura (TPA).

A partir de los parámetros anteriores se pueden definir otras dos características de textura de un alimento:

- Gomosidad: representa la fuerza necesaria (N) para disgregar una muestra antes de su deglución, y viene dada por el producto de la dureza por la cohesividad.
- Masticabilidad: trabajo necesario (expresado en julios, J) para reducir la consistencia de un alimento para que pueda ser fácilmente deglutido. Este parámetro

equivaldría al tiempo requerido para masticar a velocidad constante un alimento antes de su deglución. Se calcula como el producto de la gomosidad y la elasticidad.

3.6.2.2. Ensayo de penetración

El ensayo de penetración se basa en la medida de la resistencia que opone el alimento a que una sonda penetre en su interior. Este análisis se llevó a cabo, por separado, en la corteza y la masa de los quesos de pasta blanda (Camembert y Brie). Para su separación, se introdujo un bisturí en la zona del cambio de color de la porción de queso (figura 3.4). Para el ensayo se cortaron muestras de 1,5 x 1,5 cm y 0,5 cm de espesor de cada una de las partes.



Figura 3.4. Corte transversal de queso Camembert.

Las muestras se colocaron sobre una plataforma metálica perforada con un orificio en el centro de 9 mm de diámetro. La punción se realizó con una sonda cilíndrica de acero inoxidable de 4 mm de diámetro (modelo P/4) que se movía a una velocidad de 0,2 mm/s. La fuerza de ruptura se calculó como la altura máxima de la curva de deformación resultante (figura 3.5)

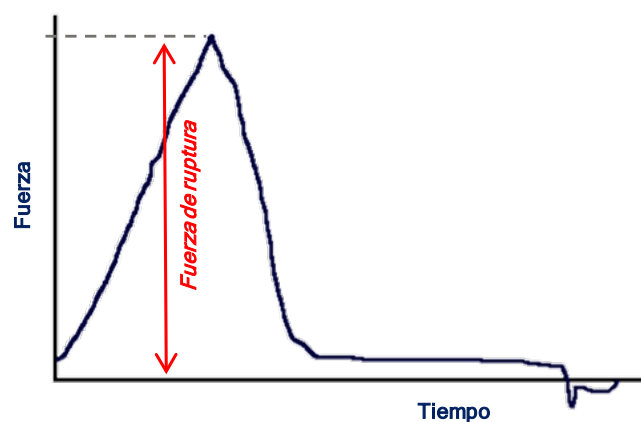


Figura 3.5. Representación gráfica de un ensayo de penetración (curva de deformación).

3.6.3. ANÁLISIS SENSORIAL

Los análisis sensoriales se realizaron en la sala de catas, construida de acuerdo a la norma ISO/DP 66.58 (ISO, 1981a), de la Sección Departamental de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Dicha sala consta de un área de preparación de muestras y 6 cabinas independientes y comunicadas con la zona de preparación mediante ventanas con bandejas giratorias. Cada cabina está dotada de una mesa de trabajo, una pila, un grifo de agua corriente e iluminación blanca y roja.

El panel de catadores estuvo compuesto por 20 personas seleccionadas entre los miembros de la Sección Departamental.

Se eligió una prueba discriminativa (triangular) y una de clasificación o preferencia (ensayo de ordenación o de rango). En ambos ensayos se evaluaron la apariencia, el olor y la sensación en boca, indicando a los panelistas que tomaran un poco de pan sin sal y después se enjuagasen la boca con agua al inicio de la prueba y antes de catar cada muestra. Además, se les pidió que justificaran sus respuestas mediante breves descripciones.

En la prueba triangular (ISO, 1981b) se presentaron tres muestras codificadas a cada uno de los evaluadores, de las cuales dos eran iguales y una diferente, para que identificara esta última y señalara si la respuesta se basaba en las diferencias encontradas o si, por el contrario, había contestado de forma aleatoria. En esta prueba, la probabilidad de acertar al azar es de un 33%.

En la prueba de ordenación, los jueces debían ordenar diversas muestras basándose en el grado de proximidad de la característica sensorial evaluada (apariencia, olor y sensación en boca) a la que presenta el producto original, sin que hubiese opción de omitir o repetir posición. La cuantificación de cada respuesta se hizo otorgando un punto a la muestra peor valorada, dos puntos a la siguiente, y así sucesivamente, hasta llegar a la mejor valorada, cuya puntuación es igual al número

de muestras presentadas. La valoración final de cada una de las muestras fue el sumatorio de las puntuaciones otorgadas por los diferentes catadores.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.7.1. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Las medias y desviaciones estándar de los recuentos microbiológicos, así como las ecuaciones de regresión de las rectas de supervivencia, sus coeficientes de determinación (R^2) y los límites de confianza al 95% de los valores D se calcularon mediante la hoja de cálculo Excel del paquete ofimático Microsoft Office (Microsoft, EE. UU.).

3.7.2. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS

Las medias y desviaciones estándar de los resultados de la composición química de los quesos se determinaron usando Excel. En el resto de parámetros fisicoquímicos (pH, a_w), se utilizó el programa informático Statgraphics Centurion XVII.I para Windows (Statistical Graphics Corporation, EE. UU.) para el cálculo del valor medio y desviaciones estándar y estudiar el efecto del tratamiento con electrones acelerados. Para ello, tras confirmar que los datos presentaban una distribución normal aplicando el test de Shapiro-Wilk, se llevó a cabo un análisis de varianza (*Analysis of Variance*, ANOVA) de una vía. En aquellos parámetros en los que existían diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$), se realizó el test de Rango Múltiple de Duncan para determinar qué lotes (dosis de tratamiento) presentaban diferencias entre sí.

3.7.3. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN INSTRUMENTAL DEL COLOR Y TEXTURA

A partir de los datos experimentales se analizó el efecto del tratamiento de irradiación de forma aislada y en combinación con el tiempo y temperatura de

almacenamiento de las muestras. En el caso del color, se añadió, como factor adicional, el tiempo de exposición al aire tras la apertura del envase.

En primer lugar, mediante el test de Shapiro-Wilk y el test de Levene se comprobó el ajuste a una distribución normal y la igualdad de varianzas, respectivamente, de los datos de cada variable, es decir, de cada parámetro de color (L^* , a^* , b^*) y de TPA. Posteriormente, se llevó a cabo un ANOVA multifactorial para determinar si los factores estudiados (tabla 3.6) o sus interacciones presentaban efectos estadísticamente significativos y, en caso afirmativo, su nivel de significación. Para ello, se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVII.I para Windows (Statistical Graphics Corporation, EE. UU.).

Tabla 3.6. Niveles de los factores implicados en el estudio de los parámetros de color y textura.

Factor	Quesos	
	de pasta blanda	duros y semiduros
Dosis de tratamiento (kGy)	0, 1, 2 y 3	0, 1, 2 y 3
Temperatura de almacenamiento (°C)	4 y 14	4 y 14
Tiempo de almacenamiento (días)	COLOR: 0 y 20 TEXTURA: 0, 15 y 42	0, 14 y 28
Tiempo de exposición al aire (h)	COLOR: 0,4 y 24 TEXTURA: 0	COLOR: 0,4 y 24 TEXTURA: 0

Se emplearon distintas técnicas estadísticas para la descripción de los efectos del tratamiento con electrones acelerados y las condiciones de almacenamiento. Así, los resultados de las distintas variables de los quesos de pasta blanda y el queso semiduro se ajustaron a modelos cuadráticos de superficie de respuesta y en el caso del queso duro (Cheddar) se aplicaron las técnicas multivariantes de Análisis de Componentes Principales y Análisis de Conglomerados o Clústeres.

3.7.3.1. Regresión múltiple: Modelo cuadrático de superficie de respuesta

Las variables observadas se ajustaron por regresión múltiple a un modelo de superficie de respuesta con las herramientas de Statgraphics Centurion XVII.I para Windows (Statistical Graphics Corporation, EE. UU.). La expresión general que describe este modelo corresponde a la siguiente ecuación cuadrática:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$

donde Y es el valor predicho de la variable (parámetros de color o de textura) y β_0 , β_i , β_{ii} y β_{ij} son los coeficientes estimados por la regresión para cada uno de los términos lineales, cuadráticos y cruzados de los efectos de la dosis del tratamiento aplicado (X_1), el tiempo de almacenamiento (X_2), la temperatura de almacenamiento (X_3) y, en el estudio de los parámetro de color, el tiempo de exposición al aire (X_4). Para la construcción del modelo, se aplicó un ANOVA para estudiar la significación de cada uno de los términos introducidos en el mismo, de manera que aquellos que resultaron no significativos ($p > 0,05$) fueron gradualmente eliminados. La bondad del ajuste se comprobó calculando el error cuadrático medio (*Root Mean Square Error*, RMSE) mediante la siguiente ecuación:

$$RMSE = \sqrt{(1/n) \sum (Y - Y_{obs})^2}$$

siendo Y e Y_{obs} los valores predichos y observados, respectivamente y n el número de muestras.

3.7.3.2. Análisis de componentes principales y análisis de conglomerados

El análisis de componentes principales y el análisis jerárquico de conglomerados (*Hierarchical Cluster Analysis*, HCA) son técnicas descriptivas multivariantes. La primera de ellas se basa en la transformación de las variables observadas, por combinación lineal, en unas nuevas variables o «componentes» que aportan información sobre el porcentaje de varianza que permiten explicar. El HCA permite la agrupación de los casos analizados en función de las componentes que mayor

cantidad de varianza recogen, denominadas «componentes principales». Para ello, se usó el programa SPAD.N (CISIA, Francia).

Se partió de una matriz de datos que contenía los valores obtenidos en los análisis de cada uno de los parámetros de color y textura, que se normalizaron para subsanar las diferencias en los órdenes de magnitud de las distintas variables. Los conglomerados o clústeres se obtuvieron aplicando el método de agrupamiento jerárquico de Ward a las distancias euclídeas entre los valores de las componentes principales para cada uno de los casos.

3.7.4. RESULTADOS DEL ANÁLISIS SENSORIAL

Los resultados obtenidos en la prueba triangular se interpretaron de acuerdo con las tablas del número mínimo de jueces con respuesta correcta para establecer el nivel de significación a varios niveles de probabilidad para pruebas triangulares, recogidas en Pedredo y Pangborn (1989).

El nivel de significación de los datos obtenidos en la prueba de ordenación se estableció mediante la suma de puntuaciones de Friedman de acuerdo al modelo de Joanes (1985) y las tablas de valores críticos de las diferencias entre puntuaciones propuestas por Christensen y col. (2006).

4.

RESULTADOS

Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie (1867-1934)

ARTÍCULO 1:

Use of the E-beam radiation to diminish the late blowing of cheese

Velasco, R., Ordóñez, J.A., Cabeza, M.C., de la Hoz, L., Cambero, M.I.

International Dairy Journal, 2011, 21:493-500.

Índice de impacto (JCR, 2011): 2,401

Posición de la revista en el área *Food Science and Technology*: 24/128 (Q1)

RESUMEN:

El presente artículo examina el efecto del tratamiento con electrones acelerados en la supervivencia de *Clostridium tyrobutyricum* con el objetivo de reducir la aparición del hinchamiento tardío en el queso. Así mismo, se analizan los posibles cambios en la microbiota, los parámetros fisicoquímicos (composición, pH y actividad de agua) y atributos sensoriales (color, textura y análisis sensorial) durante el almacenamiento.

La aplicación de un tratamiento de 3 kGy dio lugar a una reducción del 96% de las esporas de *C. tyrobutyricum*. Por otra parte, se produjo un descenso importante en los recuentos de la microbiota, compuesta previsiblemente por bacterias lácticas, que se recuperó durante el almacenamiento hasta alcanzar niveles cercanos a los normales.

No se observaron diferencias significativas en los parámetros fisicoquímicos analizados entre el queso irradiado y control. Si bien los cambios en el color fueron insignificantes en los quesos tratados a dosis menores de 3 kGy, en general las muestras irradiadas exhibieron una mayor tendencia al rojo y menor tendencia al amarillo. La irradiación a dosis de 3 kGy tuvo un efecto significativo en la textura consistente en un ablandamiento y un incremento de la cohesividad.

Los cambios detectados en la apariencia, olor y la sensación en boca en las muestras sometidas a 3 kGy no impidieron que el queso irradiado fuese considerado por los panelistas como aceptable para su consumo.



Contents lists available at ScienceDirect

International Dairy Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/idairyj

Use of the E-beam radiation to diminish the late blowing of cheese

R. Velasco, J.A. Ordóñez, M.C. Cabeza, L. de la Hoz, M.I. Cambero*

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 June 2010

Received in revised form

20 January 2011

Accepted 24 January 2011

ABSTRACT

This study examines the effect of E-beam irradiation on the survival of *Clostridium tyrobutyricum* to diminish the late blowing of cheese. At a dose of 3 kGy brings about a 96% reduction of the *C. tyrobutyricum* spores. This treatment also provokes an important reduction in the number of common microbiota presumably composed by lactic acid bacteria. Nevertheless, following reparation of damage, these bacteria still grow to reach almost normal levels. At doses lower than 3 kGy, the changes in physico-chemical and sensory characteristics of the cheese were negligible. An increase of redness (a^* value) and a decrease of yellowness (b^* value) were observed in irradiated samples. The irradiation at dose of 3 kGy had a significant ($P < 0.05$) effect on the texture, decreasing the hardness and increasing the cohesiveness. Although at 3 kGy some changes of appearance, odour and flavour were detected by sensory analysis, samples were acceptable for consumption.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Anaerobic spore-formers do not create the problems of the same magnitude in the dairy industry as in the canning industry. However, the importance of anaerobic spore-formers in dairy products must not be overlooked. The late blowing of cheeses is spoilage caused by the growth of *Clostridium tyrobutyricum* and related species. Usually, the defect does not become noticeable until after a month of ripening, which distinguishes it from coliform gas, which occurs within 1–3 days of manufacturing (Donnelly & Busta, 1981). This problem is due to butyric fermentation of lactate, which yields butyric and acetic acids, carbon dioxide and hydrogen (Steffen, Flueckiger, Bosset, & Ruegg, 1987). Thus, both off-flavours and off-odours appear in addition to the gas defect. The products most frequently subject to this are long-ripened cheese made from enzymatic curd and processed cheeses. These types of cheese are characterised by a very elastic and impermeable texture. Consequently, the gas becomes trapped in the cheese body since it can not diffuse to the outside. Gas accumulation results in hole formation and, eventually, the cheese mass blowing. This phenomenon is uncommon if product is stored under refrigeration because of the mesophilic nature of clostridia, but its frequency increases when temperature abuse occurs and if environmental conditions are favourable for the growth of clostridia, i.e., water activity (a_w) higher than 0.93 and relatively high pH (Donnelly & Busta, 1981). These organisms may grow even if lactic acid microbiota are present, such as in Gouda and Emmental cheese varieties.

Food irradiation improves the microbial safety and extends the shelf life of foods by reducing microbial numbers especially when traditional technologies for sanitising are not possible. This non-thermal treatment has been used for milk and several dairy products (such as cheeses) with different antimicrobial effectiveness (Barba, Calvo, Herraiz, & Santa-María, 2009; Hashisaka, Einstein, Rasco, Hungate, & Dong, 1990; Hashisaka, Weagant, & Dong, 1989; Konteles, Sinanoglou, Batrinou, & Sflomos, 2009; Seisa et al., 2004; Tsiotsias, Savvaidis, Vassila, Kontominas, & Kotzekidou, 2002) and shelf-life extension (Blank, Shamsuzzaman, & Sohal, 1992; Boisseau, 1994; Bougle & Stahl, 1993; Lalaguna, 2003). However, some researchers (Bongirwar & Kumta, 1967; Kung, Gaden, & King, 1953; Yüceer & Gündüz, 1980) have suggested that the use of irradiation for dairy products should be limited because of changes in nutritive and sensory quality (aroma, colour, and flavour). This paper is an attempt to eliminate clostridia responsible for the late blowing of cheese to statistically negligible levels by applying E-beam irradiation. The effect of irradiation on sensory properties has been previously evaluated (Blank & Cumming, 2001) showing that irradiation generates non-desirable off-odours and flavours because of the formation of radiolytic products, especially in high lipid-based foods.

2. Materials and methods

2.1. General characteristics of cheese used in the experiments

Commercial cheese made from pasteurised cows' milk was used. Production was typical of semi-cured cheese; made adding a lactic starter culture and enzymatic coagulation (clotting temperature

* Corresponding author. Tel.: +34 913943745; fax: +34 913943743.
E-mail address: icambero@vet.ucm.es (M.I. Cambero).

approximately 36 °C for 45 min), which gives rise to an elastic and impermeable curd. Cheeses were ripened at 12–14 °C under a relative humidity of 88% before sale. The product is marketed in both prismatic blocks (30 cm in length) of square base (12 × 12 cm) and slices (2 mm thick) after a ripening time of about three months.

If at this time late blowing was not present, the level of *C. tyrobutyricum* spores (and related species) was considered to be negligible. Therefore, this cheese could be used for the inoculation experiments.

2.2. Organism

One strain of *C. tyrobutyricum* ATCC 25755 was used. Spores were maintained by freezing (–40 °C) in a Reinforced Clostridial Medium (RCM; CM0149, Oxoid, Basingstoke, UK) agar free with 5% glycerol added. Fresh cultures were prepared by transferring 1 mL of thawed sample into 125 mL RCM agar free in an anaerobic jar and cultured at 37 °C for 72 h. The culture was then centrifuged (at 13,689 × g and 4 °C) and the pellet suspended in a beaker with 50 mL of 0.85% NaCl (w/v) sterile saline solution, which yielded a bacterial load of approximately 10⁸ cells mL⁻¹. Slices were contaminated by immersion into the beaker for about 10 s. A large number of cells were used to precisely determine the kill kinetics.

2.3. Sample preparation and irradiation treatment

Whole cheeses (3.5 kg weight unit) packed individually into impermeable plastic bags which were purchased in a local supermarket. Slices of about 10 g (2 mm thickness) were cut with an electric machine model DOM (Beckers Italy, Treviglio, Italy), whose knife and contact surfaces were previously deeply cleaned and finally washed with sterile distilled water. To study the effect of E-beam irradiation on the survival of *C. tyrobutyricum*, slices were contaminated as described above. Both, uncontaminated and contaminated slices were then vacuum-packaged to reach about 20 kPa in 20 × 20 cm laminated film bags of low gas permeability (diffusion coefficient of 35 cm³ 24 h⁻¹ m⁻² bar to oxygen and 150 cm³ 24 h⁻¹ m⁻² bar to carbon dioxide). Once the samples were vacuum-packaged, they were transported in insulated polystyrene boxes to the irradiation plant (Ionisos Iberica, S.A., Tarancón, Cuenca, Spain) and irradiated under an electron beam radiation source, which operates at 10 MeV. Experiments were done in triplicate and performed at room temperature (18–20 °C). The radiation doses employed were between 1 and 8 kGy for microbial analyses and 1, 2 and 3 kGy for physico-chemical, texture, colour and sensory evaluations, which were applied to slices packed either individually for microbiological studies or in 3–6 units of slices of the above mentioned size or in cylinder blocks (1.5 cm height and 2 cm base diameter) for physico-chemical and sensory analyses. The actual dose absorbed by samples was checked by determining the absorbance of cellulose triacetate dosimeters (ASTM, 2000) simultaneously irradiated with samples. The temperature increase during treatment was less than 2 °C. After irradiation treatment, samples were transferred to the laboratory and stored both at 4 °C and at the ripening temperature (14 °C) until use. Three irradiation treatments were carried out, at three different times, following the procedure described above.

2.4. Microbial analyses

To count the survivors, first, the slices were weighed, then, they were homogenised with 20 mL 0.85% NaCl (w/v) sterile saline solution in a sterile stomacher bag. Total viable counts (TVC) were determined by the pour-plate method using Plate Count Agar (PCA; Difco, Detroit, MI, USA) as culture medium. *C. tyrobutyricum* spores

were enumerated from the above homogenate after heating the sample at 80 °C for 10 min. To count clostridia, the culture used was RCM added to 1.8% of bacteriological agar No. 1 (LP0011; Oxoid) and the incubation was performed in anaerobiosis jars, using Anaer-oGen (AN0035; Oxoid) to generate anaerobic conditions. The anaerobic atmosphere was monitored with the anaerobic indicator BR0055B (Oxoid). Plates were incubated for 48 h at 37 °C and 32 °C for clostridium and TVC, respectively. Colonies were enumerated with a Digital S Colony counter (J.P. Selecta, Barcelona, Spain).

The growth curves were constructed according to the Baranyi model (Baranyi & Roberts, 1994) regardless the count observed in the first days of storage.

2.5. Physico-chemical analysis

The pH was determined in a homogenate of the sample with distilled water (1:10) (w/v), using a Crison Digit-501 pH meter (Crison Instruments LTD, Barcelona, Spain). Water activity (a_w) was measured using a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, WA, USA) at 25 °C. Moisture content (oven air-drying method) and ash (muffle furnace) were analysed following AOAC (1995). The protein (Kjeldahl nitrogen) and fat content of the cheese were determined using the methods of the AOAC (1995) and of Bligh and Dyer, described by Hanson and Olley (1963), respectively.

2.6. Texture profile analysis and colour measurements

The texture profile analysis (TPA) was performed (Bourne, 1978; Szczesniak, 1986). This analysis was carried out at about 22 °C, using a TA.XT2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with the Texture Expert programmes. For analysis, a cylindrical probe, P/25, was used. This procedure involved the preparation of four cheese cylinders of 1.5 cm in height and 2 cm in diameter from each sample. A double compression cycle test was performed with up to 50% compression of the original portion height with the probe. A time of 5 s was allowed to elapse between the two compression cycles. The following parameters were quantified (Herrero et al., 2007): hardness, springiness, adhesiveness and cohesiveness.

Colour measurements were performed using a tristimulus colorimeter (Minolta Chroma Meter CR300, Minolta Corporation, NJ) at three different analysis times (0, 8 and 21 days after irradiation and storage at 4 °C). The L^* (lightness), a^* (redness) and b^* (yellowness) parameters were measured ten times on the surface of the cheese slices at periods of 0, 4, 24 and 48 h after opening the vacuum-pack. After the first colour measurement (just after opening the bags), samples were kept at room temperature without protection, i.e., exposed to the ambient air and in the dark. Environmental conditions were 20–24 °C and about 43% relative humidity.

2.7. Sensory analysis

To determine the possible sensory differences among the non-treated (0 kGy) and irradiated samples (1, 2 and 3 kGy), a triangular, a rank order and a descriptive test were performed. Samples were evaluated by a panel of twenty tasters (ten females and ten males) selected from the members of the Department of Nutrition, Food Science and Technology of the Complutense University of Madrid. The panellists were previously trained in the sensory assessment of dairy products. During the training, reference models (rotten egg, bloody, fishy, barbecued corn, burnt, sulphur, metallic, wet dog, alcohol or acetic acid, hot culture medium, scalded feather, pungent pepper, spoiled milk) were prepared in order to familiarise the

testers with the expected flavours resulting from E-beam treatment. The evaluation was carried out between meals (after breakfast and before the midday meal).

Before opening the vacuum-bag, the samples were left out to temperate for 20 min at room temperature. The triangle test (ISO, 1981) was performed following the procedure described by Soto et al. (2008). All the possible combinations of untreated and irradiated samples were tested. These sensory analyses were carried out during the 0 and the 1st day after treatment, the 12th and 13th and 26th and 27th day of storage at 4 °C.

During the rank order test, the judges were instructed to rank samples in order of preference, according to the proximity of the sensory characteristic (appearance, odour and flavour) of the sample analysed to the optimal sensory quality of the cheese slices.

The rank order test was carried out according to Soto et al. (2008). This test was performed on 2nd, 14th and 28th days after samples treatment and storage at 4 °C.

Panellists were also asked to give information about the cheese slice characteristics (appearance, odour and flavour and any off-sensory aspect) following a profile descriptive analysis as well as about the acceptance for consumption (acceptable without modifications, acceptable with minor modifications and rejected or not adequate for consumption). This procedure was carried out on the 3rd, 15th and 29th day after irradiation treatment and storage at 4 °C.

2.8. Statistical analysis

The coefficient of determination (R^2) of curves and the 95% confidence limits (CL) of D values were calculated by Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA). For physical and chemical data analysis, a one-way analysis of variance and a Duncan's procedure for multiple mean comparisons were carried out using a Statgraphics Plus version 5.0 for Windows (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA). To describe the effects of the irradiation treatment and storage time on colour parameters and sensory results, the response surface methodology was used.

The results of the triangular test were analysed according to the tables of the minimum number of panellists with correct answers in order to establish the significant level (Pedredo & Pangborn, 1989).

The significant level of data obtained in the rank order test was determined by Friedman's rank addition according to the model proposed by Joanes (1985) and the tables for multiple comparison procedures for analysis of ranked data (Christensen, Ogden, Dunn, & Eggett, 2006).

3. Results and discussion

3.1. Microbiological analyses

The survival curve of *C. tyrobutyricum* is shown in Fig. 1. The count of non-irradiated samples was lower than that which was determined at 1 kGy. This phenomenon is very common in heat treatment experiments (Stumbo, 1973), which has been explained to be caused by an activation of spores during heating where the number of spores activated exceeds those that are killed. In the present case, the same situation could have occurred. Therefore, the regression equation was calculated avoiding the point of non-irradiated samples on the abscise axis (Fig. 1). As expected, the rate of clostridia death by radiation was fitted to a first-order inactivation reaction, according to the equation:

$$y = -0.5645x + 7.3171 \quad (R^2 = 0.98) \quad (1)$$

where,

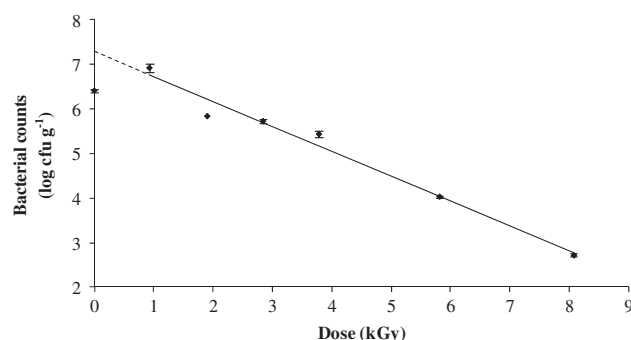


Fig. 1. Survival curve of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese slices subjected to E-beam radiation.

y is the logarithm of colony forming units (cfu) g^{-1}

and

x is the irradiation dose (kGy).

From this equation, a decimal reduction value (D value) of 1.77 kGy was determined, which predicts that, for example, a 3 kGy treatment will cause a 96% reduction of spores originally present, i.e., it will reduce spoilage by nearly a hundred-fold.

Anaerobic spores, particularly those of *C. tyrobutyricum* are present in soil, bovine faeces and silage (Donnelly & Busta, 1981; Read, Bradshaw, & Francis, 1970; Vries & Stadhouders, 1977); it is from these sources that spores reach the raw milk. The common raw milk spore content is variable depending on sanitation measures, which are very adequate to control spore contamination (Su & Ingham, 2000). In France, payment of milk depending on spore counts was formerly proposed (Henry, 1977), stating a load of 780 spores L^{-1} as a satisfactory level for anaerobic spores in raw milk. Donnelly and Busta (1981) inferred that milk could contain no more than 1 anaerobic spore mL^{-1} . Later, in a survey performed in 1997 (Ingham, Hassler, Tsai, & Ingham, 1998), fourteen samples of pasteurised milk from eight Gouda cheese plants were analysed. A concentration of endospores of lactate-fermenting, gas-producing *Clostridium* spp. ranged from 5.0×10^{-2} to 1.7×10^0 spores mL^{-1} , with an average load of 0.36 spores mL^{-1} ; this is similar to data reported by Coulon, Varignier, and Darne (1991) in France; Vissers, Driehuis, Te Giffel, De Jong, and Lankveld (2007) following a year-long survey of 24 dairy farms; and one half of those reported by Henry (1977). Klijn, Nieuwenhof, Hoolwerf, Van Der Waals, and Weerkamp (1995) recommended that milk used for manufacturing Gouda cheese should contain less than one *C. tyrobutyricum* spore per 10 mL. Assuming that 10 L (with an agreement of a contamination of 3600 spores as indicated by Ingham et al., 1998) of milk yields a fresh cheese of 1 kg and that all of the spores present in milk are retained in the curd, the cheese would contain 3.6 spores g^{-1} . This should result in late blowing since it has been reported that 1 spore g^{-1} is enough to produce the defect (0.1 spore mL^{-1} of milk according to Klijn et al., 1995). From the experiments carried out by Klijn et al. (1995) and Ingham et al. (1998), there is an estimated doubling time for *C. tyrobutyricum* of about 5–7 days at 13 °C. Assuming that spoilage occurs when the *C. tyrobutyricum* load is at 10^7 cfu g^{-1} of cheese, the defect would appear after about 21.4 generations, i.e., after about 129 days. However, the application of E-beam reduces the spore load by two log units. Thus, the original bacterial concentration would be 0.036 spores g^{-1} and, in this case, 28 generations would be required to reach the critical load. Accordingly, it would produce an important shelf-life extension (about 168 days). In addition, it is likely that the surviving bacteria

need to repair damage caused by treatment with E-beam, thus leading to a further extension of the either a lag phase or a doubling time, as has been observed in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* (Cabeza et al., 2010). Therefore, results obtained in the present study indicate that E-beam treatment (at a low dose) could be considered an alternative strategy to reduce, or at least prolong the initiation of late blowing cheese and thus increase its shelf life. This treatment could be included as a hurdle in the design of an effective combined process with current methods (such as lysozyme addition and bacterofugation) to prevent the growth of *C. tyrobutyricum* spores.

In the dairy industry, several general measures may be applied to control the growth of anaerobic spores, (Donnelly & Busta, 1981; Ingham et al., 1998): avoiding the contamination of raw milk, which may be controlled with sanitation measures (Donnelly & Busta, 1981), feeding cows with silage with very low spore content (Vissers et al., 2007), storing at refrigeration conditions, keeping low pH (<4.6), reducing a_w (<0.93), adding preservative (e.g., lysozyme, nisine and nitrites), inactivation (usually heat), and removing spores (e.g., bacterofugation). Most of these control measures are not easily applicable in the cheese industry. The removal of bacterial cells and spores from raw milk by bacterofugation at approximately $9000 \times g$ is used as one means of reducing the number of anaerobic spores in milk. This method may remove 75–99% of spores (Kosikowski & Mistry, 1997; Waes & Van Heddeghem, 1990). The late blowing defect can also be avoided by preventing the germination of clostridia spores during ripening. An increase in salt concentration has been used for this purpose (Kleter, Lammers, & Vos, 1984). However, this approach can hardly be used because of the current tendency to reduce the sodium content of processed foods. Refrigeration is perhaps, the best solution to avoid the growth of anaerobic sporeforming bacteria. This technology is consistently applied for storage of ready-to-eat (RTE) processed cheese (e.g., slices, dices) achieving a very long shelf life. It has been reported that *C. tyrobutyricum* germinate at 13 °C in Gouda cheese slurry (Su & Ingham, 2000). Therefore, this approach can not be employed for semi-hard and hard cheese since they have to be ripened during a long time (more than 2–3 months) at a higher temperature (usually 13–15 °C) to attain the characterised sensory quality of each cheese variety. During this time, the anaerobic spores are slowly growing, which may lead to the late blowing spoilage.

To control the growth of the clostridia responsible for the late blowing of cheese by E-beam irradiation, the raw milk or cheese need to be treated at different times of ripening. Therefore, to explore the effect of the irradiation treatment in the ripening process, the behaviour of the natural microbiota of the cheese after the irradiation was studied (Fig. 2). Since the non-sporeforming microbiota present in the cheese, mainly lactic acid bacteria (LAB), are much more radiosensitive than spores, in the present experiment an E-beam treatment reduced the mesophilic aerobic counts from $7.68 \log \text{cfu g}^{-1}$ in non-treated samples to $6.30 \log \text{cfu g}^{-1}$, $4.72 \log \text{cfu g}^{-1}$ and $3.14 \log \text{cfu g}^{-1}$ after the application of 1, 2 and 3 kGy, respectively (Fig. 2).

From these data, a D value of about 0.66 kGy may be estimated. This value is somewhat higher than for other non-sporeforming bacteria and borders on the levels of *S. aureus* (Grant & Patterson, 1992; Thayer & Boyd, 1992) and *L. monocytogenes* (Cabeza, Cambero, de la Hoz, & Ordóñez, 2007; Mendonca, Romero, Lihono, Nannapaneni, & Jonson, 2004), which are considered, among the pathogens, to be the most radio-resistant organisms. However, these results are close to those reported by other authors for LAB in meat, since a treatment of 2.5 kGy produced only a 3.4 log reduction while more than five reductions were observed for other bacteria such as pseudomonads, Enterobacteriaceae or

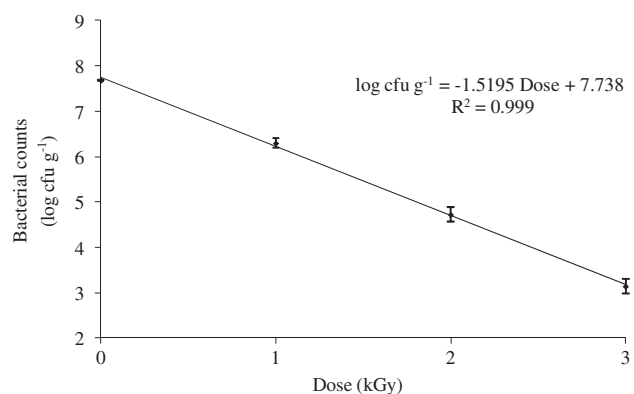


Fig. 2. Survival curve of non-sporeforming microbiota of cheese slices subjected to E-beam radiation.

Brochothrix thermosphacta (Niemand, Van der Linde, & Holzapfel, 1983). Additionally, it must be taken into account that cheese always presents a mixed microbiota and the radioresistance of bacteria may be variable.

In the early days of storage at 14 °C (about a month in samples maintained at 4 °C), a further decline was observed in the number of bacteria to be recovered afterwards (Fig. 3, dotted lines). This phenomenon had already been previously noticed in experiments with *S. aureus* and *L. monocytogenes* (Cabeza et al., 2010). These authors explained the situation was due to the DNA damage caused by the radiation, the resuscitation being dependent on the ability of bacteria to repair the DNA damages. After this phase, the growth of microbiota may be considered to be normal although it happens at a lower rate. Furthermore, at both storage temperatures, the greater the dose, the higher the generation times (g value), which is in agreement with previous literature (Cabeza et al., 2010). From curves in Fig. 3, g values of 66, 92 and 102 h may be calculated at 4 °C when 1, 2 and 3 kGy were respectively applied. The same parameters after storage at 14 °C were 18, 22, and 25 h. The differences in the g values between 4 and 14 °C conditioned the time that lactic microbiota took to reach the normal levels (around 10^7cfu g^{-1}). So, it was necessary 10 and 12 days at 14 °C when the doses applied were 1 kGy and 2 kGy, respectively, but at 4 °C, the microbiota needed 40 and 50 days, respectively. When treatment was 3 kGy microbiota grew much more slowly thus after 100 days at 4 °C, the 10^7cfu g^{-1} level was not yet attained. Obviously, this is due to a more severe damage of bacteria, which is not able to be repaired.

3.2. General physico-chemical characteristics, texture and colour evaluation

Physico-chemical parameters (moisture, protein, fat, ash, a_w and pH) of cheese samples, both non-irradiated and irradiated (1, 2 and 3 kGy), were measured immediately following irradiation and also three weeks later (storage at 4 °C). No statistically significant difference ($P > 0.05$) was observed among the irradiated and non-irradiated samples, for all the parameters measured. The chemical composition (% on wet matter) of cheese was: moisture 44.68 ± 0.54 , protein 27.89 ± 0.38 , fat 23.24 ± 3.02 and ash 1.83 ± 0.01 . The a_w and pH were, respectively, 0.958 ± 0.005 and 5.86 ± 0.13 . Several authors (Konteles et al., 2009; Tsiotsias et al., 2002) reported similar findings for different types of cheese exposed to irradiation at low doses. The preservation of the typical physico-chemical characteristics of the irradiated cheese is considered favourable, since these are closely related to the sensory profile of cheese (Konteles et al., 2009).

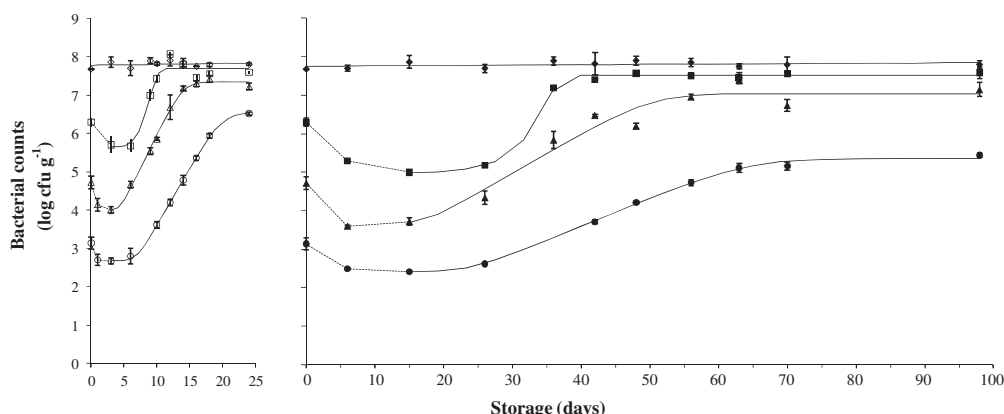


Fig. 3. Total viable counts of control (◆, ◇) and irradiated cheese slices at 1 (■, □), 2 (▲, △) and 3 kGy (●, ○) stored at 4 °C (closed symbols, right hand panel) and 14 °C (open symbols, left hand panel).

In the TPA analysis, irradiated and untreated samples showed similar values for adhesiveness (about -0.96 ± 0.35 Ns) and springiness (around 0.006 ± 0.0005 cm). However, a significant ($P < 0.05$) decrease of hardness was observed ranging from 40.42 ± 4.42 to 23.40 ± 5.15 N for samples treated at 0 and 3 kGy. This was associated with an increase of the cohesiveness (around 0.68 ± 0.03 and 0.73 ± 0.02 for samples irradiated at 0 and 3 kGy, respectively) at doses ≥ 2 kGy (Fig. 4). The texture differences between irradiated and untreated samples were maintained at different storage times with a similar intensity. These results could be due to the effect of irradiation on the ultrastructure of cheese. A feasible explanation can be the possibility of the aggregation of protein causing changes of the milk gel rheological behaviour. A similar effect has been reported in several irradiated foods, a case in point is soybean protein (El-Moneim, Afify, & Shousha, 1988). It is also possible that irradiation cause disruption of protein and distortion in the ultrastructure gel of cheese. Radiolysis of proteins mainly induces a fragmentation and/or aggregation of the protein and an inactivation of the enzyme, according to Audette-Stuart, Houee-Levin, and Potier (2005). Other authors (Konteles et al., 2009) have reported no effect on the texture of feta cheese type due to irradiation probably because these cheeses have a firmer texture, as well as a different structure and chemical composition.

The L^* , a^* and b^* values of cheese slices were determined on product surface a few minutes (considered as 0 h), 4, 24 and 48 h after opening the vacuum-package and consequently exposure to air. A clear influence ($P < 0.05$) of the irradiation dose (0, 1, 2 and 3 kGy) was observed for the a^* and b^* values. The irradiation treatment produced a significant ($P < 0.05$) increase of the a^* value, following the order: -2.17 ± 0.21 , -1.96 ± 0.06 , -1.90 ± 0.10 and -1.64 ± 0.06 for 0, 1, 2 and 3 kGy, respectively at 0 days. In addition, a significant ($P < 0.05$) effect of the storage time at 4 °C was also observed in all samples (irradiated and untreated), consisting of a decrease in a^* values. This effect increased the differences between untreated and irradiated samples at 21 days of storage at 4 °C (just after opening vacuum-package, the a^* values varied between -3.23 ± 0.32 for 0 kGy and -2.01 ± 0.10 for irradiated samples at 3 kGy). For a better understanding of these relations, the estimated response surface for the a^* value (just after opening vacuum-package) using the dose (kGy) of irradiation treatment and the storage time (day) at 4 °C is shown in Fig. 5. The regression equation ($P < 0.0001$) obtained was:

$$a^* = -2.24 + 0.23(\text{dose}) - 0.11(\text{storage time}) - 0.03(\text{dose})^2 + 0.003(\text{storage time})^2 + 0.016(\text{dose})(\text{storage time}). \quad (2)$$

In general, it is possible to assume that, at the same storage time, the higher the irradiation dose the greater the a^* value. This behaviour was intensified when samples were exposed to air because the a^* value of irradiated samples above 1 kGy decreased ($P < 0.05$) with increase in time since opening of the vacuum-package (for example, the a^* values for the irradiated samples at 3 kGy varied from -1.6 to -2.1 just after opening the vacuum-package and from -3.2 to -3.0 after 48 h of exposure to air).

Irradiation treatment also produced a significant ($P < 0.05$) decrease of the b^* value, which varied (just after opening vacuum-package) from a maximum of 18.70 ± 0.33 in untreated samples to a minimum of about 14.58 ± 0.36 for samples irradiated at 3 kGy. Fig. 5 shows that b^* value was affected by doses of irradiation treatment and time of storage at 4 °C. The regression equation was:

$$b^* = 18.68 - 2.12(\text{dose}) - 0.08(\text{storage time}) + 0.25(\text{dose})^2 + 0.004(\text{storage time})^2 - 0.009(\text{dose})(\text{storage time}). \quad (3)$$

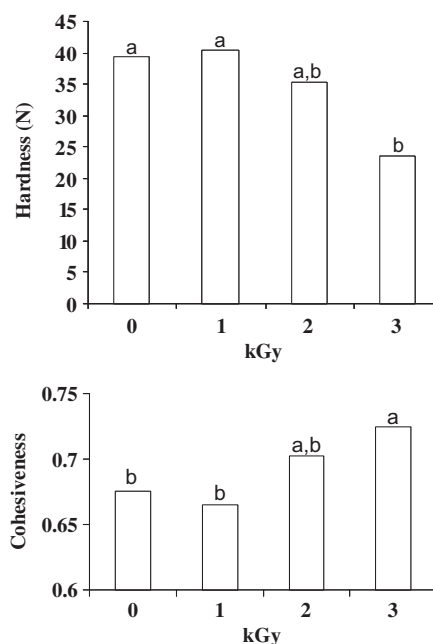


Fig. 4. Effect of radiation treatment (kGy) on the hardness and cohesiveness of the vacuum-packaged cheese slices; columns with a different letters are significantly different ($P < 0.05$).

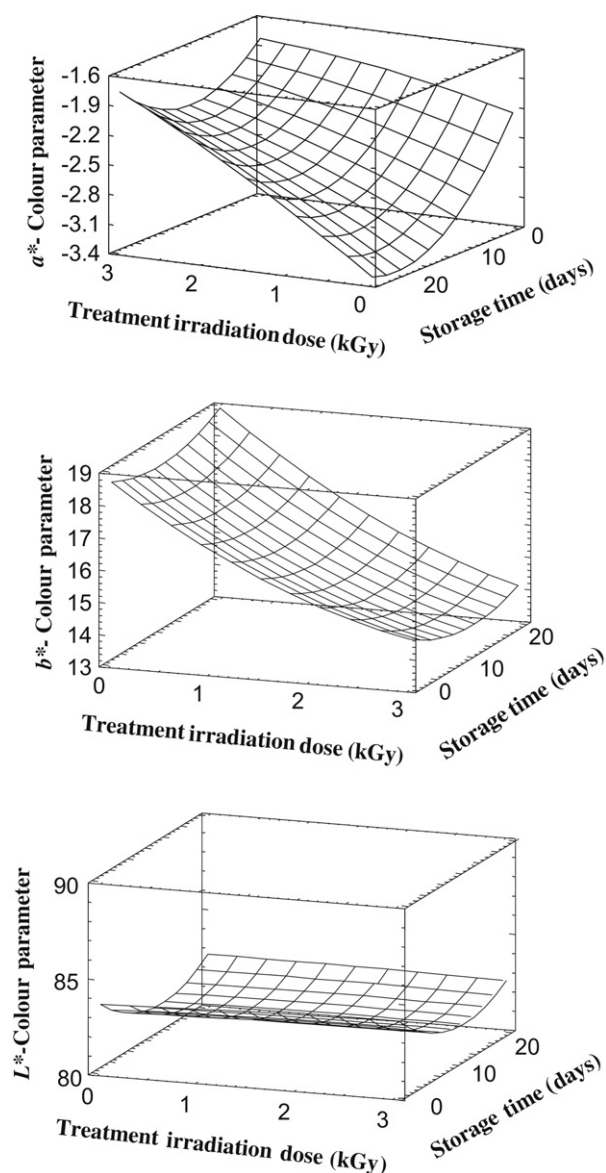


Fig. 5. Response surface plots showing the effect of irradiation treatment (kGy) and the storage time (days) at 4 °C on the colour parameters (a^* , redness; b^* , yellowness; L^* , lightness) of the vacuum-packaged cheese slices.

As observed in Fig. 5, the effect of irradiation treatment on the b^* value parameter was maintained at different storage times with a similar intensity. This colour parameter remained statistically unchanged ($P > 0.05$) after opening the vacuum-package and consequent exposure to air (from 0 to 48 h).

These results may be correlated with the colour changes observed by other authors (Seisa et al., 2004; Tsiotsias et al., 2002) in different types of cheese after irradiation. Irradiation (particularly at 4.7 kGy) increased redness (a^* value) and decreased yellowness (b^* value) of Feta (Konteles et al., 2009) and Cheddar (Seisa et al., 2004).

No effects ($P > 0.05$) of irradiation dose and storage time were observed on the L^* parameter of the product just after opening the package; average values were of 83.5 ± 1.45 just after opening vacuum-package. The L^* value decreased ($P < 0.05$) after exposure to air of the irradiated and untreated samples, with minimum values of around 80.0 at 48 h after opening the vacuum-package. This decrease may be due to surface water loss associated with exposure to air.

Different results have been reported for irradiated cheese for lightness (L^* value). A decrease of this colour parameter has been described in irradiated Feta cheese (Konteles et al., 2009) while irradiated “Anthotyros” was described as brighter (Tsiotsias et al., 2002). These differences are probably related to fat and moisture contents and characteristic structure of the cheese variety.

3.3. Sensory analysis

As a general statement, samples subjected to E-beam maintained their sensory quality: they were acceptable for consumption, even those treated with a dose of 3 kGy. Nevertheless, when treated (at 1, 2 and 3 kGy) and non-irradiated samples (control) were compared, some changes were observed (Table 1). Significant differences ($P < 0.05$) for appearance among control (non-irradiated) and irradiated samples were found in the triangular analysis carried out after treatment (0–1st day) and during the second (12–13th days) and third week (26–27th days) of storage at 4 °C (Table 1). In the visual aspect, the descriptive analysis detected slight colour changes. The samples treated with 2 and 3 kGy were judged to be lighter, less yellow and white-grey. These sensory results are in agreement with those obtained by the instrumental colour analysis mentioned above, since a progressive decrease of yellowness (b^* values) was observed as the intensity of the irradiation treatment increased. This could be related with a decrease of carotenoid pigments by the radiation, which results in a bleaching of irradiated samples. Similar finding have been reported for different irradiated foods (Herrero, Ordóñez, Carmona, de la Hoz, & Cambero, 2009; Konteles et al., 2009). There is evidence (Bosset & Flückiger, 1989) that yogurts exposed to light were redder and less yellow than yogurts stored in darkness and this was correlated with the degradation of riboflavin and β -carotene. An increase in redness and a decrease in yellowness have also been reported for light oxidised cheeses and other dairy products (Juric, Bertelsen, Mortensen, & Petersen, 2003; Kristensen, Orlien, Mortensen, Brockhoff, & Skibsted, 2000; Mortensen, Bertelsen, Mortensen, & Stapelfeldt, 2004).

The slight appearance changes did not affect ($P > 0.05$) the order of preference of the samples, and similar results for untreated and irradiated cheese were obtained in the rank order test (Fig. 6). This was probably because commercial cheeses made from pasteurised cow's milk presents a wide variety of colours. Some panellists considered the cheese that was lighter in appearance to be better or have a sharper taste.

In the odour triangular analysis, significant differences ($P < 0.05$) were found after two weeks of storage at 4 °C among the samples radiated at doses ≥ 2 kGy and the untreated ones (Table 1). However, a significant ($P < 0.05$) decrease in the odour preference of the samples was only observed for a dose of 3 kGy after three weeks of storage at 4 °C (Fig. 6). In irradiated samples, the panellists

Table 1
Sensory characteristics of untreated and irradiated cheese slices that showed significant differences ($P < 0.05$) in the triangular test.^a

Dose (kGy)	0	1	2	3
0				
1		A _{1,2,3}		
2			A _{1,2,3} ; O _{2,3}	
3				A _{1,2,3} ; O _{1,2,3} ; F _{1,2,3}

^a A, O, F indicate significant differences ($P < 0.05$) for appearance, odour and flavour respectively, while the subscript numbers 1, 2, 3 indicate that the triangle tests were carried out on the first day after treatment (0–1st days), during the second (12–13th days) and third week (26–27th days) of storage at 4 °C, respectively.

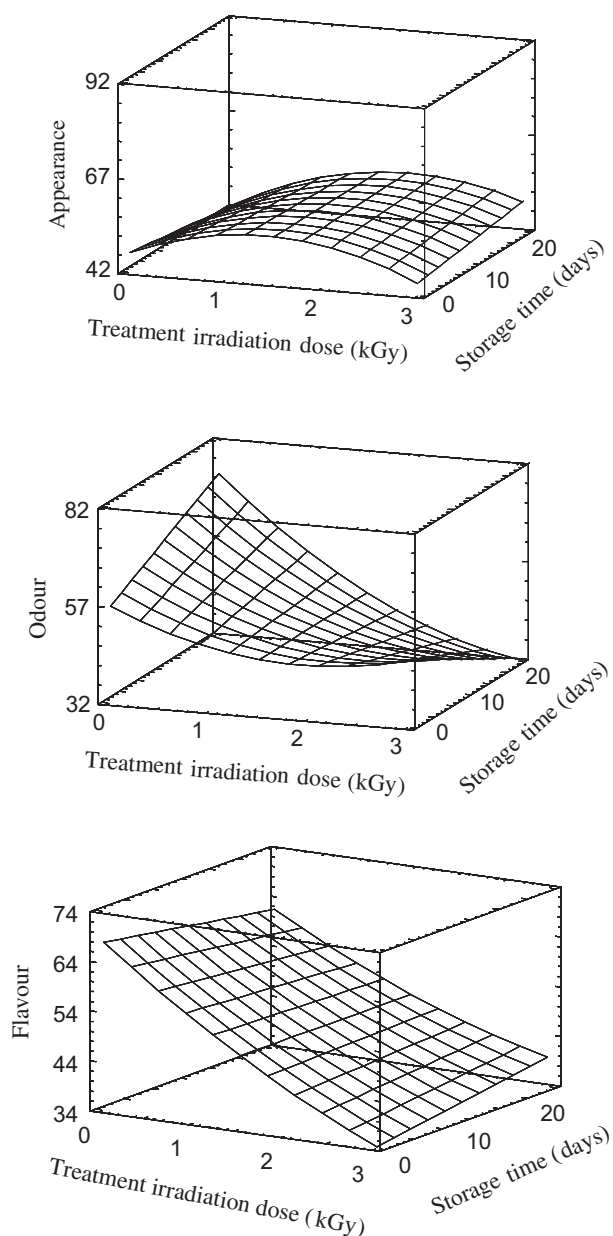


Fig. 6. Response surface plots showing the effect of irradiation treatment (kGy) and the storage time at 4 °C (days) on the preference sensory evaluation of the vacuum-packaged irradiated cheese slices. For appearance, odour and flavour the sum of ranks = $[(N1 \times 1) + (N2 \times 2) + (N3 \times 3) + (N4 \times 4)]$ where N1, N2, N3 or N4 are the number of panellists that ranked the sample in the position 1 (minimum preference), 2, 3 or 4 (maximum preference), respectively, in the rank order test. Critical values of the difference between rank sums ($P < 0.01$) for 20 panellists and 4 samples is 25 (according to Christensen et al., 2006).

described less odour intensity to milk and cream and off-odours defined as rancid and burnt (very slight at 2 and weak at 3 kGy). These results may be related to the changes in the volatile profile of radiated milk fat. Several authors (Khatri, Libbey, & Day, 1966; Merritt, Forss, Angelini, & Bazinet, 1967) have reported that irradiation can induce the formation of n-alkanes, oxidised butteroil, saturated hydrocarbons, fatty acids, and lactones.

For flavour, significant differences ($P < 0.05$) among non-irradiated and irradiated were found only in the 3 kGy samples (Table 1) in the triangle analysis carried out after different storage times at 4 °C. In the irradiated samples at doses ≥ 2 kGy negligible (at 2 kGy) and weak (at 3 kGy) off-flavours were detected. These

off-flavours were defined as bitter, pungent, metallic, rancid and burned. The off-flavours were minimised during storage. A significant ($P < 0.05$) lower preference for flavour evaluation was only observed at 3 kGy during the first and second week of storage at 4 °C (Fig. 6), which shows that once the threshold of 2 kGy is exceeded, the irradiation negatively affects the flavour acceptance or preference. However, after three weeks, lower differences were observed among irradiated and non-treated samples (Fig. 6), probably due to the decrease of the off-flavour intensity. These samples, however, were always described as adequate for consumption considering the off-flavour as a minor sensory change. These results are in agreement with those obtained by several authors for different types of cheese. Off-flavour development and colour changes have also been detected at greater dose than 1.5 kGy when applied to Turkish Kashar cheese (Yüceer & Gündüz, 1980). Similar findings have been reported for Cheddar (Bongirwar & Kumta, 1967) and Mozzarella cheese (Hashisaka et al., 1990). However, no taste differences were found between irradiated (3.2 kGy) and non-irradiated Gouda (Rosenthal, Martinot, Lindner, Juven, & Ben-Hur, 1983). Feta cheese contained off-flavour when was exposed to 4.7 kGy (Konteles et al., 2009). The non-permanent intensity in the off-flavour of the irradiated cheese (such as Feta, Anthotyros and Ras cheese) has also been reported by several authors (Abd El Baky, Farahat, Rabie, & Mobasher, 1986; Konteles et al., 2009; Tsiotsias et al., 2002) and its dissipation a few weeks later (Buttery, Guadagni, & Ling, 1973; Kochhar, 1996; Lee & Ahn, 2003; Nawar, 1985). These authors suggest that the off-flavour is especially sensory detectable during the first days following irradiation because the secondary oxidation products are volatile. However, in the weeks following the treatment, the oxidation phenomena continue, even under cool storage, but the secondary oxidation products are polymerised or isomerised. As a result, there are less volatile compounds or ones that have a lower sensorial threshold. Consequently, the cheese off-flavour is dissipated.

4. Conclusions

In summary, an alternative strategy is proposed for reducing the anaerobic spore load of cheese to diminish the late blowing of cheese. The E-beam irradiation at a dose of 3 kGy gave rise to a 96% reduction of the *C. tyrobutyricum* spores. This irradiation dose produced a weak off-odour and off-flavour, although the samples were considered by testers to be acceptable for consumption. A reduction in the spoilage of nearly 99% that does not adversely affecting the sensory properties is considered to be a very favourable benefit from a commercial point of view.

Acknowledgements

The present work has been supported by the Projects AGL2007-65235-CO2-02 and TEMINYSA (S-0505/AGR-0314)/Group 920276 of the Comunidad de Madrid/Complutense University of Madrid.

References

- Abd El Baky, A. A., Farahat, S. M., Rabie, A. M., & Mobasher, S. A. (1986). The manufacture of Ras cheese from gamma irradiated milk. *Food Chemistry*, 20, 201–212.
- AOAC. (1995). *Official methods of analysis* (16th ed.). Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- ASTM. (2000). *E1650–97e1 standard practice for use of cellulose acetate dosimetry systems, Vol. 12.02*. USA: American Society for Testing and Materials.
- Audette-Stuart, M., Houee-Levin, C., & Potier, M. (2005). Radiation-induced protein fragmentation and inactivation in liquid and solid aqueous solutions. Role of OH and electrons. *Radiation Physics and Chemistry*, 72, 301–306.

- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277–294.
- Barba, C., Calvo, M. M., Herraiz, M., & Santa-María, G. (2009). Detection of radiolytic hydrocarbons by supercritical fluid extraction and gas chromatographic–mass spectrometric analysis of irradiated cheese. *Food Chemistry*, 114, 1517–1522.
- Blank, G., & Cumming, R. (2001). Irradiation. In N. A. M. Eskin, & D. S. Robinson (Eds.), *Food shelf life stability. Chemical, biochemical and microbiological changes* (pp. 87–128). Boca Raton, FL, USA: CRC Press LLC.
- Blank, G., Shamsuzzaman, K., & Sohal, S. (1992). Use of electron beam irradiation for mold decontamination on Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 75, 13–18.
- Boisseau, P. (1994). Irradiation and the food industry in France. *Food Technology*, 48, 138–140.
- Bongirwar, D. R., & Kumta, U. S. (1967). Preservation of cheese with combined use of gamma-rays and sorbic acid. *International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, 18, 133–134.
- Bosset, J. O., & Flückiger, E. (1989). Packaging and maintenance of food quality: effect on photosensitivity of different types of yogurt. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 22, 292–300.
- Bougle, D., & Stahl, V. (1993). Eradication de bacteries pathogenes (*Listeria monocytogenes* et *Salmonella*) de Camemberts au lait cru par rayonnements ionisants *Cost–benefits aspects of food irradiation processing*. In *Proceeding series*. Vienna, Austria: IAEA. (pp. 103–111).
- Bourne, M. C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*, 32, 62–72.
- Buttery, R. C., Guadagni, D. G., & Ling, L. C. (1973). Flavor compounds: volatilities in vegetable oil and oil water mixture. Estimation of odor thresholds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21, 198–201.
- Cabeza, M. C., Cambero, M. I., de la Hoz, L., & Ordóñez, J. A. (2007). Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 299–305.
- Cabeza, M. C., Cambero, M. I., Núñez, M., Medina, M., de la Hoz, L., & Ordóñez, J. A. (2010). Lack of growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in temperature abuse of E-beam treated ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Food Microbiology*, 27, 777–782.
- Christensen, Z. T., Ogden, L. V., Dunn, M. L., & Eggett, D. L. (2006). Multiple comparison procedures for analysis of ranked data. *Journal of Food Science*, 71, 132–143.
- Coulon, J. B., Varignier, M., & Darne, D. (1991). Contamination butyrique du lait de vache: étude dans les exploitations de Haute-Loire. *Production Animale*, 4, 369–372.
- Donnelly, L. S., & Busta, F. F. (1981). Anaerobic sporeforming microorganisms in dairy products. *Journal of Dairy Science*, 64, 161–166.
- El-Moneim, A., Afify, M. R., & Shousha, M. A. (1988). Effect of low-dose irradiation on soybean protein solubility, trypsin inhibitor activity, and protein patterns separated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 810–813.
- Grant, I. R., & Patterson, M. F. (1992). Sensitivity of foodborne pathogens to irradiation in the components of a chilled ready meal. *Food Microbiology*, 9, 95–103.
- Hanson, S. W. F., & Olley, J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemical Journal*, 89, 101–102.
- Hashisaka, A. E., Einstein, M. A., Rasco, B. A., Hungate, F. P., & Dong, F. M. (1990). Sensory analysis of dairy products irradiated with cobalt-60 at –78 °C. *Journal of Food Science*, 55, 404–408.
- Hashisaka, A. E., Weagant, S. D., & Dong, F. M. (1989). Survival of *L. monocytogenes* in mozzarella cheese and ice cream exposed to gamma irradiation. *Journal of Food Protection*, 52, 490–492.
- Henry, A. (1977). Factors influencing contamination of milk by butyric acid bacteria spores. *Revue Laitière Française*, 350, 81–83.
- Herrero, A. M., Ordóñez, J. A., Carmona, P., de la Hoz, L., & Cambero, M. I. (2009). Raman spectroscopy studies of electron-beam irradiated cold-smoked salmon. *Food Research International*, 42, 216–220.
- Herrero, A. M., Ordóñez, J. A., Romero de Avila, M. D., Herranz, B., Hoz, L., & Cambero, M. I. (2007). Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 77, 331–338.
- Ingham, S. C., Hassler, J. R., Tsai, Y.-W., & Ingham, B. H. (1998). Differentiation of lactate-fermenting, gas-producing *Clostridium* spp. isolated from milk. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 173–183.
- ISO. (1981). *Methodologie essai triangulaire*. ISO TC 34/SC 12. Genève, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Joanes, D. N. (1985). On a rank sum test due to Kramer. *Journal of Food Science*, 50, 1442–1444.
- Juric, M., Bertelsen, G., Mortensen, G., & Petersen, M. A. (2003). Light induced colour and aroma changes in sliced modified atmosphere packaged semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, 13, 239–249.
- Khatri, L. L., Libbey, L. M., & Day, E. A. (1966). Gas chromatographic and mass spectral identification of some volatile components of gamma-irradiated milk fat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14, 465–469.
- Kleter, G., Lammers, W. L., & Vos, E. A. (1984). The influence of pH and concentration of lactic acid and NaCl on the growth of *Clostridium tyrobutyricum* in whey and cheese. 2. Experiments in cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 38, 31–41.
- Klijn, N., Nieuwenhof, F. F. J., Hoolwerf, J. D., Van Der Waals, C. B., & Weerkamp, A. H. (1995). Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2919–2924.
- Kochhar, S. P. (1996). Oxidation pathways to the formation of off-flavours. In M. J. Saxby (Ed.), *Food taints and off-flavours* (2nd ed.). (pp. 168–225) London, UK: Blackie Academic & Professional.
- Konteles, S., Sinanoglou, V. J., Batrinou, A., & Sflomos, K. (2009). Effects of γ -irradiation on *Listeria monocytogenes* population, colour, texture and sensory properties of Feta cheese during cold storage. *Food Microbiology*, 26, 157–165.
- Kosikowski, F. V., & Mistry, V. V. (1997). *Cheese and fermented milk foods* (3rd. ed.). Westport, CT: F.V. Kosikowski, LLC.
- Kristensen, D., Orlien, V., Mortensen, G., Brockhoff, P., & Skibsted, L. H. (2000). Light induced oxidation in sliced Havarti cheese packaged in modified atmosphere. *International Dairy Journal*, 10, 95–103.
- Kung, H., Gaden, E., & King, C. (1953). Vitamins and enzymes in milk, effect of gamma-radiation on activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1, 142–144.
- Lalaguna, F. (2003). Physicochemical response of Palmita-type cheese to low-dose irradiation. *Journal of Food Science*, 68, 26–30.
- Lee, E. J., & Ahn, D. U. (2003). Production of volatiles from fatty acids and oils by irradiation. *Journal of Food Science*, 68, 70–75.
- Mendonça, A. F., Romero, M. G., Lihono, M. A., Nannapaneni, R., & Jonson, M. G. (2004). Radiation resistance and virulence of *Listeria monocytogenes* Scott A following starvation in physiological saline. *Journal of Food Protection*, 67, 470–474.
- Merritt, C. Jr., Forss, D. A., Angelini, P., & Bazinet, M. L. (1967). Volatile compounds produced by irradiation of butterfat. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 44, 144–146.
- Mortensen, G., Bertelsen, G., Mortensen, B., & Stapelfeldt, H. (2004). Light-induced changes in packaged cheeses – a review. *International Dairy Journal*, 14, 85–102.
- Nawar, W. W. (1985). Lipids. In O. R. Fennema (Ed.), *Food chemistry* (2nd ed.). (pp. 139–244) New York, NY, USA: Marcel Dekker.
- Niemand, J. G., Van der Linde, H. J., & Holzapfel, W. H. (1983). Shelf-life extension of minced beef through combined treatment involving radiation. *Journal of Food Protection*, 46, 791–796.
- Pedredo, F. D. L., & Pangborn, R. M. (1989). *Evaluación sensorial de los alimentos: métodos analíticos* (pp. 231–232). México: Alhambra Mexicana.
- Read, R. B., Jr., Bradshaw, J. G., & Francis, D. W. (1970). Growth and toxin production of *Clostridium botulinum* type E in milk. *Journal of Dairy Science*, 53, 1183–1186.
- Rosenthal, I., Martinot, M., Lindner, P., Juven, J., & Ben-Hur, E. (1983). A study of ionizing radiation of dairy products. *Milchwissenschaft*, 38, 467–470.
- Seisa, D., Osthoff, G., Hugo, C., Hugo, A., Bothma, C., & Van der Merwe, J. (2004). The effect of low-dose gamma irradiation and temperature on the microbiological and chemical changes during ripening of cheddar cheese. *Radiation Physics and Chemistry*, 69, 419–431.
- Soto, E., Hoz, L., Ordóñez, J. A., Hierro, E., Herranz, B., López-Bote, C., et al. (2008). Impact of feeding and rearing systems of Iberian pigs on volatile profile and sensory characteristics of dry-cured loin. *Meat Science*, 79, 666–676.
- Steffen, C., Flueckiger, E., Bosset, J. O., & Ruegg, M. (1987). Swiss – type varieties. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology – Major cheese groups, Vol. 2* (pp. 93–120). London, UK: Elsevier Applied Science.
- Stumbo, C. R. (1973). *Thermobacteriology in food processing*. London, UK: Academic Press.
- Su, Y.-C., & Ingham, S. C. (2000). Influence of milk centrifugation, brining and ripening conditions in preventing gas formation by *Clostridium* spp. in Gouda cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 54, 147–154.
- Szczesniak, A. S. (1986). Sensory texture evaluation methodology. *Reciprocal Meat Conference Proceedings*, 39, 86–96.
- Thayer, D. W., & Boyd, G. (1992). Gamma ray processing to destroy *Staphylococcus aureus* in mechanically deboned chicken meat. *Journal of Food Science*, 57, 848–851.
- Tsiotsias, A., Savvaidis, I., Vassila, A., Kontominas, M., & Kotzekidou, P. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* by low-dose irradiation in combination with refrigeration in the soft whey cheese 'Anthotyros'. *Food Microbiology*, 19, 117–126.
- Vissers, M. M. M., Driehuis, F., Te Giffel, M. C., De Jong, P., & Lankveld, J. M. G. (2007). Minimizing the level of butyric acid bacteria spores in farm tank milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 3278–3285.
- Vries, Tj., & Stadhouders, J. (1977). Butyric acid bacteria in milk. *Zuivelzucht*, 69, 196–199.
- Waes, G., & Van Heddeghem, A. (1990). Prevention of butyric acid fermentation by bacterial centrifugation of the cheese milk. *Bulletin International Dairy Federation*, 251, 47–50.
- Yüceer, S., & Gündüz, G. (1980). Preservation of cheese and pain yogurt by low-dose irradiation. *Journal of Food Protection*, 43, 114–118.

ARTÍCULO 2:

Use of the E-beam radiation to eliminate *Listeria monocytogenes* from surface mould cheese

Velasco, R., Ordóñez, J.A., Cambero, M.I., Cabeza, M.C.

International Microbiology, 2015, 18:33-40.

Índice de impacto (JCR, 2015): 1,157

Posición de la revista en el área *Microbiology*: 107/123 (Q4)

RESUMEN:

La evaluación de las radiaciones ionizantes, mediante la modalidad de electrones acelerados, como medida de control de *Listeria monocytogenes* se llevó a cabo en muestras de quesos Camembert y Brie. Asimismo, se estudió la respuesta de la microbiota de los quesos frente a los tratamientos y el efecto en determinadas propiedades fisicoquímicas. Las dosis absorbidas necesarias para alcanzar el objetivo de seguridad alimentaria (FSO) de acuerdo con los criterios de la UE y del USDA para *L. monocytogenes* fueron 1,27 y 2,59 kGy, respectivamente. La radiación redujo de forma notable la carga de bacterias ácido lácticas, pero las células dañadas se recuperaron durante el almacenamiento a 14 °C. Los cambios en los valores del pH y actividad de agua fueron insignificantes con las dosis utilizadas para conseguir el FSO.

Use of E-beam radiation to eliminate *Listeria monocytogenes* from surface mould cheese

Raquel Velasco, Juan A. Ordóñez, M. Isabel Cambero, M. Concepción Cabeza*

Department of Nutrition, Food Science and Food Technology. School of Veterinary,
Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Received 20 January 2015 · Accepted 29 March 2015

Summary. Camembert and Brie soft cheese varieties were subjected to E-beam irradiation as a sanitation treatment. The effects of treatments on microbiota and selected physicochemical properties were also studied. The absorbed doses required to meet the food safety objective (FSO) according to EU and USDA criteria for *Listeria monocytogenes* were 1.27 and 2.59 kGy, respectively. The bacterial load, mainly lactic acid bacteria, was reduced by the treatment but injured cells were recovered during storage at 14°C. The radiation treatment gave rise to negligible changes in the pH and water activity at doses required to achieve microbial safety. [Int Microbiol 2015; 18(1):33-40]

Keywords: *Listeria monocytogenes* · food safety objective (FSO) · soft mould-ripened cheeses · E-beam radiation

Introduction

Camembert and Brie cheeses are included in the soft cheeses types. They are manufactured by a similar technology and the main difference between them is the diameter size, i.e., 10–11 cm and 22–36 cm for Camembert and Brie, respectively [13]. The main feature of both cheeses is that, after the lactic acid fermentation, a white crust is formed due to the growth of *Penicillium camemberti* in the surface. Due to the mould activity, the ripening is very fast at room temperature and to decelerate this phenomenon the cheese is commonly stored under refrigeration.

Since *Listeria monocytogenes* is a psychrotrophic organism, it may grow if it is present.

Listeria monocytogenes is the causative agent of a disease that may be acquired by food ingestion. Several *L. monocytogenes* outbreaks have been reported due to soft cheeses [11,20,30,53]. This bacterium can reach the product mainly from environmental contamination or, more rarely, bovine mastitis [7,15,45]. It has been isolated from cheeses made from raw, low heat-treated and pasteurized milk [11,31] even more frequently than in those made from unpasteurized [20], which is probably due to a post-treatment contamination [36].

The ubiquity of *L. monocytogenes* in nature and its recognized presence in food-processing environments [49] explain the difficulty in producing either minimally processed foods or ones handled after processing that are free of the pathogen.

A relatively small number of cases of foodborne diseases are caused by *L. monocytogenes* in comparison to the most common pathogen outbreaks such as those caused by *Salmonella* spp. or *Campylobacter jejuni* [12, 21]. Despite its low incidence, the infection is considered of great impor-

*Corresponding author: M.C. Cabeza
Depto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universidad Complutense de Madrid
Av. Puerta de Hierro, s/n
28040 Madrid, Spain
Tel. +34-913944091. Fax +34-913943743
E-mail: ccabezab@ucm.es

tance due to the severity of the illness and high mortality rates (e.g., 12.70% in 2011 vs. 0.12% for *Salmonella*) [21].

Recently, the effectiveness of accelerated electrons (E-beam) treatment to eliminate pathogens was demonstrated [8,10,28,39] in a variety of ready-to-eat (RTE) foods. Moreover, a higher radioresistance of *L. innocua* vs. *L. monocytogenes* has been consistently observed [8,10,28,42] permitting the former species to be used as a surrogate of *L. monocytogenes*.

Previously, we have used E-beam radiation [52] to minimize the incidence of late blowing of cheese but an important reduction in lactic acid bacteria (LAB) was also produced, although after damage reparation an almost normal growth was recorded.

Taking these findings into account, it was postulated that E-beam technology could be highly appropriate for sanitizing RTE cheeses. This paper describes a study to optimize E-beam treatment of the above mentioned cheese varieties with the final goal of reducing the number of *L. monocytogenes* to a safe level, i.e., in compliance with the criteria of EU and USDA regulations for this bacterium.

Materials and methods

Organisms. One strain of *Listeria innocua* (NCTC 11288) and another of *L. monocytogenes* (Scott A, CIP 103575, serotype 4b) were used. The strains were maintained by freezing (-40°C) in trypticase soy broth (TSB; Difco, Detroit, MI, USA) with 10% glycerol added as a cryogenic agent. Fresh cultures were prepared by removing a piece of frozen culture from vials and inoculating it into 9 ml of TSB, then incubating it at 32°C for 24 h. The culture was then centrifuged at 4°C ($3000 \times g$ for 30 minutes) and the pellet was suspended in a beaker with 50 ml sterile saline solution, which yielded a bacterial load of approximately 10^8 cells/ml. In experiments, large numbers of cells were used to accurately determine the bacterium inactivation kinetics.

Sample preparation and irradiation treatment. Individually wrapped portions (30 g) of Brie and Camembert cheeses made from pasteurized milk were acquired at a local supermarket. Only samples used to study the effect of E-beam on the survival of both *L. monocytogenes* and *L. innocua* were deliberately contaminated. To do this, 0.5 ml of the bacterial suspension was divided in five aliquots of 0.1 ml, which were injected with disposable syringes in five separated zones of the cheese portion after removing wrappings and rinds aseptically. Then, samples were vacuum-packaged in 20×20 cm laminated film bags of low gas permeability (oxygen transmission rate of $35 \text{ cm}^3/24 \text{ h m}^2 \text{ bar}$ and $150 \text{ cm}^3/24 \text{ h m}^2 \text{ bar}$ to carbon dioxide) until vacuum reached 20 kPa. Once the samples were ready, they were treated in the irradiation plant (Ionisos Iberica, SA, Tarancón, Spain) and irradiated under an electron beam radiation source, which operates at 10 MeV. The radiation doses employed were between 0.2 and 2 kGy for kinetics studies and from 1 to 3 kGy for texture and sensory analyses. The dose absorbed by samples was checked by determining the absorbance of cellulose triacetate dosimeters [1] simultaneously irradiated with samples. Experiments were made in triplicate and performed at room temperature ($18\text{--}20^{\circ}\text{C}$). The product temperature increased less than 2°C during treatment. Following the treatment, samples

were transferred to the laboratory where samples intended for determining the death kinetics and the selected parameters corresponding to the day zero were immediately processed. The remaining samples were stored at 4 and 14°C (the latter as an example of temperature abuse) to study the microbiota and behaviour of selected characteristics over time.

Physicochemical analysis. Moisture, ash, protein, fat, pH and *aw* were measured as previously described [52]. The pH was determined in the rind and core of cheese samples, using a Crison Digit-501 pH meter (Crison Instruments LTD, Barcelona, Spain).

Microbial analyses. To count survivors, the samples, after weighing, were homogenized with 20 ml of sterile saline solution in a Stomacher bag. Total viable counts (TVC) were determined by the pour-plate method using Plate Count Agar (PCA; Difco) as culture medium. Lactobacilli counts were performed in double layer acidified (pH 5.5) MRS agar (Conda-Pronadisa, Madrid, Spain) as recommended by Henri-Dubernet et al. [26]. Incubation was carried out at 32°C for 48 h.

To determine inactivation parameters of both *L. monocytogenes* and *L. innocua*, Palcam agar base (Oxoid, Basingstoke, UK) with egg yolk emulsion (Oxoid) and selective supplement (polymyxin B, acriflavine HCl and ceftazimide, Oxoid) was used. Plates were incubated at 37°C for 48 h. Despite the selective agents present in the Palcam agar, this medium has been found previously to be perfectly suitable for the determination of listeria death kinetics [9]. Colonies were enumerated with a Digital S Colony counter (J. P. Selecta, Barcelona, Spain).

Survival curves were constructed by plotting log CFU/g against irradiation dose. Decimal reduction doses (*D*-values) were calculated from the linear regression equation of survival curves. The TVC and LAB growth curves were constructed according to the Baranyi and Roberts model [4] using the Excel add-in fitting curves Dmfit [<http://www.ifr.ac.uk/safety/dmfit/>].

Risk assessment. For risk assessment the USDA recommends a “zero tolerance” policy for *L. monocytogenes* in RTE products, equivalent to a Food Safety Objective (FSO) of 4 CFU/100g ($\log_{10} = -1.39$). In the EU, European Commission Regulation (EC) No. 1441/2007 [18] divides the RTE foods into two categories according to the ability of *L. monocytogenes* to grow in them. So, for the material with an a_w above 0.92, which permits the growth of *L. monocytogenes*, the “zero tolerance” criterion would be applied. Products must not contain *L. monocytogenes* in 25 g at the time they leave the production plant. When the product is on the market, the limit is 100 CFU/g ($\log_{10} = 2$) throughout the shelf life [18].

To establish the Process Criteria (PC), i.e., the irradiation dose required to reach the FSO, the initial contamination and the listeria growth throughout the shelf-life must be taken into account. The current milk pasteurization conditions are sufficient to achieve a decrease of 5-6 decimal reductions in *L. monocytogenes* [16]. In cheeses made from pasteurized milk, the original listeria level therefore depends upon the potential contamination during the preparation of portions.

The post-milking environment has been identified as the main source of contamination with *L. monocytogenes*. This was detected in milk from 90% of herds although at low concentrations, accounting for around 2.25 CFU/ml in bulk tank milk [5], but pasteurization causes a reduction of 5.2 log units of *L. monocytogenes* according to the data reported by Mackey and Bratchell [37], resulting in a listeria concentration of 1.42×10^{-5} cells/ml. To manufacture each piece of Camembert (250 g) and Brie cheese (2,250 g), 2.2 and 22.5 litres of milk are required, respectively [45]. During whey draining, 10% of bacterial cells should be eliminated [45]. So, 0.03 and 0.29 cells should be retained in each Camembert and Brie curd, respectively (ca. 10^{-4} cell/g). Ryser and Marth [44] analysed the changes in *L. monocytogenes* numbers during the manufacture and ripening of Camembert cheeses made from raw milk artificially contaminated with 2.6–2.9 log CFU/ml. After 65 days of ripening,

counts reached 6.30–7.51 log CFU/g. A similar increase was obtained in the listeriosis risk analysis carried out by Sanaa et al. [45] for other white mould ripened cheeses. From an initial load of 0.8 and 0.3 cells of *L. monocytogenes* per litre of raw milk, the former authors calculated, at the time of consumption, 3 and 5 cells/g in Camembert and Brie varieties, respectively. Therefore, if the estimated increase is about 4 log units, from an initial concentration in the curd of 1.12×10^{-4} and 1.29×10^{-4} cell/g (i.e., 0.03 and 0.29 cells/curd) the Camembert and Brie cheeses should contain a final load of 1.12 and 1.28 CFU/g ($\log_{10} = 0.05$ – 0.11). These values are lower compared to the contamination that could occur post-processing or during size reduction adopted by other authors for products such as sausages [29] and cooked ham [8], assumed to be around 10 cells/g ($\log_{10} = 1$). Following the same criterion for the preparation of cheese portions, *L. monocytogenes* contamination during this operation could reach, in the worst case, the amount of 10 cells/g. On the other hand, from the results of several authors compiled by FDA [22], a growth rate of 0.071 log CFU/day for *L. monocytogenes* in Camembert and Brie cheeses stored at 4°C has been calculated. Assuming for cheeses, a shelf-life of 60 days at 4°C, a final bacterial load of 5.26 log units ($0.071 \times 60 + 1$) would be achieved. From these data, it can be estimated that 3.26 and 6.65 decimal reductions would be required (performance criteria) to reach the FSO for EU and USDA statements, respectively.

Texture analysis. Cheeses were sampled on day 0 and after 15 (two weeks) and 42 days (six weeks) of storage. The effect of E-beam radiation on the texture of cheeses and how it changes during storage were examined through a puncture test, as described by Herrero et al. [27], and a texture profile analysis (TPA) as previously reported [52]. Hardness, springiness, adhesiveness, cohesiveness, gumminess and chewiness parameters of samples were calculated.

Sensory analysis. A triangular test, performed as described by Velasco et al. [52], was carried out at different days during storage at both temperatures to study the behaviour of appearance, flavour and odour of samples E-beam treated. In addition, panellists were asked to justify their answer with brief descriptions.

Statistical analysis. Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) was used to calculate the coefficients of determination (R^2) of survival curves and to conduct the F test to compare them. For statistical analysis of the physicochemical tests results, a one-way ANOVA and Duncan's test for multiple-range test were performed using Statgraphics Centurion XVI for Windows (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA).

Results and Discussion

Physicochemical characteristics. The chemical composition (% on wet matter) of Camembert and Brie cheeses was: moisture, 45.08 ± 1.09 and 47.13 ± 0.85 ; fat, 31.90 ± 0.14 and 36.77 ± 3.38 ; protein 24.52 ± 1.56 and 18.98 ± 0.65 ; and ash 2.88 ± 0.11 and 2.66 ± 0.21 , respectively. Moisture values were slightly lower than those reported in the literature (45–47% vs. 48–52%) while the fat (32–37% vs. 24–27%) and protein (19–24% vs. 19–21%) contents were higher [13,23], but, consequently, both compounds were similar in dry matter terms.

No significant ($P > 0.05$) dose effect was observed in the a_w values immediately after irradiation treatment in both

cheeses (Table 1), as previously recorded in cheese slices [52]. The initial values were 0.960 and 0.964 for Camembert and Brie, respectively (Table 1), similar to values (0.967 and 0.965) found by Marcos et al. [38] for both cheeses and slightly lower than the value (0.97) reported by Guinee and Fox [25]. At the end of storage, the higher the dose the higher the a_w of Brie samples, which reached values of 0.983 and 0.974 in samples treated at 3 kGy and stored for 41 days at 4°C and 19 days at 14°C, respectively with some significant differences ($P < 0.05$). However, this trend was not observed in the Camembert cheese because there was a significant increase ($P < 0.05$) in this parameter during storage, independently of the dose applied. After 41 days storage at 4°C and 19 days at 14°C, the average values were 0.978 and 0.973, respectively. The radiolysis of water present in both the cheese and the package environment resulted in the release of hydroxyl radicals, whose concentration diminished over time to return to form water molecules [46] and could contribute to an increase in water activity at the end of storage. Nevertheless, although in some instances significant differences were found, the range of values, from 0.983 and 0.957 (Table 1), was not broad enough to considerably inhibit either the growth of *L. monocytogenes* or the dominant microbiota (LAB), since the minimum a_w for growth of the former pathogen has been established at 0.92 [16] and LAB may grow perfectly well at a_w below 0.96 [50]. Indeed, the drop in a_w is the basis of the lactic fermentation that occurs in traditional dry fermented sausages by LAB [43].

In the core of both cheeses, no relation between storage time and pH values was observed (data not shown). No dose effect ($P > 0.05$) was found in the pH at any of the times tested, consistent with the findings reported by various authors for irradiated cheeses, e.g., Konteles et al. [34]. Figure 1 shows the effect of E-beam treatment on the pH values in rind of Camembert and Brie cheeses and their changes during storage at 4 and 14°C. At the beginning of storage, the rinds had an average pH of 7.21 (Camembert) and 6.90 for (Brie), whereas inside the pH was significantly ($P < 0.05$) lower, with values of ca. 5.95 and 6.29. These values are in agreement with those reported by Spinnler and Gripon [48]. The increasing pH gradient from the centre to the surface is characteristic of white mould-ripened cheeses since *Penicillium camemberti*, present on the cheese surface, uses lactate as a carbon source for cell growth [35], which would result in a deacidification of the surface of the cheese. *Geotrichum candidum* might be implicated in the ripening of Camembert-type cheese [48], also helping to raise the pH either by the metabolism of amino acids as carbon and nitrogen sources

Table 1. Effect of E-beam treatment and storage conditions on a_w (mean values \pm SD) of Camembert and Brie cheeses

Cheese	Storage		Dose				
	(°C—days)	0 kGy	1 kGy	2 kGy	3 kGy		
Camembert	4	0	0.960 \pm 0.002 ^b	0.957 \pm 0.002 ^c	0.964 \pm 0.005 ^b	0.962 \pm 0.006 ^b	
		26	0.957 \pm 0.002 ^{b,b}	0.966 \pm 0.002 ^{a,b}	0.967 \pm 0.002 ^{a,b}	0.969 \pm 0.003 ^{a,b}	
		41	0.977 \pm 0.003 ^a	0.979 \pm 0.001 ^a	0.976 \pm 0.003 ^a	0.981 \pm 0.005 ^a	
	14	0	0.960 \pm 0.002 ^b	0.957 \pm 0.002 ^b	0.964 \pm 0.005	0.962 \pm 0.006	
		19	0.975 \pm 0.003 ^{a,a}	0.972 \pm 0.003 ^{a,β,a}	0.969 \pm 0.002 ^{β}	0.972 \pm 0.003 ^{a,β}	
	Brie	4	0	0.964 \pm 0.009	0.958 \pm 0.001 ^f	0.974 \pm 0.007	0.965 \pm 0.011 ^e
27			0.966 \pm 0.007	0.969 \pm 0.001 ^e	0.969 \pm 0.009	0.970 \pm 0.001 ^e	
41			0.966 \pm 0.003 ^{γ}	0.976 \pm 0.004 ^{β,d}	0.978 \pm 0.003 ^{a,β}	0.983 \pm 0.001 ^{a,d}	
14		0	0.964 \pm 0.009	0.958 \pm 0.001	0.974 \pm 0.007	0.965 \pm 0.011	
		19	0.957 \pm 0.001 ^{β}	0.959 \pm 0.002 ^{β}	0.971 \pm 0.002 ^a	0.974 \pm 0.004 ^a	

^{a, β , γ} : values in the same row with a different letter are significantly different ($P < 0.05$).

^{a, b, c} and ^{d, e, f}: values in the same column with a different letter are significantly different in Camembert and Brie cheese, respectively ($P < 0.05$).

yielding ammonia or lactate utilization to maintain the cell structure during the stationary phase [3]. Furthermore, *Debaryomyces hansenii*, a yeast not included in the starters but possibly present because of their ubiquitous nature, could contribute to the surface alkalisation [35]. During storage, the pH of the rinds became significantly more acid ($P < 0.05$) in all the samples until reaching a value of around 6.0 for both Camembert and Brie cheeses after 41 days of storage at 4°C and 5.67 and 5.84, respectively, after 19 days of storage at 14°C. This phenomenon could be explained by both the facultative anaerobic nature of LAB and the progressive death of the moulds caused by the low level of oxygen in the package, supported by the progressive disappearance of mycelium.

Microbial results. *Lactococcus* [13] and lactobacilli [26] are the dominant organisms in the paste of Camembert and Brie cheeses. Then, the fate of LAB could be assimilated to that of the TVC. The response of LAB microbiota (PCA counts) and lactobacilli (MRS counts) to the action of E-beam treatment is shown in Fig. 2. Initially, the TVC accounted was about 8.0–8.5 log CFU/g in both cheeses, which is normal for most cheese varieties [24]. The 1 kGy treatment resulted in a

decrease of about 2 (Camembert) and 3 (Brie) log units. When 2 kGy were applied, the reductions were around 5 and 4 log units, respectively. At 3 kGy a “tail” was observed in both cheeses, which may be explained by the presence of a heterogeneous indigenous microbiota consisting of the most radioresistant organisms, which would be responsible for the tail. These organisms would belong to bacterial groups other than LAB because at 3 kGy, the lactobacilli (Fig. 2) had practically disappeared since the values came from counts of 3–4 colonies developed on the agar plates. Although lactobacilli counts of 3 kGy samples were approximated, they were fitted to a straight line, which confirms the well-known first order kinetics of bacteria inactivation by ionizing radiation. Since the straight portions of survivor curves were parallel, global D -values of 0.42 and 0.51 kGy could be roughly estimated for Camembert and Brie cheeses, respectively. These results are close to the range recorded by other authors. For example, a D -value of 0.66 kGy has been reported for mesophilic aerobic count in cheese slices [52] and 0.39 kGy could be estimated for TVC in Cottage cheese [32]. The differences may be explained by the fact that cheese always presents a mixed microbiota and the radioresistance of bacteria may be variable [52]. However, in some cheese varieties, much higher D -values have been re-

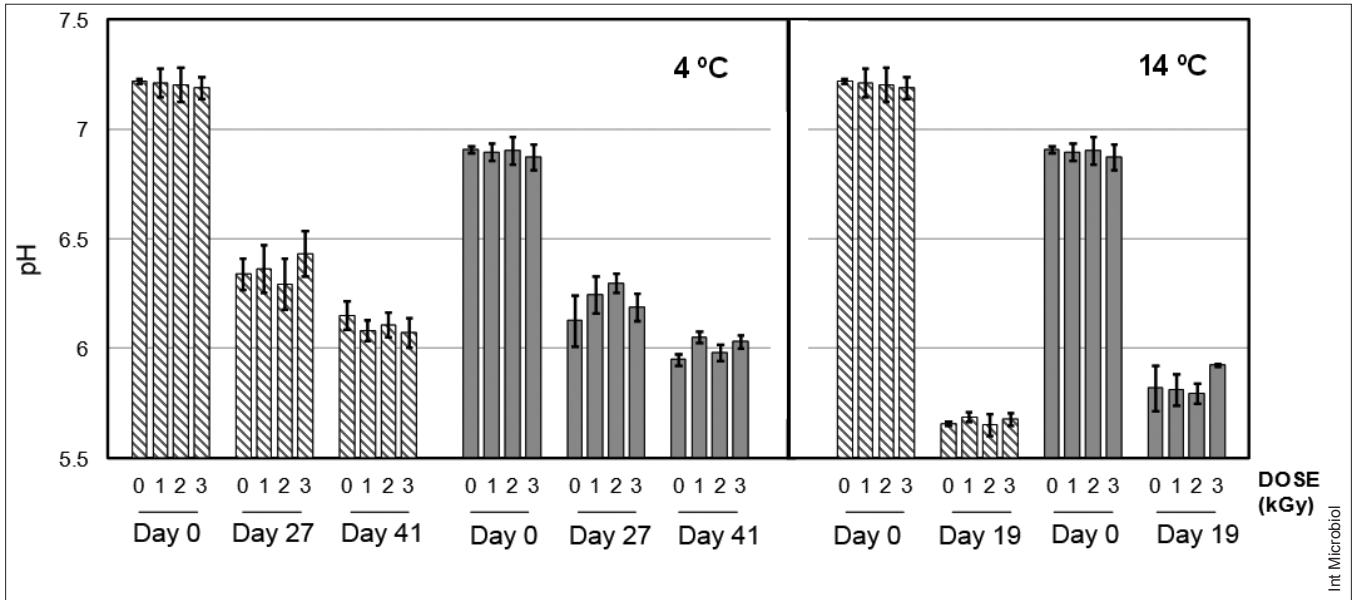


Fig. 1. Changes in the rind pH during storage at 4 and 14°C of Camembert (striped bars) and Brie (solid bars) cheeses treated by E-beam irradiation.

ported, such as 1.8 kGy in Feta cheese [34], probably due to factors related to bacterial radioresistance, which depend on both the inherent resistance of the organisms and the conditions of the matrix food [2,6].

The changes in TVC (total LAB) in Camembert cheese during storage at 4 and 14°C after E-beam treatment are shown in Fig. 3. As expected, no changes occurred in control samples throughout storage. In samples stored at 14°C, a quick micro-

biota recovery was observed when 1 kGy was applied in such a way that in a couple of days the number of TVC superposed that of control (non-treated) samples, growing at a doubling time (*g* value) of 12 h. The same pattern was detected at 2-kGy doses but the growth rate was slower (*g* of about 24 h) achieving the 10⁸ CFU/g level after 12 days of storage. The bacteria subjected to 3 kGy were probably not able to completely repair the damage produced by the E-beam and the highest level of

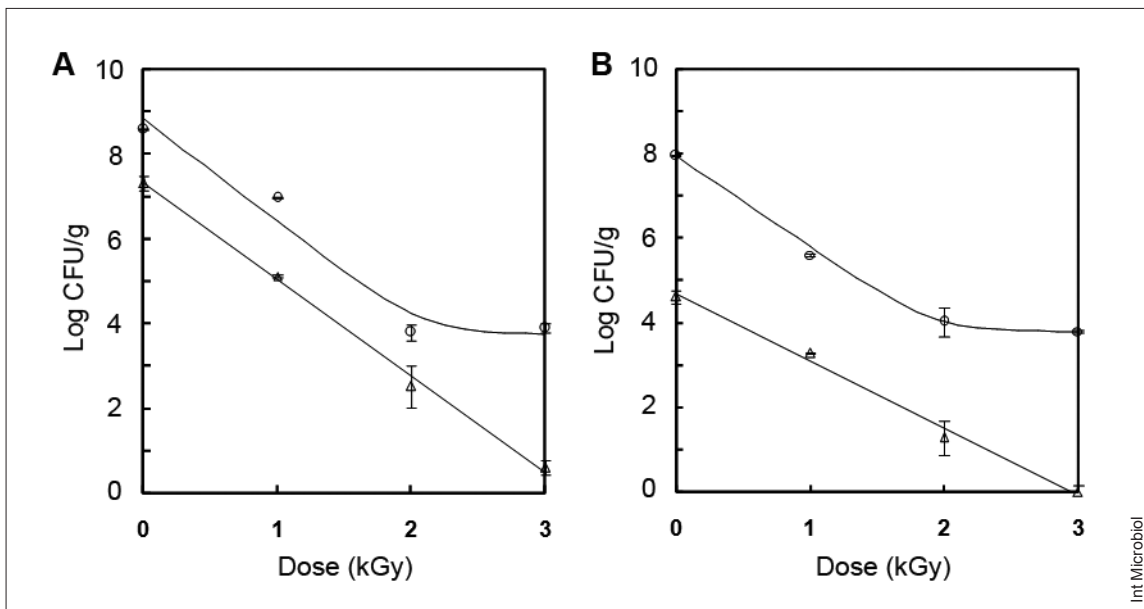


Fig. 2. Survival curves of LAB (circles) and lactobacilli (triangles) for Camembert (A) and Brie (B) rindless cheeses.

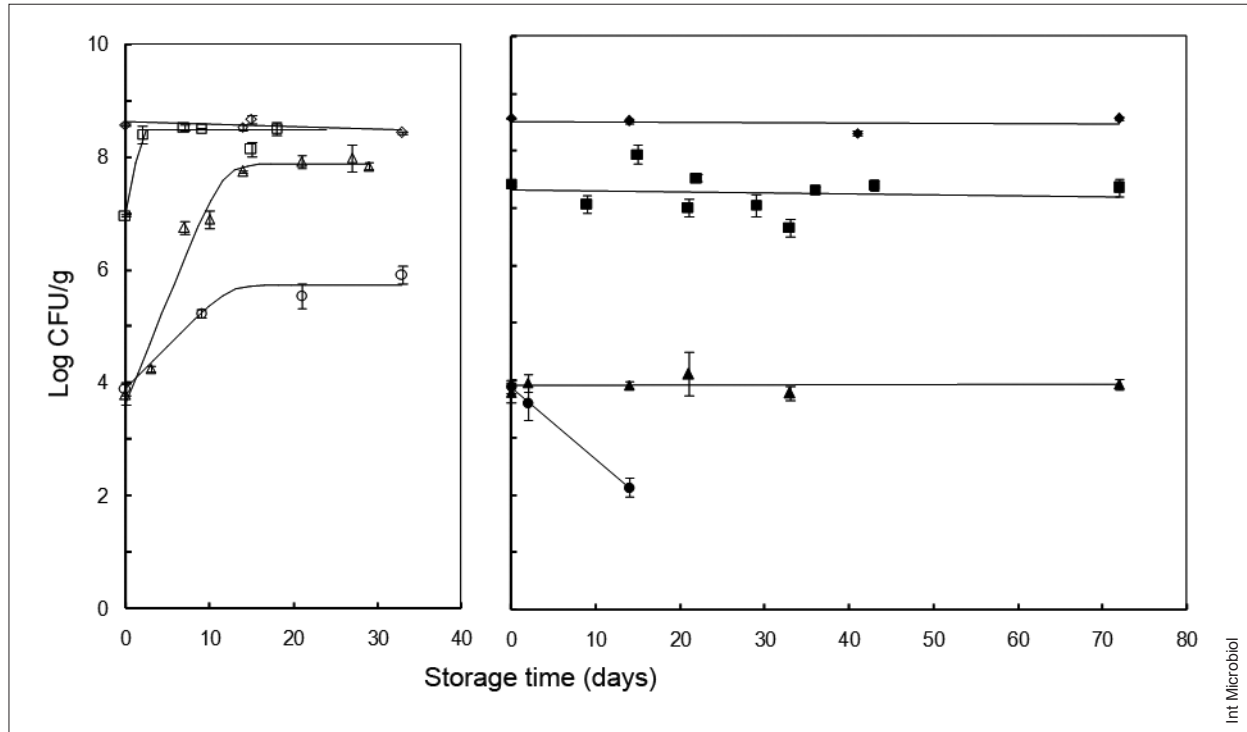


Fig. 3. TVC of control (diamonds) and irradiated Camembert cheese at 1 (squares), 2 (triangles) and 3 kGy (circles) stored at 4°C (full symbols) and 14°C (empty symbols).

them did not exceed 10^6 CFU/g after 33 days of storage. At 4°C, the TVC was maintained (at doses of 1 and 2 kGy) at the levels achieved just after the treatment application, but at 3 kGy a decrease was observed afterwards and no colonies were detected after 20 days of storage. TVC changes in the Brie cheese showed a similar trend than in the Camembert (data not shown). Briefly, the revival of microbiota was observed estimating a lag phase of about 10 days at 14°C when doses of 2 and 3 kGy were used and at 4°C even a slight growth occurred when 1 kGy was applied, giving a g value of about 500 h. In the lactobacilli counts, the same pattern was observed in both Camembert and Brie cheeses (data not shown). From all the former data taken together, it would seem that, although the LAB are the most important bacteria in both cheeses, the species present in the Brie cheese used in this work were more

sensitive than those of the Camembert variety. In a previous study on the use of E-beam radiation to diminish the late blowing of cheese, a recovery of the total mesophilic aerobic counts was reported, although the profile observed was slightly different [52].

Food safety aspects. According to the EU regulation [18], both cheeses are included in the category of RTE foods able to support the growth of *L. monocytogenes* since both the pH and a_w are higher than 4.4 and 0.92, respectively. It is, therefore, a risk for the consumer if this bacterium is present. The response of both *L. innocua* and *L. monocytogenes* to the E-beam treatment resulted in a first-order inactivation kinetics, as repeatedly reported [e.g. 39,40]. From the regression equations shown in Table 2, D -values 0.39 kGy for *L. innocua* and

Table 2. Irradiation decimal reduction values (D -values) for *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in Camembert and Brie cheeses

Cheese	Microorganism	Survival equations	R^2	D -value
Camembert	<i>L. innocua</i> NCTC 11288	$\text{Log CFU/g} = 7.42 - 2.80 \cdot \text{Dose}$	0.96	0.36 kGy
	<i>L. monocytogenes</i> Scott A	$\text{Log CFU/g} = 9.26 - 2.95 \cdot \text{Dose}$	0.995	0.34 kGy
Brie	<i>L. innocua</i> NCTC 11288	$\text{Log CFU/g} = 7.29 - 2.55 \cdot \text{Dose}$	0.94	0.39 kGy
	<i>L. monocytogenes</i> Scott A	$\text{Log CFU/g} = 9.26 - 2.92 \cdot \text{Dose}$	0.999	0.34 kGy

0.34 kGy for *L. monocytogenes* can be calculated in Brie cheese and 0.36 and 0.34 kGy, respectively, in Camembert cheese. *D*-values of a similar order have been reported for *L. monocytogenes* in processed cheese slices treated with gamma radiation [47]. Higher *D*-values have been reported at refrigeration temperatures [32,33,50]: 0.84–0.93 kGy in sliced and pizza cheeses (10°C), 1.33 kGy in Feta cheese (0–2°C), and 1.38 kGy in soft whey cheese Anthotyros (4°C), respectively.

To estimate the dose required to meet the FSO (process criteria), the most unfavourable case was taken into account. Thus, the highest *D*-value, matching *L. innocua* in Brie cheese, was chosen (0.39 kGy). According to the previously calculated performance criterion, 3.26 and 6.65 decimal reductions would be required depending on the destination country. Therefore, the process criteria would be 1.27 and 2.59 kGy, respectively. These doses are much lower (the former) and of the similar level (the latter) than that considered as acceptable (i.e., 2.5 kGy) by the Scientific Committee on Food of EU and allowed in France for the treatment of Camembert cheese made from raw milk [19]. However, Bougle and Stahl [7] have detected viable listeria but they were not able to grow at 12°C in Camembert cheese treated at 2.6 kGy. Likewise, a slower growth rate of *L. monocytogenes* and *S. aureus* has been observed in vacuum packaged cooked ham after treatment at 2 and 3 kGy [9].

Texture and sensory aspects. Immediately after E-beam treatment, no significant differences ($P > 0.05$) in some textural attributes (adhesiveness, springiness and chewiness) were found in both cheeses. However, significant differences ($P < 0.05$) in other parameters (hardness, cohesiveness, gumminess and breaking force) were detected only in Camembert cheese while values for the Brie samples remained fairly constant. Nevertheless, no significant differences ($P > 0.05$) between untreated and treated samples after two weeks of storage were detected. A similar behaviour was observed in sensorial parameters. These results are in agreement with those by other authors, e.g., no significant differences were found in the sensory attributes of Camembert samples treated with doses up to 2.5 kGy [14]. Similarly, it has been reported that the texture of Feta and smear-ripened cheeses is not affected by irradiation treatments [17,50].

From the results obtained, it can be concluded that E-beam treatments at 1.27 and 2.59 kGy allowed the control of *L. monocytogenes* growth, achieving the FSO in soft mould-ripened cheeses (Camembert and Brie varieties) according to EU and USDA criteria, respectively. Although the lactic acid microbiota was also reduced, its recovery occurred afterwards

in samples stored at 14°C (a favourable temperature for LAB growth) until reaching values close to the initial numbers.

Acknowledgements. This work has been supported by the Projects AGL2010-19158 and CARNISENUSA (CSD0007-00016) and the Group 920276 of the Complutense University of Madrid. R. Velasco was the beneficiary of a grant financed by the former CARNISENUSA project.

Competing interests. None declared.

References

1. American Society for Testing and Materials (2000) E1650-97e1 standard practice for use of cellulose acetate dosimetry systems. 12:2. ASTM, West Conshohocken, PA, USA
2. Augustin JC (1996) Resistance of *Listeria monocytogenes* to physical exposure. *Pathol Biol* 44:790-807
3. Aziza M, Adour L, Amran, A (2008) Assimilation of peptides and amino acids and dissimilation of lactate during submerged pure cultures of *Penicillium camembertii* and *Geotrichum candidum*. *J Microbiol Biotechn* 18:124-127
4. Baranyi J, Roberts, TA (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol* 23:277-294
5. Bemrah N, Sanaa M, Cassin MH, Griffiths MW, Cerf O (1998) Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. *Prev Vet Med* 37:129-145
6. Black JL, Jaczynski J (2008) Effect of water activity on the inactivation kinetics of *Escherichia coli* O157:H7 by electron beam in ground beef, chicken breast meat, and trout fillets. *Int J Food Sci Tech* 43:579–586
7. Bougle DL, Stahl V (1994) Survival of *Listeria monocytogenes* after irradiation treatment of Camembert cheeses made from raw milk. *J Food Protect* 57: 811-813
8. Cabeza MC, Cambero I, de la Hoz L, Ordóñez JA (2007) Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Innov Food Sci Emerg* 8:299-305
9. Cabeza MC, Cambero MI, Núñez M, Medina M, de la Hoz L, Ordóñez J (2010) Lack of growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in temperature abuse of E-beam treated ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Food Microbiol* 27:777-782
10. Cambero MI, Cabeza MC, Escudero R, Manzano S, García-Márquez I, Velasco R, Ordóñez JA (2012) Sanitation of selected ready-to-eat (RTE) intermediate moisture foods (IMF) of animal origin by E-beam irradiation. *Foodborne Pathog Dis* 9:594-599
11. Centers for Disease Control and Prevention (2013) Multistate outbreak of listeriosis linked to Crave Brothers Farmstead cheeses. Available at: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-07-13/index.html>.
12. Centers for Disease Control and Prevention (2013) Summary of notifiable diseases—United States 2011. *Morb Mortal Wkly Rep* 60:1-117
13. Chapman HR, Sharpe ME (1990) Microbiology of cheese. In Robinson RK (ed) *Dairy microbiology*, vol. 2 *The microbiology of milk products*. 2nd ed. Elsevier, Essex, UK, pp 203-289
14. Chincholle R (1991) Action of the ionization treatment on the soft cheese made from unpasteurized milk. *C R Acad Agric Fr* 77:29-35
15. Codex Alimentarius Commission (2009) Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat foods. CAC/GL 61-2007, Rev. 1. Available at: http://www.codexalimentarius.org/download/standards/10740/CXG_061e.pdf. Accessed 9 January 2015

16. Doyle ME, Mazzota AS, Wang T, Wiseman DW, Scott VN (2001) Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. J Food Protect 64:410-429
17. Ennahar S, Kuntz F, Strasser A, Bergaentzle M, Hasselmann C, Stahl V (1994) Elimination of *Listeria monocytogenes* in soft and red smear cheeses by irradiation with low-energy electrons. Int J Food Sci Tech 29:395-403
18. European Commission (2007) Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Off J Eur Union L322:12-29
19. European Food Safety Authority (2011) Statement summarizing the conclusions and recommendations from the opinions on the safety of irradiation of food adopted by the BIOHAZ and CEF Panels. EFSA J 9: 2107
20. European Food Safety Authority (2011) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. EFSA J 9:2090
21. European Food Safety Authority (2013) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. EFSA J 11:3129
22. US Food and Drug Administration, US Food Safety and Inspection Service (2003) Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Appendix 8: Growth of *Listeria monocytogenes* in foods. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/UCM197321.pdf>
23. Food Standards Agency (2002) McCance and Widdowson's the composition of foods, 6th ed. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK
24. Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP (2004) Cheese: Chemistry, physics and microbiology, Vol. 2 Major Cheese Groups. 3rd ed. Elsevier Applied Science, London, UK
25. Guinee TP, Fox PF (2004) Salt in cheese: Physical, chemical and biological aspects. In Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP (eds) Cheese: Chemistry, physics and microbiology, Vol. 2 Major Cheese Groups, 3rd ed. Elsevier Applied Science, London, UK, pp 208-259
26. Henri-Dubernet S, Desmasures N, Guéguen M (2008) Diversity and dynamics of lactobacilli populations during ripening of RDO Camembert cheese. Can J Microbiol 54:218-228
27. Herrero AM, Cambero MI, Ordóñez JA, de la Hoz L, Carmona P (2009) Plasma powder as cold-set binding agent for meat system: Rheological and Raman spectroscopy study. Food Chem 113:493-499
28. Hoz L, Cambero MI, Cabeza MC, Herrero AM, Ordóñez JA (2008) Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packed dry-cured ham by E-Beam radiation. J Food Protect 71:2001-2006
29. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (2002) *Listeria monocytogenes* in cooked sausage (Frankfurters). In Tompkin RB, Garam L, Roberts TA, Buchanan RL, van Schothorst M, Dahms S, Cole MB (eds), Microorganisms in foods: Microbiological testing in food safety management, vol. 7. Kluwer/Plenum, New York, USA, pp 285-312
30. Jackson KA, Biggerstaff M, Tobin-D'Angelo M, Sweat D, Klos R, Nosari J, Garrison O, Boothe E, et al. (2011) Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* associated with Mexican-style cheese made from pasteurized milk among pregnant, Hispanic women. J Food Protect 76:949-953
31. Johnson EA, Nelson JH, Johnson M (1990) Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk, Part I. Executive summary, introduction and history. J Food Protect 53:441-452
32. Jones TH, Jelen P (1988) Low dose-irradiation of Camembert, Cottage cheese and Cottage whey. Milchwissenschaft 43:233-235
33. Kim HJ, Ham JS, Lee JW, Kim K, Ha SD, Jo C (2010) Effects of gamma and electron beam irradiation on the survival of pathogens inoculated into sliced and pizza cheeses. Radiat Phys Chem 79:731-734
34. Konteles S, Sinanoglou VJ, Batrinou A, Sflomos K (2009) Effects of γ -irradiation on *Listeria monocytogenes* population, colour, texture and sensory properties of Feta cheese during cold storage. Food Microbiol 26:157-165
35. Lessard MH, Bélanger G, St-Gelais D, Labrie S (2012) The composition of Camembert cheese ripening cultures modulates both mycelial growth and appearance. Appl Environ Microb 78:1813-1819
36. Lianou A, Sofos JN (2007) A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. J Food Protect 70:2172-2198
37. Mackey BM, Bratchell N (1989) The heat resistance of *Listeria monocytogenes*: A review. Lett Appl Microbiol 9:89-94
35. Marcos A, Esteban MA, Alcalá M (1990) Determination of water activity in Brie and Camembert cheese varieties by four different methods. Food Chem 38:189-199
39. Medina M, Cabeza MC, Bravo D, Cambero I, Montiel R, Ordóñez JA, Nuñez M, Hoz L (2009) A comparison between E-beam irradiation and high pressure treatment for cold-smoked salmon sanitation: microbiological aspects. Food Microbiol 26:224-227
40. Miller RB (2005) Electronic irradiation of foods: An introduction to the technology. Springer Science, New York, USA
41. Moseley BEB (1989) Ionizing radiation: Action and repair. In Gould GA (ed.), Mechanisms of action of food preservation procedures. Elsevier, Essex, UK, pp 43-70
42. Niemira BA, Fan X, Sokorai KJB, Sommers CH (2003) Ionizing radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* ATCC 49594 and *Listeria innocua* ATCC 51742 inoculated on endive (*Cichorium endiva*). J Food Protect 66:993-998
43. Ordóñez JA, Hierro EM, Bruna JM, de la Hoz L (1999) Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. Crit Rev Food Sci 39:329-367
44. Ryser ET, Marth EH (1987) Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of Camembert cheese. J Food Protect 50:372-378
45. Sanaa M, Coroller L, Cerf O (2004) Risk assessment of listeriosis linked to the consumption of two Soft cheeses made from raw milk: Camembert of Normandy and Brie of Meaux. Risk Anal 24:389-399
46. Seisa D, Osthoff G, Hugo C, Hugo A, Bothma C, Van der Merwe J (2004) The effect of low-dose gamma irradiation and temperature on the microbiological and chemical changes during ripening of Cheddar cheese. Radiat Phys Chem 69:419-431
47. Sommers CH, Boyd G (2005) Elimination of *Listeria monocytogenes* from Ready-to-Eat turkey and cheese tortilla wraps using ionizing radiation. J Food Protect 68:164-167
48. Spinnler HE, Gripon JC (2004) Surface mould-ripened cheeses. In Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP (eds) Cheese: Chemistry, physics and microbiology, Vol. 2 Major Cheese Groups, 3rd ed. Elsevier Applied Science, London, UK, pp 208-259
49. Taormina PJ, Beuchat LR (2001) Survival and heat resistance of *Listeria monocytogenes* after exposure to alkali and chlorine. Appl Environ Microb 67:2555-2563
50. Troller JA, Stinson JV (1981) Moisture requirements for growth and metabolite production by Lactic Acid Bacteria. Appl Environ Microb 42:682-687
51. Tsiotsias A, Savvaidis I, Vassila A, Kontominas M, Kotzekidou P (2002) Control of *Listeria monocytogenes* by low-dose irradiation in combination with refrigeration in the soft whey cheese 'Anthotyros'. Food Microbiol 19:117-126
52. Velasco R., Ordóñez JA, Cabeza MC, Hoz L, Cambero MI (2011) Use of the E-beam radiation to diminish the late blowing of cheese. Int Dairy J 21:493-500
53. Warriner K, Namvar A (2009) What is the hysteria with *Listeria*? Trends Food Sci Tech 20:245-254

ARTÍCULO 3:

Effect of E-beam sanitation of surface mould cheese on texture and sensory attributes

Velasco, R., Ordóñez, J.A., Cabeza, M.C., Cambero, M.I.

LWT – Food Science and Technology, 2016, 70:1-8.

Índice de impacto (JCR, 2016): 2,329

Posición de la revista en el área *Food Science and Technology*: 32/130 (Q1)

RESUMEN:

Se estudió el comportamiento de los parámetros de textura, color y propiedades organolépticas de quesos Camembert y Brie tratados con electrones acelerados con dosis de hasta 3 kGy durante su almacenamiento a 4 y 14 °C. Mediante un modelo de superficie de respuesta, se analizaron los efectos individuales y combinados de la dosis aplicada y las condiciones de almacenamiento.

El tratamiento produjo una disminución de la dureza, cohesividad, gomosidad y resistencia a la penetración en el queso Camembert y, en menor medida, en el queso Brie. En el resto de parámetros de textura (adhesividad, elasticidad y masticabilidad) no se encontró un efecto significativo de la irradiación. Tras dos semanas de almacenamiento, no hubo diferencias significativas entre las muestras. Se observó un comportamiento similar en el color, ya que los pequeños cambios detectados en las muestras irradiadas se minimizaron durante el almacenamiento.

El análisis sensorial de los quesos confirmó los datos obtenidos en la medida instrumental del color, ya que los panelistas no encontraron diferencias significativas en la apariencia de las muestras. En cuanto al olor y sabor, las diferencias debidas a la irradiación desaparecieron durante el almacenamiento, salvo en los quesos tratados con 3 kGy. Puesto que esta dosis supera la requerida para cumplir el FSO con respecto a *L. monocytogenes*, el tratamiento con electrones acelerados podría ser una alternativa para higienizar quesos madurados por mohos superficiales.



Effect of E-beam sanitation of surface mould cheese on texture and sensory attributes



Raquel Velasco^a, Juan A. Ordóñez^{a,b}, M. Concepción Cabeza^a, M. Isabel Cambero^{a,*}

^a Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Real Academia de Ciencias Veterinarias, C/ Maestro Ripoll, 8, 28006 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 September 2015

Received in revised form

18 January 2016

Accepted 7 February 2016

Available online 11 February 2016

Keywords:

Soft mould-ripened cheese

E-beam radiation

Sensory quality

Textural attributes

Response surface methodology

ABSTRACT

The effects of E-beam radiation at doses up to 3 kGy on mechanical and colorimetric parameters and sensory attributes of Camembert and Brie cheeses and their behaviour during storage at 4 and 14 °C were studied using response surface methodology. Immediately after treatment, no significant differences ($p > 0.05$) in adhesiveness, springiness and chewiness were found in either of the cheeses. However, hardness, cohesiveness, gumminess and breaking force decreased in Camembert cheese as the dose increased, while values for the Brie samples remained fairly constant. Nevertheless, no significant differences ($p > 0.05$) between untreated and treated samples after two weeks of storage were detected. Minor changes in the colour parameters were due to the E-beam treatment even at 3 kGy and then minimized during storage. A similar behaviour was observed in sensorial parameters. Because the dose studied was higher than that required to achieve the food safety objective according to EU and USA regulations, it was concluded that E-beam treatment is a useful method for sanitizing soft mould-ripened cheeses with negligible changes in the sensory quality and rheological properties.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In the dairy industry, cheeses have become predominant consumer goods for a large proportion of the population and their production has emerged as one of the most important activities in this sector. Indeed, more than a third of US milk production is used for cheese manufacture (IDFA, 2010). However, the hygienic status of some cheeses can sometimes be threatened by the contamination of food-borne pathogens, of which *Listeria monocytogenes* has been reported to be of the most concern in soft mould-ripened cheeses (CDC, 2013; EFSA, 2015). Since irradiation technology is an effective method for inactivating pathogens in food, as previously demonstrated in meat products (Zhu, Du, Cordray, & Ahn, 2005), we explored the possibility of using E-beam radiation at doses lower than 3 kGy for the sanitation of Camembert and Brie cheese varieties with successful results (Velasco, Ordóñez, Cambero, & Cabeza, 2015).

However, the radiation of dairy products has often been considered as an inappropriate technique since it can lead to the

development of undesirable off-flavours after treatment (Arvanitoyannis & Tserkezou, 2010). Probably for this reason, few papers can be found in the literature on the radiation of dairy products and all of them report that this technology gives rise to both off-odours and off-flavours. For example, chocolate ice cream irradiated at 4 kGy presented an unpleasant (mainly rancid) taste (Adeil Pietranera, Narvaiz, Horak, & Kairiyama, 2003); vanilla ice cream at doses above 3 kGy showed unfavourable changes in flavour and taste (Kim et al., 2008); thiobarbituric acid-values increased in irradiated Cheddar cheese at 4 kGy (Seisa et al., 2004), which could indicate the acceleration of oxidation phenomena. Nevertheless, it seems that lower radiation doses than those mentioned above do not affect the composition of several cheese products (Konteles, Sinanoglou, Batrinou, & Sflomos, 2009; Seisa et al., 2004). In a previous work, it has recently been reported that the absorbed doses required to meet the food safety objective (FSO) according to EU and USDA criteria for *L. monocytogenes* were 1.27 and 2.59 kGy, respectively. The bacterial load, mainly of lactic acid bacteria, was reduced by the treatment but injured cells were recovered during storage at 14 °C. Moreover, the radiation treatment gave rise to negligible changes in the pH and water activity at doses required to achieve microbial safety (Velasco et al., 2015).

* Corresponding author.

E-mail address: icambero@ucm.es (M.I. Cambero).

Therefore, the objective of this study was to evaluate the texture and sensory changes of Camembert and Brie cheeses stored at 4 and 14 °C after E-beam application in order to confirm the suitability of this technology for sanitizing these cheese varieties at doses up to 3 kGy.

2. Material and methods

2.1. Sample preparation and irradiation treatment

Brie and Camembert cheeses made from pasteurized milk, acquired at a local supermarket, were divided in portions (about 30 g). Then, samples were vacuum-packaged (2 cm of thickness) in 20 × 20 cm laminated film bags of low gas permeability (oxygen transmission rate of 35 cm³/24 h m²·bar and 150 cm³/24 h m²·bar to carbon dioxide) until vacuum reached 20 kPa. Once the samples were ready, they were treated in the irradiation plant (IONISOS IBERICA, S.A., Tarancón, Spain) under an electron beam radiation source, which operates at 10 MeV. The radiation doses employed were between 1 and 3 kGy. The dose absorbed by samples was checked by determining the absorbance of cellulose triacetate dosimeters (ASTM, 2000) simultaneously irradiated with samples. Experiments were carried out in triplicate at room temperature (18–20 °C). The product temperature increased less than 2 °C during treatment. Following the treatment, samples were transferred to the laboratory where analyses corresponding to day 0 were performed. The remaining samples were stored at 4.0 ± 0.5 °C and 14.0 ± 0.2 °C (the latter as an example of temperature abuse) to study the behaviour of selected characteristics over time.

2.2. Texture analysis

The effect of E-beam radiation on the texture of cheeses and how it changes during storage were examined through a puncture test and a texture profile analysis (TPA). Both analyses were carried out at 25 °C using a TA.XT2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with the Texture Expert program. Cheeses were sampled on day 0, 15 (two weeks) and 42 days (six weeks) of storage at 4 and 14 °C, using five samples in each analysis. The puncture test, used to examine the breaking force, was conducted as reported elsewhere (Herrero, Cambero, Ordóñez, de la Hoz, & Carmona, 2009) in cheese rind and core aliquots separately. To obtain both samples, a scalpel was introduced into the area of colour change and the rind was removed from the core. The TPA was carried out in complete samples (core and ring together) according to Velasco, Ordóñez, Cabeza, Hoz, and Cambero (2011), and hardness, springiness, adhesiveness, cohesiveness, gumminess and chewiness parameters were calculated.

2.3. Colour analysis

Colour determination was conducted as reported in previous research (Velasco et al., 2011), just after the sample radiation and past three weeks of storage at 4 and 14 °C. Three portions of both cheese types were used for each E-beam treatment (0–3 kGy). The *L** (lightness), *a** (redness) and *b** (yellowness) parameters were measured ten times on the sample surface at periods of 0, 4, and 24 h after opening the pack (air exposure time, AET).

2.4. Sensory analysis

A triangular test, performed as described by Velasco et al. (2011), was carried out at different days during storage at both temperatures (4 and 14 °C) to study the behaviour of appearance, flavour

and odour of samples treated at 0, 1, 2 and 3 kGy. In addition, panellists were asked to justify their answer with brief descriptions.

2.5. Experimental design and statistical analysis

Experimental design and statistical analysis was carried out using a Statgraphics Centurion XVI for Windows (Statistical Graphics Corporation, Rockville, MD, USA). The experimental units corresponded to the individual cheese portion (about 30 g). The effects of the E-beam treatment (four levels: 0, 1, 2 and 3 kGy), the storage temperature (two levels: 4 and 14 °C) and storage time [three levels for texture analysis (0, 2 and 6 weeks) and two levels for colour and sensory analysis (0 and 3 weeks)] on the textural and sensory properties of Camembert and Brie cheeses were analysed by employing a factorial experimental design [(4 × 2 × 3 (for texture) or 4 × 2 × 2 (for sensory analysis)]. The data were analysed by means of a model for three-way factorial analysis for textural and sensory parameters:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + C_k + (AC)_{ik} + (BC)_{jk} + (ABC)_{ijk} + \varepsilon_{ijk} \quad (1)$$

where *Y* is the data observed, μ is the general mean, *A*, *B*, *C* and their combinations are the main effects and ε is the residual error.

In the case of colour analysis, in addition to factors already mentioned the influence of AET was also studied (three levels: 0, 4 and 24 h).

The combinations of the variables or factors (E-beam treatment, temperature and time of storage, AET) were replicated in triplicate.

After checking the goodness of fit of the texture and colour analysis data to a normal distribution (90% confidence) using the Shapiro–Wilks test, simultaneous effects produced by the factors or their combinations (E-beam treatment, temperature and time storage and AET) on binding textural and colour parameters of both cheeses studied were analyzed.

MANOVA tests were conducted to determine if mentioned effects were significant (Wilk's lambda *p*-value < 0.05) on the whole TPA parameters or colour parameters, since they are measured simultaneously in each TPA or colour analysis assay. In affirmative cases, multifactor ANOVA were performed with data of each parameter to determine which effects were significant (*p* < 0.05). In Puncture Test analysis, only the multifactor ANOVA was carried out after the Shapiro–Wilks test.

To describe the effects of both E-beam radiation and storage on textural and colour parameters, surface models were obtained by a regression analysis to estimate the response function as is shown below:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

where *Y* is the predicted response (estimated texture and colour parameters), β_0 , β_i , β_{ii} and β_{ij} are the coefficients estimated from regression. They represent the linear, quadratic and cross-product effects of applied dose (*X*₁), storage time (*X*₂), storage temperature (*X*₃) and, in the colour analysis, AET (*X*₄) on the response.

ANOVA was applied to test the statistical significance of each factor introduced in the model and non-significant factors, with a confidence level of 95% (*p* > 0.05), were gradually eliminated.

In order to check the goodness of fit of models, Root Mean Square Error (RMSE) was also calculated by using 30 randomly selected data from experimental units treated and stored at the different levels described above according to the following equation:

$$RMSE = \sqrt{(1/n) \sum (Y - Y_{obs})^2} \quad (3)$$

where Y is the predicted data, Y_{obs} the result obtained in the experimental analyses and n the number of samples.

To establish the significance level of the triangular test results, the tables of the minimum number of panellists with correct answers were used (Pedrero & Pangborn, 1989).

3. Results and discussion

3.1. Texture analysis

Table 1 shows the combined effect of E-beam treatment and storage conditions (time and temperature) on textural attributes of Camembert and Brie cheeses. The multifactor ANOVA results indicated significant interactions ($p < 0.05$) between doses and storage time and/or temperature in the case of the rind and core BF (Table 1) and hardness, cohesiveness and gumminess (data not shown). Therefore, the impact of the E-beam treatment on the above rheological parameters was affected by the storage conditions (mainly by the storage time). A complete second-order polynomial model was used to evaluate the relationship between the interaction effect of E-beam and storage conditions on textural attributes of both cheeses. Core BF and cohesiveness models which presented a lower goodness of fit ($R^2_{adj} < 0.85$) were discarded. Therefore, Table 2 only shows the significant ($p < 0.05$) regression coefficients of models with R^2_{adj} between 0.86 and 0.96 (rind BF, hardness and gumminess). To determine differences between predicted values and observed values, the RMSE was calculated for rind BF, hardness and gumminess models of both cheese samples (Table 2). The results confirmed acceptable goodness of fit of the models.

For a better understanding of the combined effects, the estimated response surfaces for rind BF of both cheeses are shown in Fig. 1. In this figure, it can be observed that the higher the dose, the lower the BF ($p < 0.05$) immediately after treatment. The experimental rind values for this parameter achieved an average value of 4.50 ± 0.50 N and 4.60 ± 0.42 N for untreated Camembert and Brie cheese respectively while values for samples treated at 3 kGy were 2.47 ± 0.31 N (Camembert) and 3.17 ± 0.24 N (Brie). During the first three weeks of storage, the rind BF dropped sharply particularly in the case of non-irradiated cheeses stored at 4 °C (from 4.50 ± 0.50 N to 0.43 ± 0.88 N and from 4.60 ± 0.42 N to 0.42 ± 0.11 N in Camembert and Brie, respectively). In general, at the end of storage (six weeks), the BF of control samples were significantly lower ($p < 0.05$) than those exhibited by irradiated cores.

On the other hand, the BF behaviour of the cores in both cheeses showed a similar trend. In general, the BF of the cores diminished gradually during storage. However, and depending of the dose

applied, the values of non-irradiated samples from Camembert cheese were significantly lower ($p < 0.05$) after six weeks (data not shown). Regarding the interaction between dose and storage time (Table 1 and Fig. 1), radiation seems to attenuate the loss of resistance to penetration of the cheeses during storage.

A combination of the structural differences between rinds and cores and the effect of radiation on enzymes could explain these findings. Hence, the results from day 0 seem to confirm the work of Ham et al. (2009), who reported that the amount of α_{S1} -casein in “Queso Blanco” cheese subjected to gamma irradiation decreased proportionally with the dose applied. Likewise, Seisa et al. (2004) postulated that differences in the development of the peptide profile of irradiated Cheddar cheese are due, in part, to protein degradation by radiation. Regarding the faster decrease in the rinds BF during storage Guizani, Kasapis, Al-Attabi, and Al-Ruzeiki (2002) reported that the lipolytic and proteolytic activities of fungal enzymes in the rind are about twice the intensity of those occurring in the paste since the mould concentration is higher on the surface than inside. In addition, the cushioning effect of E-beam irradiation observed during storage might be due to two different mechanisms. On the one hand, there could be less proteolysis in treated samples due to changes in either the protein conformation of enzymes or substrates induced by radicals from water radiolysis, which might have an inhibitory effect until these radicals are recombined to form water molecules again (Seisa et al., 2004). The second possibility, it may be due to the cross-linking of caseinates derived from radiation, which is favoured by the presence of calcium (Kuan, Bhat, Patras, & Karim, 2013).

In Fig. 2, the effects of E-beam treatment and storage time at 4 °C on TPA parameters are shown. Similar results were observed in both cheeses when stored at 14 °C (data not shown). No significant differences ($p > 0.05$) attributable to E-beam treatment in adhesiveness, springiness and chewiness of both cheeses were found (data not shown). In the Brie cheese, just after treatment, no effects on hardness were observed for non-irradiated (17.68 ± 0.82 N) and treated samples even when 3 kGy (17.71 ± 0.8 N) were applied. However, a minor, but significant ($p < 0.05$), influence of the dose was appreciated in the Camembert cheese (27.96 ± 1.00 N vs. 21.25 ± 1.80 N). It can be concluded that, in general, the application of E-beam had barely any effect on the hardness. During storage at both temperatures, a significant softening ($p < 0.05$) was observed, which was more pronounced in the Camembert cheese. This finding confirms those observed in the puncture test, since the outer surface layer (the rind) is the first structure that makes contact with the probe when the analysis is performed. A softening by radiation has been recorded previously in cheese slices (Velasco et al., 2011) while other authors did not observe textural differences between radiated and untreated cheeses in some varieties, such as Feta (Konteles et al., 2009) and smear-ripened (Ennahar et al., 1994) cheeses. The gumminess (Fig. 2) of both cheeses displayed a similar pattern to that of the hardness although the absolute data were certainly different. For cohesiveness (data not shown) the lowest values ($p < 0.05$) were recorded in Camembert samples subjected to higher doses (2 and 3 kGy). During the first third of storage time, this parameter remained fairly constant, but later a decrease was observed, which was dependent on the interaction dose-storage time ($p < 0.005$) and time-temperature of storage ($p < 0.0005$), in such a way that samples (control and treated) stored at the same temperature showed similar values ($p > 0.05$) of cohesiveness after two weeks of storage, with higher values being recorded in samples stored at 4 °C (0.35 ± 0.04 N) than those kept at 14 °C (0.15 ± 0.03 N). In summary, it could be concluded that E-beam treatment has a minor effect on these rheological parameters (at least a dose lower than 3 kGy) which can barely be detected by consumers.

Table 1

Effect of the storage conditions (time and temperature) and the E-beam treatment on the textural features (the puncture test breaking force and TPA parameters) of Camembert and Brie cheeses.

Cheese	Rind breaking force ^a	Core breaking force ^a	TPA ^b
Camembert	T x time*** D x time***	D x T x time*	T x time*** D x time***
Brie	T x time* D x time***	D x time**	T x time*** D x time**

Factors: time, T and D denote storage time (day), storage temperature (°C) and E-beam treatment dose (kGy), respectively.

^a Multifactor ANOVA p-value:***p < 0.0005; **p < 0.005; *p < 0.05.

^b MANOVA Lambda Wilk's p-value:***p < 0.0005; **p < 0.005; *p < 0.05.

Table 2
Coefficients ($p < 0.05$) and goodness of fit (R^2 and RMSE) of Response Surface Models of selected textural attributes of Camembert (C) and Brie (B) cheeses.

		Rind breaking force	Hardness	Gumminess
R ² adjusted	C	0.89	0.94	0.89
	B	0.96	0.96	0.90
RMSE	C	0.48	2.16	1.32
	B	0.33	0.95	0.68
Constant	C	4.10	25.18	12.86
	B	4.28	17.33	6.57
Linear effects				
D ^a	C	-0.457	-0.95	-1.41
	B	-0.316	–	0.39
time	C	-0.268	-1.49	-0.64
	B	-0.323	-0.63	-0.15
T	C	–	–	-0.11
	B	–	–	–
Quadratic effects				
(D) ²	C	–	–	–
	B	–	–	–
(time) ²	C	0.004	0.023	0.009
	B	0.005	0.010	0.002
(T) ²	C	–	–	–
	B	–	–	–
Cross-product effects				
D · time	C	0.015	0.051	0.051
	B	0.010	–	-0.016
D · T	C	–	–	–
	B	–	–	–
time · T	C	–	-0.005	-0.002
	B	–	-0.003	–
D · time · T	C	–	–	–
	B	–	–	–

^a Factors: D, time and T denote E-beam treatment dose (kGy), storage time (day), and storage temperature (°C), respectively.

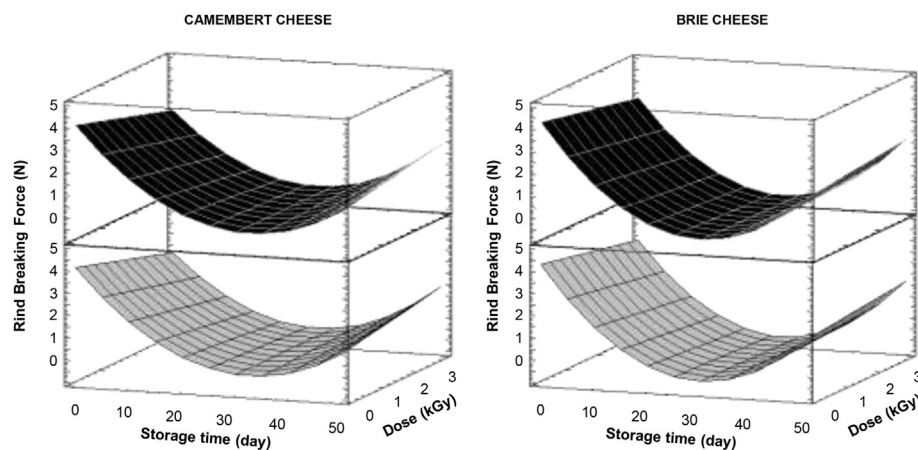


Fig. 1. Effect of dose radiation (0–3 kGy) and storage time at 4 °C (grey) and 14 °C (black) on the breaking force (BF) of the rind from Camembert and Brie cheeses.

Several authors (Spinnler & Gripon, 2004) reported that textural changes of Camembert cheeses during ripening are due to calcium migration in response to the pH gradient and to the activities of fungal and rennet enzymes. Calcium phosphate precipitates at the typically high pH of these cheese rinds. Then, the calcium of the core migrates to the surface to restore the equilibrium, causing a destabilization of the micelles and a consequent softening of the cheese (McSweeney, 2004). The changes observed in the texture of the untreated and treated samples could be related to this phenomenon.

3.2. Colour analysis

3.2.1. Effect of E-beam treatment and storage conditions on the cheese rind

The colour parameters of samples were also determined in core and rind portions. Analyses were performed immediately following E-beam treatment (day 0) and after three weeks of storage at 4 °C or 14 °C. Measurements were made immediately after opening the vacuum package and after the exposure to air for 4 and 24 h. The MANOVA results (Table 3) showed significant interactions ($p < 0.05$) between the effects of the selected factors (E-beam treatment, time and temperature and air exposure time (AET)). Therefore, the effect of the radiation was also dependent on the storage conditions, which seems to confirm the results previously found in other irradiated foods, namely fresh pork loin (García-

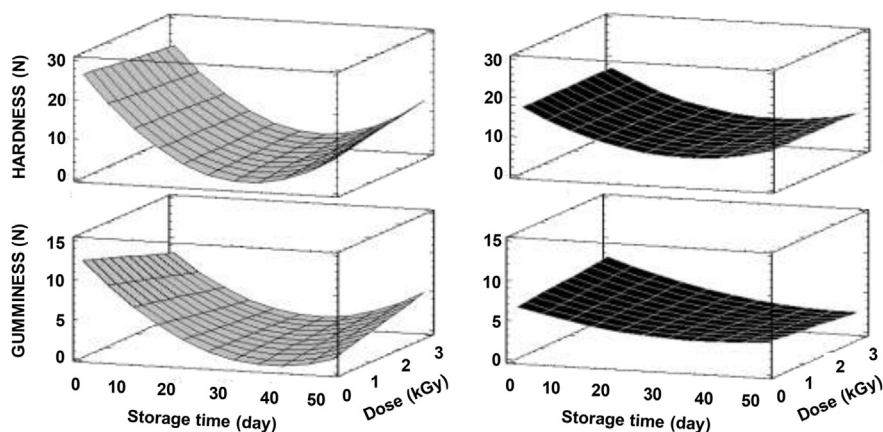


Fig. 2. Selected Texture profile analysis (TPA) parameters of Camembert (grey) and Brie (black) cheeses affected by E-beam treatment (0–3 kGy) and storage time at 4 °C.

Table 3

Influence of the storage factors (time and temperature), the exposure to air and the E-beam treatment on the CIELab colour parameters of Camembert and Brie cheeses.

	Camembert	Brie
Rind	time x AET*** T x time***	time x AET x D*** T x time***
Core	T x time x D* T x time x AET*	T x time x D*** AET x D*

Factors: AET, time, T and D denote air exposure time (hours), storage time (day), storage temperature (°C) and E-beam treatment dose (kGy), respectively. Significance (MANOVA Lambda Wilk's p-value): ***p < 0.0005; **p < 0.005; *p < 0.05.

Márquez, Cambero, Ordóñez, & Cabeza, 2012).

As the results in both temperatures were similar, data for 4 °C were only presented in Fig. 3. In this figure, the effects of the selected factors on the lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*) of rind are shown. The respective regression equations were shown in the supplementary data (Table S1). The most remarkable effect of E-beam alone (day 0, AET 0 h) was the elevation ($p < 0.05$) in these parameters as the radiation dose increased. The increase in lightness was also observed in irradiated Anthotyros cheese (Tsiotsias, Savvaidis, Vassila, Kontominas, & Kotzekidou, 2002), although no changes were detected in conventional cheese slices (Velasco et al., 2011) and even a decrease in this parameter due to radiation treatment was reported in sliced and pizza cheeses (Kim et al., 2010) and Feta cheese (Konteles et al., 2009). Likewise, the oxidation of pigments by exposure to light has been considered to possibly explain the higher redness of Havarti (Kristensen, Orlien, Mortensen, Brockhoff, & Skibsted, 2000) and semi-hard (Juric, Bertelsen, Mortensen, & Petersen, 2003) cheeses.

However, the effect of AET was noticeable. Briefly, it can be said (Fig. 3).

- A fairly similar trend was observed at both storage temperatures.
- The lightness continuously decreased as AET elapsed but the higher the radiation dose the lower the decrease, which was clearer in Camembert cheese.
- In Brie cheese, the redness values remained quite constant during AET but those of the Camembert were clearly higher as the radiation dose increased either decreasing later when samples were stored at 4 °C or remaining at the same level at 14 °C (data not shown).
- The yellowness suffered a slight increase in the Camembert cheese during the first half of the AET to be restored afterwards.

The same pattern was observed in Brie when the dose applied was 3 kGy but, at lower doses, an increase during the AET was produced reaching the same level as samples treated at 3 kGy after 20 h of exposure to air.

3.2.2. Effect of E-beam treatment and storage conditions on the cheese core

Fig. 4 shows the response surface plots for the effects on the core colour parameters (L^* , a^* and b^*) of dose and AET in different times of storage at 4 °C. These parameters showed a similar trend in both cheeses although either values were slightly different between cheeses [e.g. the average value for L^* figures at day 0 after opening the package were 87.64 ± 2.05 for Camembert and 88.22 ± 1.93 for Brie] or, in some cases, significant effects were observed [e.g. similar a^* values (-3.44 ± 0.14 ; $p > 0.05$) immediately after the package opening (Fig. 4, day 0) were observed in Camembert cheese (untreated and treated) while in Brie (Fig. 4, day 0) a significant increase (-4.55 ± 0.24 to -3.07 ± 0.16 ; $p < 0.05$) was found]. Accordingly, the effects of the selected factors in this study on the colour parameters of both cheeses may be summarized as follows:

- The E-beam treatment had very little effect on the lightness (L^*). No significant changes ($p > 0.05$) in this parameter were due to the E-beam radiation (Fig. 4, day 0) but a decrease was produced later during the AET, which was more marked at 14 °C mainly in the Camembert cheese (data not shown). In both cheeses, an inverse relationship between the decreasing intensity in L^* values and the doses was detected. The increase in lightness by the radiation may be related to a slight syneresis of the cheese mass by the treatment followed by a gradual release of fat, which could result in an increase in L^* values although it has also been attributed to the water expelled to the surface from the cheese body (Tsiotsias et al., 2002).
- A decrease in the first half of AET was noticed in the redness (a^*) to be almost restored to initial values afterwards. This behaviour was less balanced in the Brie variety since the values showed greater variations.
- An opposite effect to the redness was observed in the yellowness (b^*), i.e. an increase in the first half of AET to diminish over the next few hours. No important differences were observed between the storage temperatures.

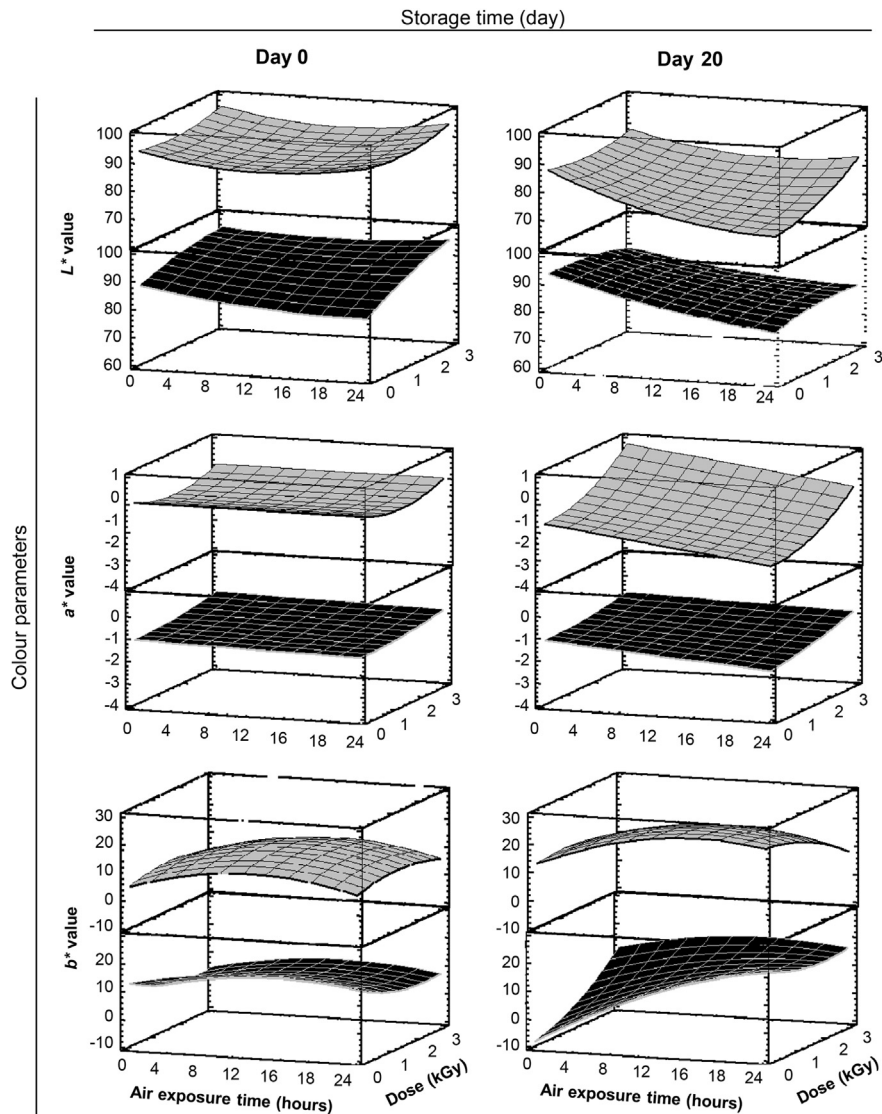


Fig. 3. Combined effect of dose radiation and exposure time to air on lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*) of Camembert (grey) and Brie (black) rind at different times of storage at 4 °C.

3.3. Sensory analysis

The impact of irradiation dose on the sensory aspects of cheeses is shown in Table 4. A triangular test was carried out immediately after E-beam treatment (day 0) and after 3 weeks of storage at 4 and 14 °C to check their stability over time. The objective of this study was to determine the dose to be applied to sanitize the surface mould ripened cheeses without significantly changing in the sensory attributes. Therefore, the experiments were performed to compare non-irradiated samples with samples E-beam treated at 1, 2 and 3 kGy. For this reason, differences between doses are not described.

Although minor changes in the colour of both cheeses were instrumentally detected, no significant differences ($p > 0.05$) in the appearance were observed by the panellists in the triangular test at day 0 and also after three weeks of storage. These results are in agreement with those reported in Camembert (Chincholle, 1991), Feta (Konteles et al., 2009) and Karish (Aly, Farag, & Galal, 2012) cheeses treated with the different dose (from 2.5 to 5 kGy).

In relation to the odour and flavour (Table 4), panellists found

significant differences ($p < 0.05$) between treated and untreated samples immediately after the E-beam radiation, which were justified by a slight aroma and a taste of burnt plastic, muddy or metallic notes in radiated samples, even at doses of 1 kGy. This treatment effect diminished during storage and, after three weeks, only significant differences ($p < 0.05$) could be detected between the controls and samples E-beam treated at 3 kGy in both cheeses. These results were observed in the samples stored at both storage temperatures (4 and 14 °C). Several authors have described the reversibility of sensory changes caused by radiation in different varieties of cheese (Konteles et al., 2009; Tsiotsias et al., 2002; Velasco et al., 2011). Hence, Seisa et al. (2004) matched the pungent taste detected just after treatment in irradiated Cheddar cheese with the presence of hydroxyl radicals, which decline progressively. Furthermore, it is likely that the effects due to radiation could be overlapped by sapid substances derived from the metabolism of *P. camemberti*, which, in turn, gives rise to a uniformity of both odour and flavour of samples. In this sense, it is well known that the ammonia concentration over storage increases even at refrigeration temperatures, as has been repeatedly reported

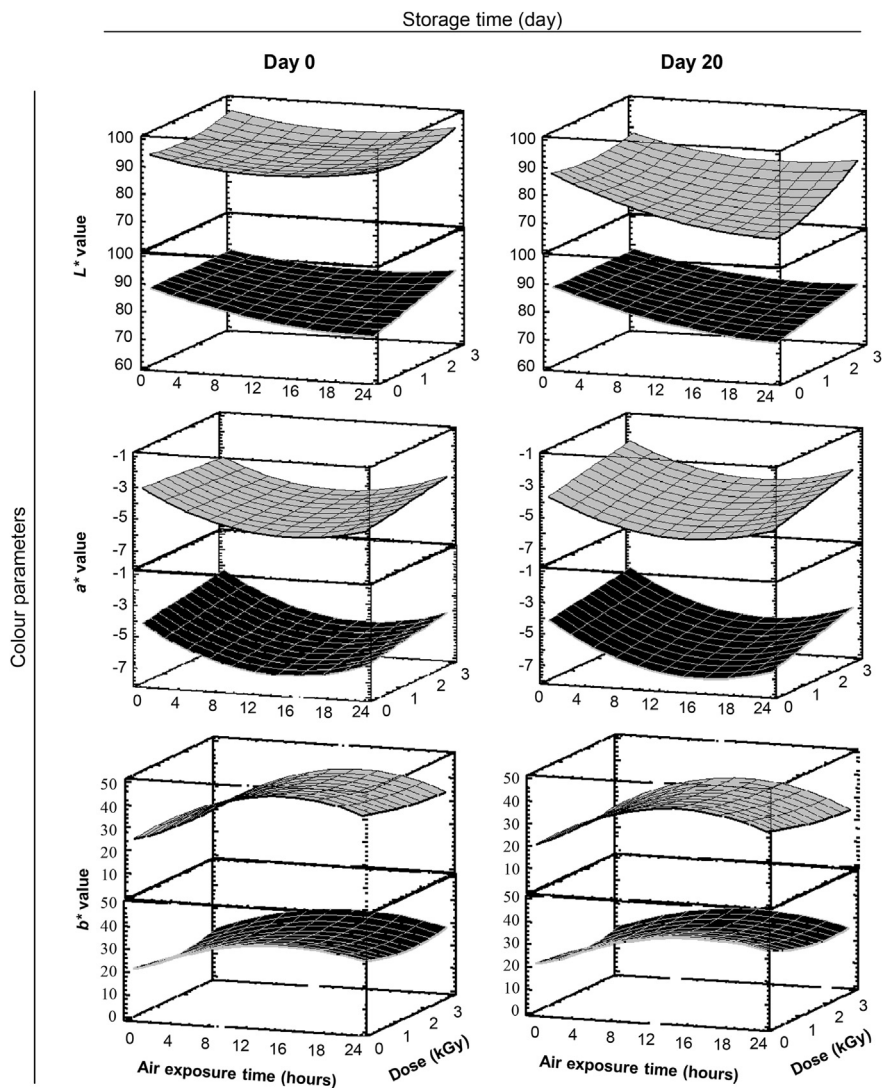


Fig. 4. Combined effect of dose radiation and exposure time to air on lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*) of Camembert (grey) and Brie (black) core at different times of storage at 4 °C.

Table 4

Sensory characteristics of untreated and irradiated Camembert (C) and Brie (B) cheese that showed significant differences ($p < 0.05$) in the triangular test after treatment (day 0) and elapsed three weeks of storage at 4 or 14 °C.

	Storage conditions		
	Day 0	4 °C (3 weeks)	14 °C (3 weeks)
0 vs. 1 kGy	O _{C,B} –F _{C,B}		
0 vs. 2 kGy	O _{C,B} –F _{C,B}		
0 vs. 3 kGy	O _{C,B} –F _{C,B}	O _{C,B} –F _{C,B}	O _{C,B} –F _{C,B}

A, O, F: Significant differences ($P < 0.05$) for appearance, odour and flavour respectively.

previously (Gripou, 1997). Detectable flavour changes, described as burnt or musty, have also been reported (Jones & Jelen, 1988) in Camembert cheese when 0.3 kGy were applied. However, Chincholle (1991) found no significant changes in the flavour of Camembert cheese (made from raw milk) irradiated with doses up to 2.5 kGy.

The preservation of the appearance of non-irradiated cheese is essential from a market perspective because consumer choice is based on the first perceived attribute, especially in products

packaged in transparent films. In the case of radiated cheeses, it seems that the odour and flavour of irradiated samples are practically restored during storage time, at least when doses lower than 3 kGy have been used. Therefore, sensorial differences with the non-treated cheeses would become negligible. Although slight changes in irradiated samples have been detected, it is necessary to bear in mind that *P. camemberti* is endowed with powerful enzyme activities (Cerning, Gripou, Lamberet, & Lenoir, 1987) causing pronounced changes in the appearance, odour and flavour of cheeses during the ripening process to the point that great sensorial differences are observed between cheeses from the same variety produced by different brands and even from the same manufacturer depending on the time of ripening. It is, therefore, possible that sensory differences between conventional cheeses could be of greater magnitude than those described in the present work for E-beam treated samples and their controls. Therefore, consumers may hardly detect the slight sensorial changes caused by the radiation at doses necessary to guarantee the safety in relation to *L. monocytogenes*.

4. Conclusions

In general, the effect of E-beam radiation at doses up to 3 kGy on the texture and colour parameters gave rise to minimal changes, which are attenuated during storage. The minor changes in sensory characteristics detected in treated samples diminished during storage in such a way that after three weeks no significant differences between untreated and treated samples at doses even at 2 kGy were noticed by panellists.

Acknowledgements

The present work has been supported by Projects AGL2010-19158 and CARNISENUSA (CSD0007-00016) and the Group 920276 of the Complutense University of Madrid. Author R. Velasco was the beneficiary of a grant financed by the former CARNISENUSA project.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.020>.

References

- Adeil Pietranera, M. S., Narvaiz, P., Horak, C., & Kairiyama, E. (2003). Irradiated ice creams for immunosuppressed patients. *Radiation Physics and Chemistry*, 66, 357–365.
- Aly, S. A., Farag, D. E., & Galal, E. (2012). Effect of gamma irradiation on the quality and safety of Egyptian karish cheese. *Journal of American Science*, 8, 761–766.
- Arvanitoyannis, I. S., & Tserkezou, P. (2010). Application of irradiation on milk and dairy products. In *Irradiation of food Commodities: Techniques, applications, detection, legislation, safety and consumer opinion* (pp. 265–285). London: Academic Press.
- ASTM. (2000). E1650-97e1 standard practice for use of cellulose acetate dosimetry systems. *ASTM*, 12, 2 (West Conshohocken, PA, USA).
- CDC. (2013). Multistate outbreak of listeriosis linked to Crave Brothers Farmstead cheeses. <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-07-13/index.html> Accessed 15.07.2015.
- Cerning, J., Gripon, J. C., Lamberet, G., & Lenoir, J. (1987). Les activités biochimiques des *Penicillium* utilisés en fromagerie. *Le Lait*, 67, 3–39.
- Chincholle, R. (1991). Action of the ionization treatment on the soft cheese made from unpasteurized milk. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France*, 77, 29–35.
- EFSA. (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 13, 3991.
- Ennahar, S., Kuntz, F., Strasser, A., Bergaentzle, M., Hasselmann, C., & Stahl, V. (1994). Elimination of *Listeria monocytogenes* in soft and red smear cheeses by irradiation with low-energy electrons. *International Journal of Food Science and Technology*, 29, 395–403.
- García-Márquez, I., Cambero, M. I., Ordóñez, J. A., & Cabeza, M. C. (2012). Shelf-life extension and sanitation of fresh pork loin by E-beam treatment. *Journal of Food Protection*, 75, 2179–2189.
- Gripon, J. C. (1997). Flavour and texture in soft cheese. In B. A. Law (Ed.), *Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk* (pp. 193–218). London: Blackie Academic & Professional.
- Guizani, N., Kasapis, S., Al-Attabi, Z. H., & Al-Ruzeiki, M. H. (2002). Microbiological, physicochemical and biochemical changes during ripening of Camembert cheese made of pasteurized cow's milk. *International Journal of Food Properties*, 5, 483–494.
- Ham, J. S., Jeong, S. G., Lee, S. G., Han, G. S., Chae, H. S., Yoo, Y. M., et al. (2009). Irradiation effect on α - and β -caseins of milk and Queso Blanco cheese determined by capillary electrophoresis. *Radiation Physics and Chemistry*, 78, 158–163.
- Herrero, A. M., Cambero, M. I., Ordóñez, J. A., de la Hoz, L., & Carmona, P. (2009). Plasma powder as cold-set binding agent for meat system: rheological and Raman spectroscopy study. *Food Chemistry*, 113, 493–499.
- IDFA. (2010). *Dairy Facts 2010*. Washington DC: International Dairy Food Association.
- Jones, T. H., & Jelen, P. (1988). Low dose-irradiation of camembert. *Cottage cheese and Cottage whey. Milchwissenschaft*, 43, 233–235.
- Juric, M., Bertelsen, G., Mortensen, G., & Petersen, M. A. (2003). Light induced colour and aroma changes in sliced modified atmosphere packaged semi-hard cheeses. *International Dairy Journal*, 13, 239–249.
- Kim, H. J., Ham, J. S., Kim, K., Ha, J. H., Do Ha, S., & Jo, C. (2010). Quality evaluation of sliced and pizza cheeses treated by Gamma and Electron beam irradiation. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 23, 1112–1117.
- Kim, H. J., Han, I. J., Choi, J., Song, B. S., Kim, J. H., Ham, J. S., et al. (2008). Physicochemical and sensory characteristics of vanilla ice cream treated by gamma irradiation. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 28, 69–75.
- Konteles, S., Sinanoglou, V. J., Batrinou, A., & Sfomos, K. (2009). Effects of γ -irradiation on *Listeria monocytogenes* population, colour, texture and sensory properties of Feta cheese during cold storage. *Food Microbiology*, 26, 157–165.
- Kristensen, D., Orlien, V., Mortensen, G., Brockhoff, P., & Skibsted, L. H. (2000). Light induced oxidation in sliced Havarti cheese packaged in modified atmosphere. *International Dairy Journal*, 10, 95–103.
- Kuan, Y. H., Bhat, R., Patras, A., & Karim, A. A. (2013). Radiation processing of food proteins — A review on the recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 30, 105–120.
- McSweeney, P. L. H. (2004). Biochemistry of cheese ripening. *International Journal Dairy Technology*, 57, 127–144.
- Pedrero, F. D. L., & Pangborn, R. M. (1989). *Evaluación sensorial de los alimentos: Métodos analíticos* (pp. 231–232). México: Alhambra Mexicana.
- Seisa, D., Osthoff, G., Hugo, C., Hugo, A., Bothma, C., & Van der Merwe, J. (2004). The effect of low-dose gamma irradiation and temperature on the microbiological and chemical changes during ripening of Cheddar cheese. *Radiation Physics and Chemistry*, 69, 419–431.
- Spinnler, H. E., & Gripon, J. C. (2004). Surface mould-ripened cheeses. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney, T. M. Cogan, & T. P. Guinee (Eds.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology, vol. 2 major cheese groups* (3rd ed, pp. 157–174). London: Elsevier Applied Science.
- Tsiotsias, A., Savvaidis, I., Vassila, A., Kontominas, M., & Kotzekidou, P. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* by low-dose irradiation in combination with refrigeration in the soft whey cheese 'Anthotyros'. *Food Microbiology*, 19, 117–126.
- Velasco, R., Ordóñez, J. A., Cabeza, M. C., Hoz, L., & Cambero, M. I. (2011). Use of the E-beam radiation to diminish the late blowing of cheese. *International Dairy Journal*, 21, 493–500.
- Velasco, R., Ordóñez, J. A., Cambero, M. I., & Cabeza, M. C. (2015). Use of E-beam radiation to eliminate *Listeria monocytogenes* from surface mould cheese. *International Microbiology*, 18, 33–40.
- Zhu, M., Du, M., Cordray, J., & Ahn, D. U. (2005). Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 4, 34–42.

Table S1. Response Surface Models equations and RMSE for CIELab colour parameters (L^* : lightness; a^* : redness; b^* : yellowness)

Sample	Response Surface Model equations for CIELab colour parameters	R ² adjusted	RMSE
Camembert (rind)	$L^* = 93.96 - 0.45 \cdot \text{time} - 0.76 \cdot \text{AET} - 2.30 \cdot D + 0.029 \cdot \text{AET}^2 + 1.03 \cdot D^2 + 0.033 \cdot T \cdot \text{time} - 0.034 \cdot \text{time} \cdot \text{AET} - 0.0007 \cdot T \cdot \text{time} \cdot \text{AET} - 0.0074 \cdot T \cdot \text{time} \cdot D + 0.0097 \cdot \text{time} \cdot \text{AET} \cdot D$	0.87	2.6
	$a^* = -0.46 - 0.52 \cdot D + 0.18 \cdot D^2 - 0.0096 \cdot T \cdot \text{time} - 0.003 \cdot \text{time} \cdot \text{AET} + 0.016 \cdot \text{time} \cdot D + 0.0002 \cdot T \cdot \text{time} \cdot \text{AET} + 0.0022 \cdot T \cdot \text{time} \cdot D$	0.79	0.8
	$b^* = 4.72 + 0.5 \cdot \text{time} + 1.11 \cdot \text{AET} + 3.53 \cdot D - 0.043 \cdot \text{AET}^2 - 1.26 \cdot D^2 - 0.028 \cdot T \cdot \text{time} + 0.014 \cdot \text{time} \cdot \text{AET} - 0.11 \cdot \text{time} \cdot D + 0.0009 \cdot T \cdot \text{time} \cdot \text{AET} + 0.01 \cdot T \cdot \text{time} \cdot D - 0.0069 \cdot \text{time} \cdot \text{AET} \cdot D$	0.72	2.7
Camembert (core)	$L^* = 88.07 - 1.20 \cdot \text{AET} + 0.029 \cdot \text{AET}^2 + 0.035 \cdot T \cdot \text{time} + 0.043 \cdot \text{AET} \cdot D - 0.002 \cdot T \cdot \text{time} \cdot \text{AET} + 0.013 \cdot T \cdot \text{time} \cdot D + 0.0008 \cdot T \cdot \text{time} \cdot \text{AET} \cdot D$	0.80	2.6
	$a^* = -3.10 - 0.32 \cdot \text{AET} - 0.073 \cdot \text{time} - 0.16 \cdot D + 0.010 \cdot \text{AET}^2 + 0.011 \cdot T \cdot \text{time} + 0.0026 \cdot \text{AET} \cdot \text{time} + 0.043 \cdot \text{time} \cdot D + 0.022 \cdot \text{AET} \cdot D - 0.0004 \cdot T \cdot \text{time} \cdot \text{AET} - 0.0037 \cdot T \cdot \text{time} \cdot D - 0.0014 \cdot \text{AET} \cdot \text{time} \cdot D + 0.0001 \cdot T \cdot \text{time} \cdot \text{AET} \cdot D$	0.63	0.6
	$b^* = 24.46 + 2.86 \cdot \text{AET} - 2.88 \cdot D - 0.09 \cdot \text{AET}^2 + 0.64 \cdot D^2 - 0.055 \cdot T \cdot \text{time} - 0.019 \cdot \text{time} \cdot \text{AET} - 0.056 \cdot \text{AET} \cdot D + 0.0024 \cdot T \cdot \text{time} \cdot \text{AET} + 0.016 \cdot T \cdot \text{time} \cdot D - 0.0008 \cdot T \cdot \text{time} \cdot \text{AET} \cdot D$	0.80	3.2
Brie (rind)	$L^* = 87.80 + 0.38 \cdot \text{time} + 4.72 \cdot D - 0.53 \cdot \text{AET} - 0.67 \cdot D^2 + 0.012 \cdot \text{AET}^2 - 0.012 \cdot T \cdot \text{time} - 0.23 \cdot \text{time} \cdot D - 0.027 \cdot \text{time} \cdot \text{AET} + 0.076 \cdot D \cdot \text{AET} + 0.004 \cdot \text{time} \cdot D \cdot \text{AET}$	0.85	2.3
	$a^* = -1.08 + 0.021 \cdot \text{time} - 0.008 \cdot \text{AET} + 0.05 \cdot D^2 - 0.006 \cdot T \cdot \text{time} - 0.0012 \cdot \text{time} \cdot \text{AET} + 0.00035 \cdot \text{time} \cdot D \cdot \text{AET}$	0.81	0.3
	$b^* = 12.62 - 1.32 \cdot \text{time} - 6.72 \cdot D + 0.77 \cdot \text{AET} + 1.38 \cdot D^2 - 0.028 \cdot \text{AET}^2 + 0.07 \cdot T \cdot \text{time} + 0.46 \cdot \text{time} \cdot D + 0.063 \cdot \text{time} \cdot \text{AET} - 0.0015 \cdot T \cdot \text{time} \cdot \text{AET} - 0.017 \cdot \text{time} \cdot D \cdot \text{AET}$	0.82	2.7
Brie (core)	$L^* = 88.22 - 1.02 \cdot \text{AET} + 0.02 \cdot \text{AET}^2 + 0.005 \cdot T \cdot \text{time} + 0.14 \cdot \text{AET} \cdot D - 0.0013 \cdot T \cdot \text{time} \cdot \text{AET} - 0.003 \cdot \text{time} \cdot \text{AET} \cdot D + 0.00028 \cdot T \cdot \text{time} \cdot \text{AET} \cdot D$	0.77	2.6
	$a^* = -4.23 - 0.37 \cdot \text{AET} - 0.055 \cdot \text{time} + 0.35 \cdot D + 0.012 \cdot \text{AET}^2 + 0.014 \cdot T \cdot \text{time} + 0.019 \cdot \text{time} \cdot D - 0.00031 \cdot T \cdot \text{time} \cdot \text{AET} - 0.0052 \cdot T \cdot \text{time} \cdot D + 0.0001 \cdot T \cdot \text{time} \cdot \text{AET} \cdot D$	0.71	1.1
	$b^* = 20.92 + 0.19 \cdot \text{time} + 1.78 \cdot \text{AET} - 4.18 \cdot D - 0.06 \cdot \text{AET}^2 + 1.48 \cdot D^2 - 0.047 \cdot T \cdot \text{time} - 0.092 \cdot \text{time} \cdot D - 0.046 \cdot \text{AET} \cdot D + 0.0013 \cdot T \cdot \text{time} \cdot \text{AET} + 0.016 \cdot T \cdot \text{time} \cdot D - 0.0006 \cdot T \cdot \text{time} \cdot \text{AET} \cdot D$	0.70	3.0

Factors: AET, time, T and D denote air exposure time (hours), storage time (day), storage temperature (°C) and E-beam treatment dose (kGy), respectively.

ARTÍCULO 4:

The impact of E-beam treatment on the microbial population and sensory quality of hard annatto-coloured cheese

Velasco, R., Cambero, M.I., Ordóñez, J.A., Cabeza, M.C.

LWT – Food Science and Technology, 2019, 101:315-322.

Índice de impacto (JCR, 2019): 4,006

Posición de la revista en el área *Food Science and Technology*: 28/139 (Q1)

RESUMEN:

Se ha estudiado el efecto de un tratamiento con electrones acelerados a dosis de hasta 3 kGy en la microbiota y en las propiedades sensoriales (color, textura, apariencia, olor, sabor) de un queso duro de color naranja, tipo Cheddar, por adición de achiote (E 160), a lo largo del almacenamiento a 4 y 14 °C.

El tratamiento de irradiación redujo, aun a dosis bajas, los recuentos de aerobios totales. En las muestras tratadas con dosis de hasta 2 kGy, la microbiota se recuperó a los niveles iniciales incluso a temperaturas de refrigeración, mientras que tras la aplicación de una dosis mayor (3 kGy) tal recuperación solo se produjo en las muestras almacenadas a 14 °C.

Los resultados del análisis de textura mostraron una disminución en la dureza y en la cohesividad en las muestras irradiadas *vs.* control, mientras que en el resto de parámetros las diferencias no fueron significativas. En cuanto al color, la tendencia al rojo y al amarillo del queso disminuyeron con la dosis aplicada. No obstante, y dada la variación de color existente entre las distintas marcas comerciales de este tipo de quesos, difícilmente provocaría el rechazo de los consumidores. El olor y sabor del queso se vieron afectados por el tratamiento. Sin embargo, a dosis inferiores a 2 kGy, estas modificaciones desaparecieron progresivamente durante el almacenamiento.



The impact of E-beam treatment on the microbial population and sensory quality of hard annatto-coloured cheese



Raquel Velasco^{a,*}, M. Isabel Cambero^a, Juan A. Ordóñez^{a,b}, M. Concepción Cabeza^a

^a Sección Departamental de Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de Hierro, s/n, 28040, Madrid, Spain

^b Real Academia de Ciencias Veterinarias, C/ Maestro Ripoll, 8, 28006, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

E-beam radiation
Hard cheese
Annatto
Microbiota response
Sensorial attributes

ABSTRACT

The effects of E-beam radiation on microbiota, colour, texture and sensorial properties of hard annatto-coloured cheese during storage at 4 and 14 °C were studied. Doses of up to 2 kGy provoked a decrease in the total bacterial number, although microbiota recovery to initial levels during storage, even under refrigeration temperature, was observed. However, a higher temperature (14 °C) was required to detect bacterial growth in cheese treated at 3 kGy. Moreover, the effects of the dose on the hardness, springiness, cohesiveness and colour parameters were interdependent of the storage conditions. According to the combined effects of E-beam treatment and storage conditions, multivariate cluster analysis allowed treated cheeses irradiated at 0–1 kGy (cluster 1) to be distinguished from those irradiated at 2–3 kGy (cluster 2), which were stored at 4 °C for 28 days. Cluster 3 included irradiated cheeses (1–3 kGy) stored at a higher temperature (14 °C). Although off-odour and off-flavours arose immediately after treatment, they disappeared progressively during storage at doses lower than 2 kGy. Nevertheless, consumers could detect changes in the colour derived from the radiation at 2 kGy, however, those changes may be unimportant because of the wide colour ranges of commercial annatto-coloured cheeses.

1. Introduction

Hard cheese varieties are the most produced and consumed in the world, accounting for approximately 45% of the total volume of cheese produced in the EU and the USA, according to official statistics (EC Milk Market Observatory, 2017; USDA-NASS, 2017). Its hygienic quality, however, can be sometimes compromised by the growth of several pathogens (e.g., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* or *Escherichia coli*) due to the inadequate management of the storage temperature. This scenario is heightened when whole cheese is transformed into portions, slices or grated since this operation involves additional handlings that increase the risk of contamination with pathogens present in the industrial environment. Moreover, although the long ripening times of hard cheeses yield a microbiologically safe product, since a decrease of the pH and the water activity occurs during ripening (Brooks et al., 2012), they may be launched to the market at an intermediate ripening state. In fact, a prevalence of *L. monocytogenes* at a level of 0.2% (n = 1242) in hard cheese samples (Little, Sagoo, Gillespie, Grant, & McLauchlin, 2009) has been observed in the UK. Additionally, a contamination with this bacterium prompted a large recall of dry cheese in Canada and the USA in 2017 (CFIA, 2017a; FDA, 2017). Likewise, the survival of *E. coli* O157:H7 (Schlesser et al., 2006),

L. monocytogenes (Ryser, 2007) and *Salmonella* spp. (Wood, Collins-Thompson, Irvine, & Myhr, 1984) in Cheddar cheese after 60 days of ripening has been reported. Even, a *S. Typhimurium* outbreak was linked to the former cheese type after the legally required holding period (D'Aoust, Warburton, & Sewell, 1985). Similar considerations may be made in relation to other hard cheese varieties, e.g., Swiss cheese (Zweifel et al., 2010) and Comté (CFIA, 2017b).

Ionizing irradiation has proven to be an effective non-thermal technology for the sanitation of a variety of foods, mainly to reduce *L. monocytogenes* in several ready-to-eat foods (Cabeza, Cambero, de la Hoz, & Ordóñez, 2007; Medina et al., 2009). Due to the reported higher radioresistance of *L. monocytogenes* in comparison to *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. (Mahapatra, Muthukumarappan, & Julson, 2005), researchers have used *L. monocytogenes* as a model in studies directed to obtain a microbiologically safe product via E-beam application. Doses of up to 3 kGy allow control of *L. monocytogenes* in different cheese varieties (Kim et al., 2007; Konteles, Sinanoglou, Batrinou, & Sflomos, 2009; Velasco, Ordóñez, Cambero, & Cabeza, 2015).

However, there are some discrepancies regarding the occurrence of off-odours and depreciation of sensorial quality due to the application of ionizing radiation on dairy foods (Odueke, Farag, Baines, & Chadd, 2016). Therefore, this work aimed to assess the E-beam irradiation

* Corresponding author.

E-mail address: rvelasco@ucm.es (R. Velasco).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.045>

Received 19 August 2018; Received in revised form 2 November 2018; Accepted 11 November 2018

Available online 12 November 2018

0023-6438/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1
Full factorial design followed in the analysis of the characteristic variables of the experiment.

Characteristics variables	Experimental unit (size, cm)	Design	Factor ^a						
			D (kGy)		T (°C)		time (day)		AET (h)
Microbiota	slice (3 × 3 x 0.2)	Level	4	x	3	x	8	x	1
Total viable counts		Factor values	0,1,2,3		4,10,14		0–60		0
Colour	block (5 × 10 x 1)	Level	4	x	2	x	3	x	3
Lightness		Factor values	0,1,2,3		4,14		0,14,28		0,4,24
Redness									
Yellowness									
Texture	block (10 × 10 x 1.5)	Level	4	x	2	x	3	x	1
Hardness		Factor values	0,1,2,3		4,14		0,14,28		0
Cohesiveness									
Springiness									
Adhesiveness									
Sensory analysis	slice (3 × 3 x 0.2)	Level	4	x	2	x	3	x	1
Odour		Factor values	0,1,2,3		4,14		0,14,28		0
Flavour									
Appearance									
Acceptability									

^a Factors D, T, time and AET denote irradiation dose (kGy), storage temperature (°C), storage time (day) and air exposure time (h), respectively.

Table 2
The water activity (*a_w*) and pH at 25°C of the untreated and E-beam-irradiated (1–3 kGy) hard cheese samples (mean ± standard deviation).

Dose (kGy)	<i>a_w</i>	pH
0	0.953 ± 0.007	5.58 ± 0.06
1	0.953 ± 0.003	5.62 ± 0.01
2	0.958 ± 0.002	5.62 ± 0.01
3	0.958 ± 0.001	5.61 ± 0.02

effect during storage on selected characteristics of hard cheeses, namely, microbiota, physicochemical properties and colour, and textural and sensory attributes. Since among hard varieties, Cheddar cheese is the most consumed worldwide, this cheese type was used as a model in the present study.

2. Material and methods

2.1. Experimental design

The single and combined effects of ionizing radiation and storage conditions on microbiota, colour and texture features and sensory properties were analysed using a full factorial design (see factor levels in Table 1). For microbial analysis, samples were taken based on the storage temperature until they reached 60, 40 and 20 days of storage at 4, 10 and 14 °C, respectively. Sampling at 0, 14 and 28 days of storage were taken for instrumental (colour and texture) and sensory analysis. According to Bower (2009), the full factorial design yielded 96, 72 and 24 experiments for microbial, colour, and texture and sensory analysis, respectively.

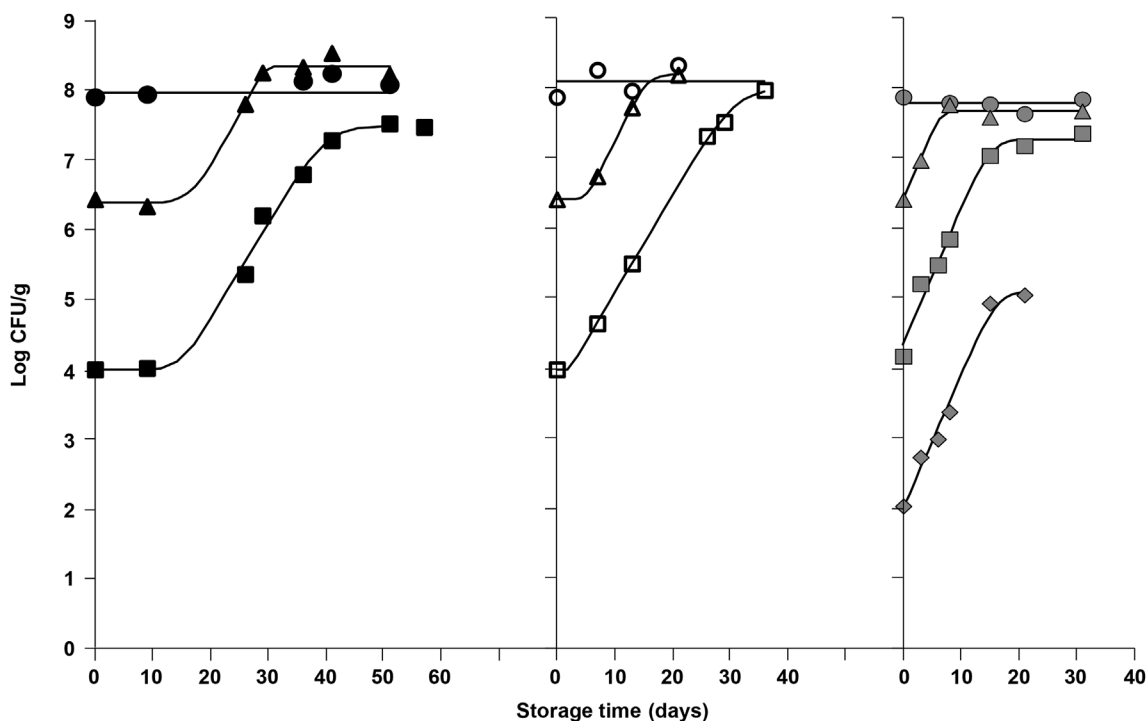


Fig. 1. Total viable counts of control (circles) and irradiated cheese samples at 1 (triangles), 2 (squares) and 3 kGy (diamonds) stored at 4 °C (left), 10 °C (central) and 14 °C (right). No colonies were detected in samples treated with 3 kGy and stored at both 4 °C and 10 °C, even for 60 and 40 days of storage, respectively.

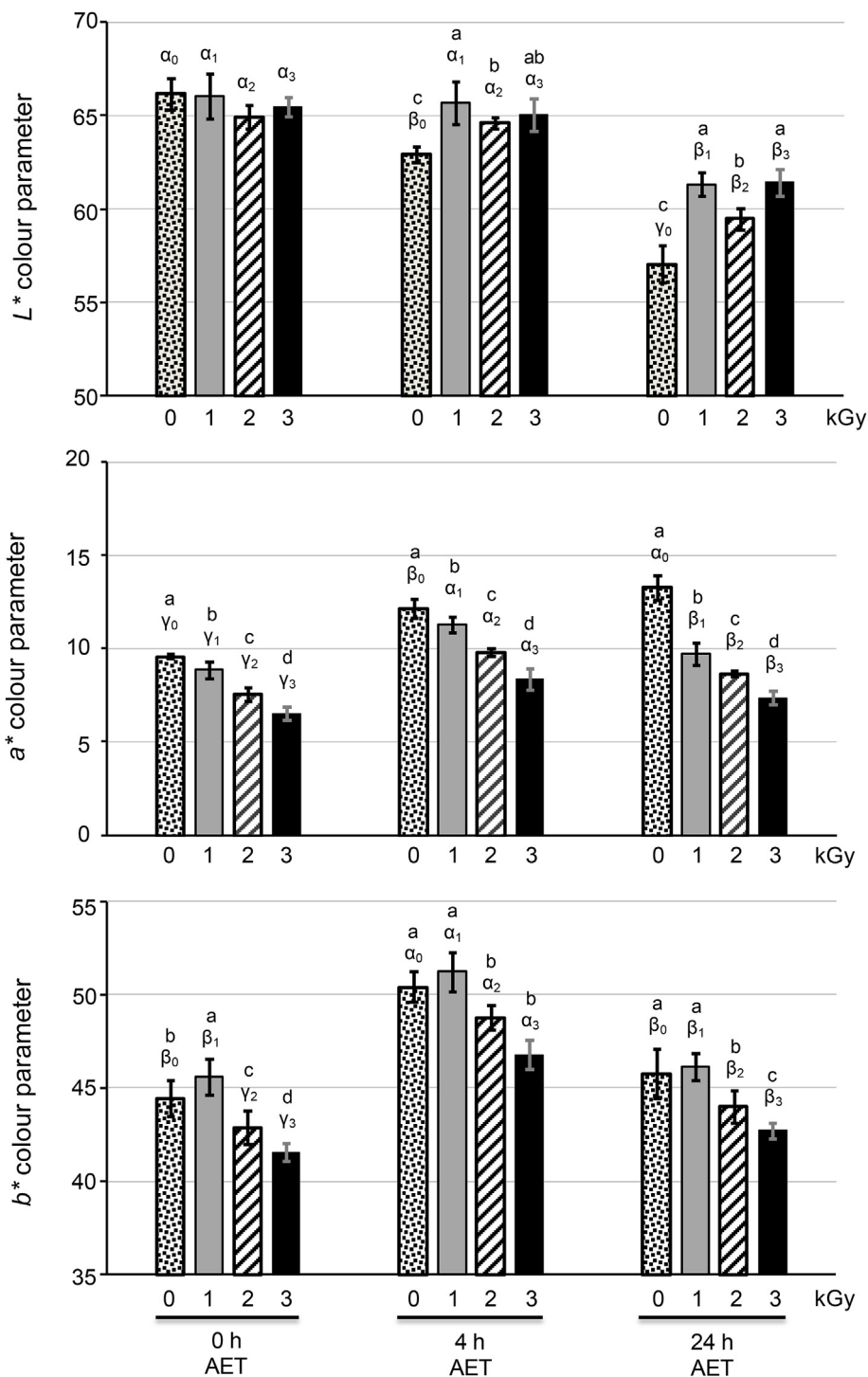
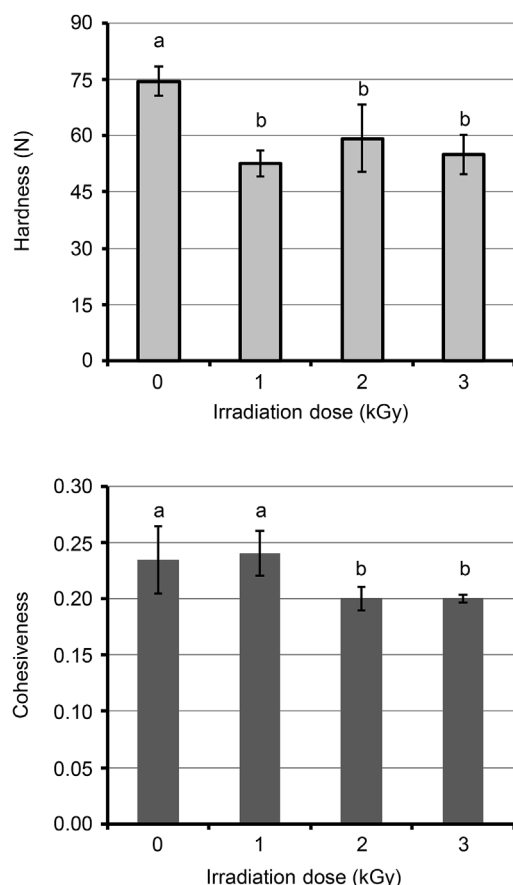


Fig. 2. The effect of irradiation dose (0–3 kGy) and air exposure time (AET 0, 4 and 24 h) on lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*) of annatto-coloured cheese samples immediately after the E-beam treatment (day 0). a, b, c: bars with different letters within the same AET are significantly different ($p < 0.05$). $\alpha_x, \beta_x, \gamma_x$: Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) during AET in samples subjected at an irradiation dose of X kGy.

2.2. Sample preparation and irradiation treatment

In an attempt to assess the effect of E-beam on the orange pigment, coloured cheese samples were used. Whole cheeses labelled “Cheddar cheese” were purchased at a local supermarket. Different size portions (experimental units) were made as convenient (Table 1) using an electric machine (Beckers Italy, Treviglio, Italy), whose contact surfaces were previously thoroughly cleaned and rinsed with sterile distilled water. Experimental units were vacuum-packaged and transferred to

the radiation plant (Ionisos Ibérica, S.A., Tarancón, Spain). The treatment was performed in triplicate as previously described (Velasco et al., 2015). In short, samples were irradiated under an E-beam radiation source, which operates at 10 MeV. The radiation doses employed were 0 (control), 1, 2 and 3 kGy, and the dose absorbed by the samples was checked by cellulose triacetate dosimeters (ASTM, 2000). After treatment, the samples were divided into batches and stored at 4 and 14 °C; the latter is a usual temperature for the ripening of whole cheeses, but this is temperature abuse for the storage of commercial cheese portions.



a, b: Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

Fig. 3. The effect of the irradiation dose (0–3 kGy) on the hardness and cohesiveness of hard annatto-coloured cheese after the E-beam treatment. a, b: Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

For the microbiota analysis, an additional batch was stored at 10 °C as an example of the ripening temperature for some hard cheeses.

2.3. Physicochemical analysis

The cheese composition was determined in untreated slices. Moisture content, ash and protein were analysed according to the AOAC (1995). Fat content was determined as described by Hanson and Olley (1963). Water activity (a_w) and pH were determined at 25 °C using a Decagon CX1 hygrometer (Decagon Devices Inc., Pullman, USA) and a Crison Digit-501 pH metre (Crison Instruments, Barcelona, Spain), respectively.

2.4. Microbial analysis

To determine the total viable counts (TVC), samples were weighed and homogenized with 20 ml of a sterile saline solution in a stomacher bag, and the proper dilutions were inoculated in a plate count agar (Difco, Detroit, USA) by the pour-plate method. Colonies forming units (CFU) were enumerated with a digital colony counter (J.P. Selecta, Barcelona, Spain).

Survival curves of the microorganism were obtained by plotting the log CFU/g against the radiation dose. Decimal reduction doses (D-values) were calculated as the negative reciprocal of the slope from the linear regression equation of survival curves. The TVC growth curves were constructed according to the Baranyi model (Baranyi & Roberts,

1994) using the Excel add-in fitting curves, Dmfit.

2.5. Texture analysis

Texture profile analysis (TPA) parameters (hardness, springiness, adhesiveness, cohesiveness) were determined using a TA.XT2i SMS Stable Micro Systems Texture Analyser (Stable Microsystems Ltd., Surrey, England) with the Texture Expert programme and according to Velasco, Ordóñez, Cabeza, Hoz, and Cambero (2011). At least two cylindrical samples (1.5 cm height and 2 cm diameter) were taken from each experimental unit (Table 1), i. e., for each combination of dose and storage time and temperature, a value corresponding to the average of 6 measurements (2 replicates for each treatment applied) was calculated.

2.6. Colour analysis

L^* (lightness), a^* (redness) and b^* (yellowness) parameters were measured by duplicate samples on the surface of the experimental unit as reported in a previous work (Velasco et al., 2011). As shown in Table 1, the colour parameters were measured at different times after opening the pack (air exposure time, AET).

2.7. Sensory analysis

A triangular test was carried out to study the sensorial attributes (appearance, odour and flavour) of the samples. According to the experimental design (Table 1), untreated and irradiated portions were analysed as previously described (Velasco et al., 2011). Moreover, pannelists had to indicate which samples, if any, would be rejected because of their defective sensory quality, justifying their answers with brief descriptions.

2.8. Statistical analysis

Statistical analyses of single-variable data (one-way and multifactor ANOVA and Duncan's multiple range test) were performed using Statgraphics Centurion XVI (Statistical Graphics Corporation, Rockville, USA).

The combined effect of the radiation dose and storage conditions on colour and texture properties was analysed using a multivariate statistical procedure, including principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA). These analyses were performed with the programme SPAD.N, (Système Portable pour l'analyse des données, CISIA, Montreuil Cedex, France). The raw data matrix was constructed with the values measured in every experiment (Table 1). Texture and colour data were scaled to unit variance to ensure that variables equally weighted the clustering analysis. Principal components were calculated as linear combinations of the standardized characteristics variables. The resulting PCA scores were the data inputs in the HCA. The dissimilarity between scores was measured with the Euclidean distance, and the hierarchical linkage Ward's method was used to group them, which allowed for the determination of the appropriate number of clusters characterized by the colour and texture variables that presented values above or below the global average.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical features

The proximate cheese composition (mean \pm standard deviation) (g/100 g) was moisture 35.6 ± 0.6 , fat 35.6 ± 2.5 , protein 27.9 ± 2.8 and ash 1.9 ± 0.6 . These results were within the specifications for hard cheeses (FDA, 2016).

The a_w and pH values (Table 2) were similar to those found by Hickey, Guinee, Hou, and Wilkinson (2013). No significant difference ($p > 0.05$) in both parameters among the control and irradiated

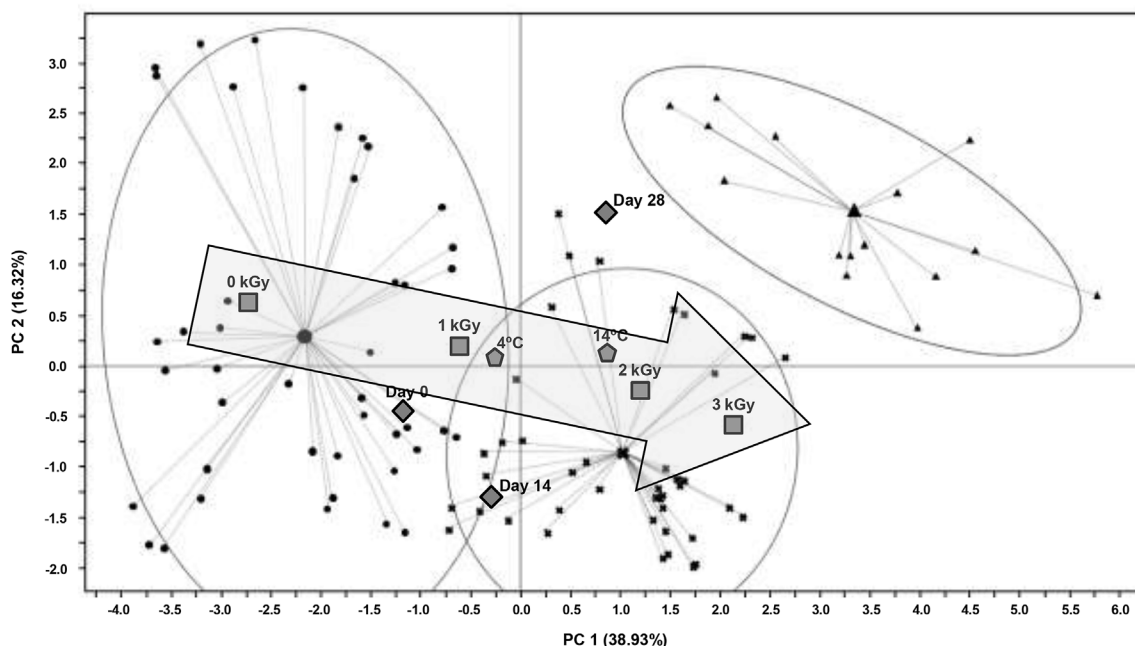


Fig. 4. The scores plot for the principal component analysis (PCA) of the textural and colour features of the hard annatto-coloured cheese and clusters obtained by hierarchical cluster analysis (HCA). The raw data were acquired in untreated and irradiated (1–3 kGy) just after E-beam treatment (day 0) and at day 14 and 28 of storage at 4 and 14 °C. The centroid and data of the cluster are represented by black circles (cluster 1), black crosses (cluster 2) and black triangles (cluster 3). The mean points for the categories of irradiation dose (grey squares), storage time (grey diamonds) and storage temperature (grey pentagons) are also included. The arrow follows the sample grouping tendency line obtained by linear regression of the score averages calculated for each dose of the E-beam treatment.

samples were found, according to the observations of several cheese varieties (Konteles et al., 2009; Velasco et al., 2011, 2015). *L. monocytogenes* is a bacterium able to grow at pH values of 4.0–4.4 and at a_w values of 0.90 (Lado & Yousef, 2007). In case of contamination with *L. monocytogenes*, the retail samples (pH 5.58–5.61; a_w 0.953–0.958) of this kind of cheese did not meet the EU food safety criterion of either 100 CFU/g (for food able to support the listerial growth) or in absence of 25 g for those countries with a more restricted microbiological regulation, such as the USA. It would be necessary, therefore, to take action to reduce the number of *L. monocytogenes* until it is at a safe level. In the present manuscript, it is indicated that E-beam treatment is a very useful tool to achieve this goal, which is supported by several authors (Kim et al., 2007; Konteles et al., 2009; Velasco et al., 2015).

3.2. Effect of E-beam treatment on microbiota

The E-beam treatment caused a reduction in TVC of samples. The higher the dose that was applied, the greater the reduction degree was. Control samples accounted for 7.91 log CFU/g at day 0, which decreased by 1.47, 3.91 and 5.87 log units when doses of 1, 2 and 3 kGy were applied, respectively. These data fitted first-order inactivation kinetics ($R^2 = 0.99$), and a D-value of 0.5 kGy was calculated. Seisa et al. (2004) observed a decrease of the TVC to approximately 3 log CFU/g in Cheddar cheese treated at 4 kGy. This lower reduction could be due to the M17 agar used by the authors since it is a nutritious medium favourable for the growth of *Lactococcus* species (Terzaghi & Sandine, 1975) and thus could promote a higher recovery of these bacteria.

Changes in the TVC during the storage at 4, 10 and 14 °C are depicted in Fig. 1. While the control samples' counts were kept constant under the storage conditions tested, the recovery of the irradiated microbiota depended on both the applied dose and the storage temperature. The microbial population of samples treated with 1 kGy returned to the initial levels, showing generation times (g values) of 2.19, 1.91 and 1.78 days during storage at 4, 10 and 14 °C, respectively. As expected, the lag time decreased with increased temperature at 19 and 5

days of storage at 4 and 10 °C, and no lag time was detected at 14 °C. A similar pattern was exhibited for the TVC of samples irradiated at 2 kGy, although the growth rate was slower, with g values of 2.31, 2.20 and 1.83 days, respectively, for the above-cited temperatures. No colonies were detected in the samples subjected to 3 kGy and stored at 4 and 10 °C, but at 14 °C, the microbiota grew, reaching approximately 5 log CFU/g after 17 days of storage and exhibiting a g value of 1.88 days. This microbiota behaviour has also been observed by other authors in similar experiments (Seisa et al., 2004; Velasco et al., 2011, 2015). According to Daly (2012), the recovery of the irradiated bacteria is dependent on the degree of DNA damage and the accumulation of oxidative proteome harm caused by this treatment, which could compromise the enzymatic activity for both the DNA repair and growth.

3.3. Effect of E-beam treatment on cheese colour and texture

Fig. 2 shows changes in L^* , a^* and b^* parameters of untreated and irradiated (1–3 kGy) samples immediately after the E-beam treatment. Differences detected at day 0 and a few minutes of AET (0 h) could be solely attributed to the radiation effect. An inverse relationship ($p < 0.05$) between the a^* values and the dose was observed, ranging from 9.59 (control samples) to 6.51 (treated at 3 kGy samples). The b^* parameter showed an increase from 44.45 in the untreated cheese to 45.60 in samples subjected at 1 kGy, although a significant decrease ($p < 0.05$) was detected when higher doses were applied. The red and yellow hues of these cheeses are related to the content from the main pigments annatto bixin and norbixin, respectively (Smith, Li, & Drake, 2014). The molecular structures of these oil- and water-soluble carotenoids contain 9 conjugated double bonds (Cosentino, Takinami, & del Mastro, 2016), which are the target of free radicals produced by water radiolysis (hydroxyl, OH^\cdot). The loss of redness and yellowness could be due, therefore, to bixin and norbixin oxidation (Dufossé, Fernández-López, Galaup, & Pérez-Álvarez, 2015). The b^* value increase when doses up to 2 kGy are applied, which was observed by Cosentino et al. (2016) in water-solution annatto extracts treated with ionizing radiation, while higher doses (4–32 kGy) gave rise to a

Table 3

The study of the combined effects of the E-beam treatment and storage conditions (temperature and time) on colour and texture parameters of cheese by hierarchical cluster analysis (HCA).

Cluster	Variable	Cluster mean	Cluster SD	Overall mean	Overall SD	p-value
CLUSTER 1						
(43%)	a-0	9.08	0.92	7.74	1.46	***
	a-4	10.95	1.18	9.31	1.76	***
	a-24	11.41	1.61	9.57	2.01	***
	b-0	45.66	1.56	44.13	2.04	***
	b-4	49.33	1.54	47.45	2.19	***
	b-24	47.76	2.83	46.49	2.52	***
	Cohesiveness	0.21	0.04	0.19	0.04	***
	L-4	63.23	1.49	63.87	2.55	*
	L-24	60.82	2.07	62.54	3.18	***
CLUSTER 2						
(42%)	L-4	62.70	1.36	63.87	2.55	***
	a-0	6.88	0.74	7.74	1.46	***
	a-4	8.27	0.87	9.31	1.76	***
	a-24	8.28	0.60	9.57	2.01	***
	b-0	42.94	1.46	44.13	2.04	***
	b-4	46.47	1.16	47.45	2.19	***
	b-24	45.41	1.61	46.49	2.52	***
CLUSTER 3						
(15%)	L-0	69.02	1.25	68.12	1.80	*
	L-4	68.95	0.95	63.87	2.55	***
	L-24	68.64	1.93	62.54	3.18	***
	Hardness	71.98	4.49	58.73	14.75	***
	b-0	43.09	1.76	44.13	2.04	*
	b-4	44.79	1.27	47.45	2.19	***
	a-0	6.30	0.99	7.74	1.46	***
	a-4	7.51	0.76	9.31	1.76	***
	a-24	7.89	1.14	9.57	2.01	***
	Cohesiveness	0.15	0.01	0.19	0.04	***

The mean values and standard deviation (SD) for each cluster against overall values.

L-x, a-x, b-x denote lightness, redness and yellowness after x hours of AET, respectively.

(%): Percentage of variability explained by the cluster.

***p < 0.0001; *p < 0.01.

Table 4

The sensory characteristics of the untreated and irradiated hard cheese that showed significant differences (p < 0.05) in the triangular test after treatment (day 0) and 14 and 28 days of storage at 4 or 14 °C.

Dose (kGy)	0	1	2	3
0		4 °C A _{0,14,28} ; O _{0,28} ; F _{0,28}	4 °C A _{0,14,28} ; O _{0,14,28} ; F _{0,14,28}	4 °C A _{0,14,28} ; O _{0,14,28} ; F _{0,14,28}
1	14 °C A _{0,14,28} ; O _{0,28} ; F _{0,28}		4 °C A _{0,14,28} ; O _{0,14} ; F _{0,14}	4 °C A _{0,14,28} ; O _{0,14,28} ; F _{0,14,28}
2	14 °C A _{0,14,28} ; O _{0,14, 28} ; F _{0,14,28}	14 °C A _{0,14,28} ; O _{0,14} ; F _{0,14}		4 °C A _{0,14,28} ; O _{0,28} ; F _{14,28}
3	14 °C A _{0,14,28} ; O _{0,14,28} ; F _{0,14,28}	14 °C A _{0,14,28} ; O _{0,14,28} ; F _{0,14}	14 °C A _{0,14,28} ; O _{0,28} ; F ₁₄	

A, O, F: Significant differences (p < 0.05) for appearance, odour and flavour, respectively.

significant decrease of the yellowness. This behaviour was attributed by the authors to the dual character of carotenoids as antioxidant or prooxidant.

Regarding the AET effect on the untreated samples (Fig. 2, dotted bars), the lightness decreased gradually, and the samples became more

Table 5

The overall acceptability of the untreated and irradiated hard cheese after treatment (day 0) and 14 and 28 days of storage at 4 or 14 °C, expressed as percentage of panellists qualifying the samples as questionable.

Storage temperature (°C)	Storage time (day)	Irradiation dose			
		0 kGy	1 kGy	2 kGy	3 kGy
4	0	0	2	10	22
	14	0	1	6	18
	28	19	1	1	12
14	14	0	2	9	19
	28	22	0	2	10

reddish (p < 0.05). A significant (p < 0.05) increase of b* in the early 4 h of AET was detected, followed by a decrease until it reached the initial level at 24 h of exposure. These changes may be related to a higher concentration of annatto due to the slow decrease in moisture content during storage (Petersen, Wiking, & Stapelfeldt, 1999). The colour pattern of the irradiated cheese (1–3 kGy) during AET differed from that of the control cheese, possibly due to the interaction of the E-beam treatment and exposure to air (Fig. 2). Therefore, the L* value decrease in irradiated samples (1–3 kGy) was only significant after 24 h of AET. The a* values were different, showing a general increase immediately after the treatment and a decrease afterwards, during AET; the higher the irradiation dose was, the smoother the variation. A similar trend for the a* parameter was observed for the b* parameter. In summary, it appears that E-beam treatment could attenuate the cheese discolouration when it is the cheese was exposed to air.

Fig. 3 shows the results of the TPA analysis for hardness and cohesiveness. A hardness decrease (p < 0.05) was observed in irradiated cheese at 1, 2 and 3 kGy (from 74.54 N to 52.61, 59.31 and 54.86 N, respectively), although no significant differences among treated samples were found. Cohesiveness also decreased (p < 0.05) with irradiation at higher doses. No significant difference (p > 0.05) among the samples were found in adhesiveness or springiness. These findings agree with previous work (Velasco et al., 2011). The softening and loss of cohesiveness would be related to either a decrease in protein-to-protein interactions and/or a shorter length of the protein strands (Pastorino, Hansen, & McMahon, 2003) or changes in the peptide profiles by irradiation (Seisa et al., 2004).

Initially, a multifactor ANOVA was performed to establish the significance of the effect of irradiation dose (D), storage time (t) and temperature (T) and their interactions on the colour and texture parameters (Figures S1, S2 and S3 of the supplementary information). For hardness, springiness and colour parameters, the interaction of DxtT was statistically significant (p < 0.05). Multifactor ANOVA for cohesiveness showed a significant effect (p < 0.05) of the interactions Dxt and Txt. Neither the irradiation dose nor the selected storage conditions significantly affected (p > 0.05) the adhesiveness of cheese samples. However, these data were also included in the principal components analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA). The former statistical procedure revealed that 82.4% of the total variance was explained by PC1 (38.93%), PC2 (16.32%), PC3 (11.06%), PC4 (9.41%) and PC5 (6.72%) (Table S1). Since the highest contributions corresponded to the two first principal components, PC1 and PC2 were used in scores plot (Fig. 4).

According to clustering study, the PCA scores of the samples were grouped in three different clusters, which could be characterized by the difference between the overall mean value and the cluster mean for each studied parameter (Table 3). Cluster 1 represented 43% of the total samples and included the control samples (0 kGy) during the storage period (0–28 days) at both temperatures and the samples irradiated at 1 kGy immediately after the treatment (day 0) and stored at 4 °C (days 14 and 28) and 14 °C (day 14). These samples showed a higher redness and yellowness during the AET. Regarding texture

features, only cohesiveness was significantly inferior to the overall mean. Cluster 2 (42% of total samples) included the samples irradiated at higher doses (2 and 3 kGy) immediately after the treatment (day 0) and those that were stored at 4 °C (14 and 28 days) and 14 °C (14 days). Lightness at 4 h of AET (L-4), redness and yellowness of this cluster were lower than the overall mean. No significant differences were found in the texture variables. Finally, Cluster 3 (15% of the samples) included the irradiated cheese (1–3 kGy) at day 28 of storage at 14 °C. Samples displayed mean values of hardness and lightness (at 0, 4 and 24 h of AET) above the average, and cohesiveness, redness (a-0, a-4, a-24) and yellowness (b-0, b-4) showed mean values below the overall average.

HCA revealed a differentiation among the samples according to the irradiation treatment and the storage conditions. On the one hand, PC1 allowed for discrimination between the samples treated at doses up to 1 kGy (cluster 1) from those irradiated at higher doses, i.e., 2–3 kGy, (cluster 2), provided that they were maintained at a refrigeration temperature (4 °C) during at least the first 28 days of storage. On the other hand, irradiation of cheese, even at doses from 1 kGy, caused greater changes in the colour and texture characteristics when the temperature abuse occurred. PC1 and PC2 reflected the combined effect, being able to differentiate control samples (cluster 1) from irradiated ones (cluster 3) after 28 days of storage at 14 °C.

3.4. Sensory analysis

Significant differences ($p < 0.05$) in odour, appearance and flavour obtained in the triangular test and the overall acceptability of cheese stored at both temperatures are provided in Tables 4 and 5, respectively. The control and irradiated samples were significantly different ($p < 0.05$) immediately after the treatment (day 0). The irradiated cheeses presented off-odours and off-flavours, which were described by the panellists as burnt, rancid, plastic/rubber, and pungent. Similar descriptions have also been made of irradiated cheeses by other authors (Oudeke et al., 2016; Seisa et al., 2004). The differences among the irradiated samples (1–3 kGy) were dose-dependent. The higher the dose applied, the greater the off-odours and off-flavour intensity. Consequently, the percentage of questionable samples increased from 2 to 22% when treated at 1 and 3 kGy, respectively.

During storage at both temperatures, the off-odour and off-flavours associated progressively decreased, such that the questionable sample percentage after 28 days reached negligible values after doses of 1 and 2 kGy were used. Even at 3 kGy, an important reduction (10–12%) was observed. This behaviour was due to the dissipation of the sapid and aromatic volatile compounds. The reversibility of the odour and flavour changes in irradiated cheeses has been reported by several authors (Konteles et al., 2009; Seisa et al., 2004; Velasco et al., 2011). According to Konteles et al. (2009), the oxidation phenomena of lipids and proteins produced by ionizing irradiation lead to secondary oxidation products, which are responsible for off-odours that in turn undergo polymerization or isomerisation reactions, thus giving rise to less volatile compounds.

The irradiated cheeses stored at 14 °C were defined as less cohesive and with lower moisture than the untreated cheeses. This texture change and the dissipation of the sapid substances associated with radiolysis during storage time explained why no significant differences in flavour of irradiated samples at different doses were detected (Table 4).

At the end of storage (day 28), the control samples achieved a rejection percentage (19–22%) higher than that of treated samples, irrespective of the dose, due to development of off-odours and off-flavours related to spoilage (mouldy, cellar odours).

A preference order test reported for processed Cheddar slices subjected to gamma irradiation (Kim et al., 2007) agreed with the results here obtained. However, it has also been reported (Seisa et al., 2004) that the irradiation at 4 kGy of Cheddar cheese did not lead to

significant differences in the first days of ripening.

The triangular test showed that appearance was the most affected attribute by irradiation treatment. The higher the irradiation dose was, the larger the changes in the reddish colour of samples, which is in complete agreement with the behaviour observed for the a^* parameter (Fig. 2). However, in practice, commercial hard cheese colour ranges from an intense orange to ivory-like tint (Codex Alimentarius, 2013). Furthermore, a widely sensorial quality of commercial Cheddar cheeses is observed between different brands and between production batches belonging to the same manufacturer (Guinee, Kilcawley, & Beresford, 2008). Therefore, it appears that the sensory quality of these cheeses is not compromised by the application of irradiation treatments up to 2 kGy.

4. Conclusions

The use of E-beam treatment at doses of up to 2 kGy in hard annatto-coloured cheese leads to a decrease in the total bacterial number, although microbiota recovery to the initial levels during storage is observed, even under refrigeration.

The effects of the dose treatment on the hardness, springiness, cohesiveness and colour parameters are interdependent of the storage conditions. Although off-odour and off-flavours may arise just after treatment, they disappear progressively during storage. The redness and yellowness of annatto-coloured cheeses are reduced by the E-beam treatment, however, the appearance of samples irradiated at doses up to 3 kGy remains in the colour range of commercial orange cheeses.

Acknowledgements

This work was supported by the Group-920276 of the Complutense University of Madrid. Part of reagents and analytical equipment used in this work were supported by the project INIA-RTA2013-00070-C03-02.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.045>.

References

- AOAC (1995). *Official methods of analysis* (16th ed.). Washington: Association of Official Analytical Chemists.
- ASTM (2000). E1650-97e1 Standard practice for use of cellulose acetate dosimetry systems. *Annual book of ASTM standards: 12.02*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 277–294.
- Bower, J. A. (2009). *Statistical methods for food science: Introductory procedures for the food practitioner*. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Brooks, J. C., Martinez, B., Stratton, J., Bianchini, A., Krokstrom, R., & Hutkins, R. (2012). Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *Food Microbiology*, 31, 154–158.
- Cabeza, M. C., Cambero, M. I., de la Hoz, L., & Ordóñez, J. A. (2007). Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 299–305.
- CFIA (2017a). Canadian food inspection agency notification: Avonlea brand cheddar cheese recalled due to *Listeria monocytogenes*. <http://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/newsroom/food-recall-warnings/complete-listing/2017-03-08-r11242/eng/1489441670692/1489441672882#r07>, Accessed date: 18 August 2018.
- CFIA (2017b). Canadian food inspection agency food recall warning: Agropur import collection brand firm ripened Comté cheese recalled due to *Listeria monocytogenes*. <http://www.inspection.gc.ca/about-the-cfia/newsroom/food-recall-warnings/complete-listing/2017-10-18/eng/1508368673772/1508368676618>, Accessed date: 18 August 2018.
- Codex Alimentarius (2013). *Codex standard for cheddar*, CODEX STAN 263-1966.
- Cosentino, H. M., Takinami, P. Y. I., & del Mastro, N. L. (2016). Comparison of the ionizing radiation effects on cochineal, annatto and turmeric natural dyes. *Radiation Physics and Chemistry*, 124, 208–211.
- D'Aoust, J. Y., Warburton, D. W., & Sewell, A. M. (1985). *Salmonella* Typhimurium phage-type 10 from Cheddar cheese in a major Canadian foodborne outbreak. *Journal of Food Protection*, 48, 1062–1066.
- Daly, M. J. (2012). Death by protein damage in irradiated cells. *DNA Repair*, 11, 12–21.

- Dufossé, L., Fernández-López, J., Galaup, P., & Pérez-Álvarez, J. A. (2015). Colour measurements of muscled-based and dairy foods. In (3th ed.). L. M. L. Nollet, & F. Toldrá (Vol. Eds.), *Handbook of food analysis: Vol. 1*, (pp. 3–20). Boca Raton: CRC Press.
- EC Milk Market Observatory (2017). Annual production series of dairy products. https://ec.europa.eu/agriculture/sites/agriculture/files/market-observatory/milk/pdf/eu-historical-production-stocks-series_en.pdf, Accessed date: 18 August 2018.
- FDA (2016). Cheddar cheese. Revision 2016. *Code of federal regulations 21: Food and drugs, Part 133*. Washington: Office of Federal Register, National Archives and Records Administration.
- FDA (2017). DKH Cheese recalls (*Listeria monocytogenes* contamination). <https://www.fda.gov/Safety/Recalls/MajorProductRecalls/ucm542804.htm>, Accessed date: 18 August 2018.
- Guinee, T. P., Kilcawley, K. N., & Beresford, T. P. (2008). How variable are retail vintage brands of cheddar cheese in composition and biochemistry? *Australian Journal of Dairy Technology*, 63, 50–60.
- Hanson, S. W. F., & Olley, J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. *Biochemical Journal*, 89, 101–102.
- Hickey, D. K., Guinee, T. P., Hou, J., & Wilkinson, M. G. (2013). Effects of variation in cheese composition and maturation on water activity in Cheddar cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 30, 53–58.
- Kim, H. J., Song, B. S., Kim, J. H., Choi, J. I., Lee, J. W., Jo, C., et al. (2007). Application of Gamma irradiation for the microbiological safety of sliced Cheddar cheese. *Journal of Radiation Industry*, 1, 15–19.
- Konteles, S., Sinanoglou, V. J., Batrinou, A., & Sflomos, K. (2009). Effects of γ -irradiation on *Listeria monocytogenes* population, colour, texture and sensory properties of Feta cheese during cold storage. *Food Microbiology*, 26, 157–165.
- Lado, B., & Yousef, A. E. (2007). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In E. T. Ryser, & E. H. Marth (Eds.). *Listeria, listeriosis and food safety* (pp. 157–213). (3rd ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Little, C. L., Sagoo, S. K., Gillespie, I. A., Grant, K., & McLauchlin, J. (2009). Prevalance and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in selected retail ready-to-eat foods in the United Kingdom. *Journal of Food Protection*, 72, 1869–1877.
- Mahapatra, A. K., Muthukumarappan, K., & Julson, J. L. (2005). Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 447–461.
- Medina, M., Cabeza, M. C., Bravo, D., Cambero, I., Montiel, R., Ordóñez, J. A., et al. (2009). A comparison between E-beam irradiation and high pressure treatment for cold-smoked salmon sanitation: Microbiological aspects. *Food Microbiology*, 26, 224–227.
- Odueke, O. B., Farag, K. W., Baines, R. N., & Chadd, S. A. (2016). Irradiation applications in dairy products: A review. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 751–767.
- Pastorino, A. J., Hansen, C. L., & McMahon, D. J. (2003). Effect of pH on the chemical composition and structure-function relationships of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 86, 2751–2760.
- Petersen, M., Wiking, L., & Stapelfeldt, H. (1999). Light sensitivity of two colorants for Cheddar cheese. Quantum yields for photodegradation in an aqueous model system in relation to light stability of cheese in illuminated display. *Journal of Dairy Research*, 66, 599–607.
- Ryser, E. T. (2007). Incidence and behaviour of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. In E. T. Ryser, & E. H. Marth (Eds.). *Listeria, listeriosis and food safety* (pp. 405–502). (3rd ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Schlesser, J. E., Gerdes, R., Ravishankar, S., Madsen, K., Mowbray, J., & Teo, Y. L. (2006). Survival of a five-strain cocktail of *Escherichia coli* O157:H7 during the 60-day aging period of Cheddar cheese made from unpasteurized milk. *Journal of Food Protection*, 69, 990–998.
- Seisa, D., Osthoff, G., Hugo, C., Hugo, A., Bothma, C., & Van der Merwe, J. (2004). The effect of low-dose gamma irradiation and temperature on the microbiological and chemical changes during ripening of Cheddar cheese. *Radiation Physics and Chemistry*, 69, 419–431.
- Smith, T. J., Li, X. E., & Drake, M. A. (2014). Norbixin and bixin partitioning in Cheddar cheese and whey. *Journal of Dairy Science*, 97, 3321–3327.
- Terzaghi, B. E., & Sandine, W. E. (1975). Improved medium for lactic *Streptococci* and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29, 807–813.
- USDA-NASS (2017). Dairy and poultry statistics. *Agricultural statistics 2017* (pp. 1–41). Washington: US Government Printing Office.
- Velasco, R., Ordóñez, J. A., Cabeza, M. C., Hoz, L., & Cambero, M. I. (2011). Use of the E-beam radiation to diminish the late blowing of cheese. *International Dairy Journal*, 21, 493–500.
- Velasco, R., Ordóñez, J. A., Cambero, M. I., & Cabeza, M. C. (2015). Use of E-beam radiation to eliminate *Listeria monocytogenes* from surface mould cheese. *International Microbiology*, 18, 33–40.
- Wood, D. S., Collins-Thompson, D. L., Irvine, D. M., & Myhr, A. N. (1984). Source and persistence of *Salmonella* Muenster in naturally contaminated Cheddar cheese. *Journal of Food Protection*, 47, 20–22.
- Zweifel, C., Giezendanner, N., Corti, S., Krause, G., Beutin, L., Danuser, J., et al. (2010). Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from Swiss raw milk cheese within a 3-year monitoring program. *Journal of Food Protection*, 73, 88–91.

Figure S1. The effect of irradiation dose (0–3 kGy) and air exposure time (AET) on lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*) of Cheddar cheese at different times of storage at 4°C. The mean values of overall data and clusters 1, 2 and 3 are represented by horizontal lines. L-x, a-x, b-x denote lightness, redness and yellowness after x hours of AET.

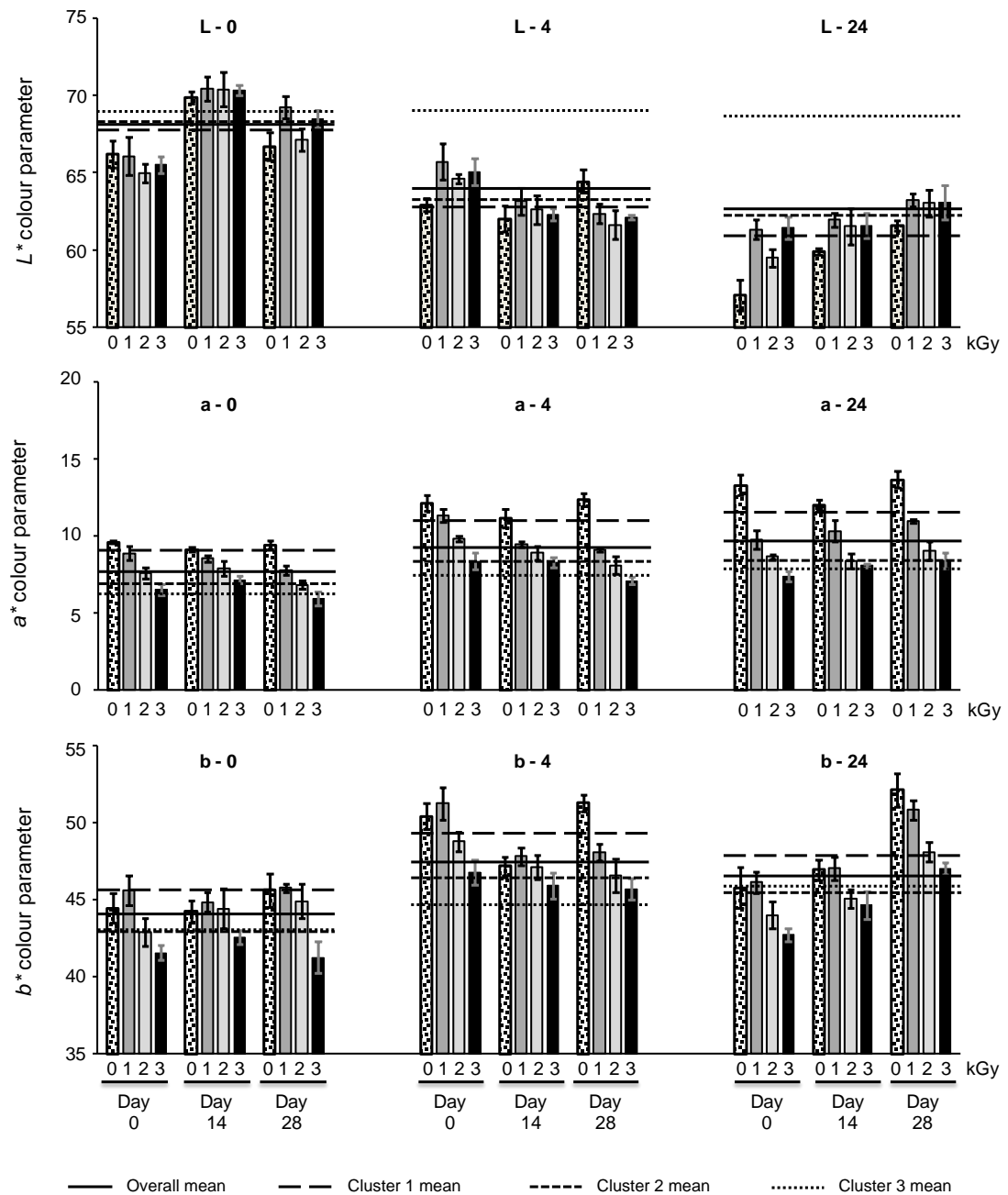


Figure S2. The effect of irradiation dose (0–3 kGy) and air exposure time (AET) on lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*) of Cheddar cheese at different times of storage at 14°C. The mean values of overall data and clusters 1, 2 and 3 are represented by horizontal lines. L-x, a-x, b-x denote lightness, redness and yellowness after x hours of AET.

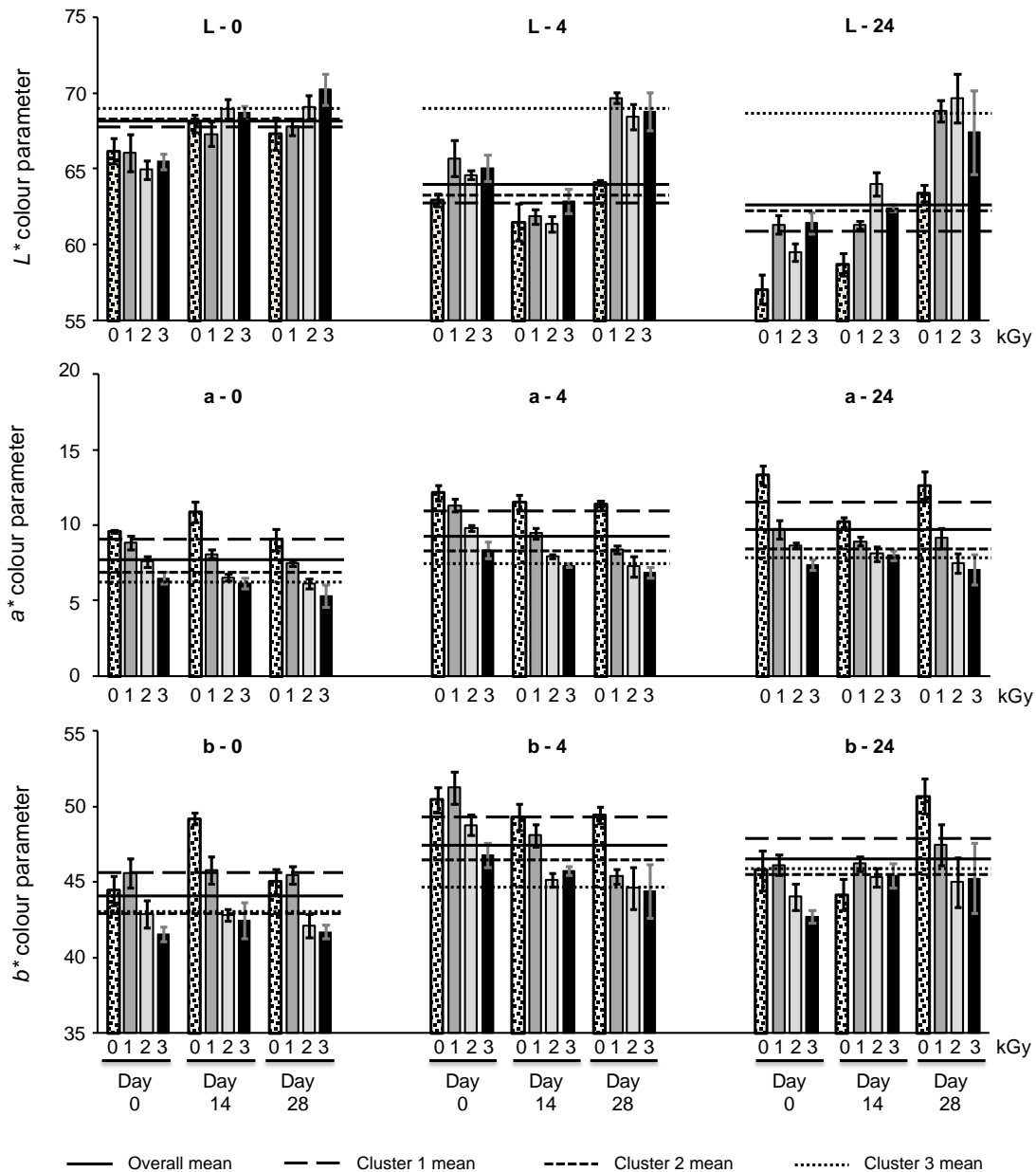


Figure S3. The effect of irradiation dose (0–3 kGy) on hardness, cohesiveness and springiness of Cheddar cheese at different times of storage at 4 and 14°C. The mean values of the overall data and clusters 1, 2 and 3 are represented by horizontal lines.

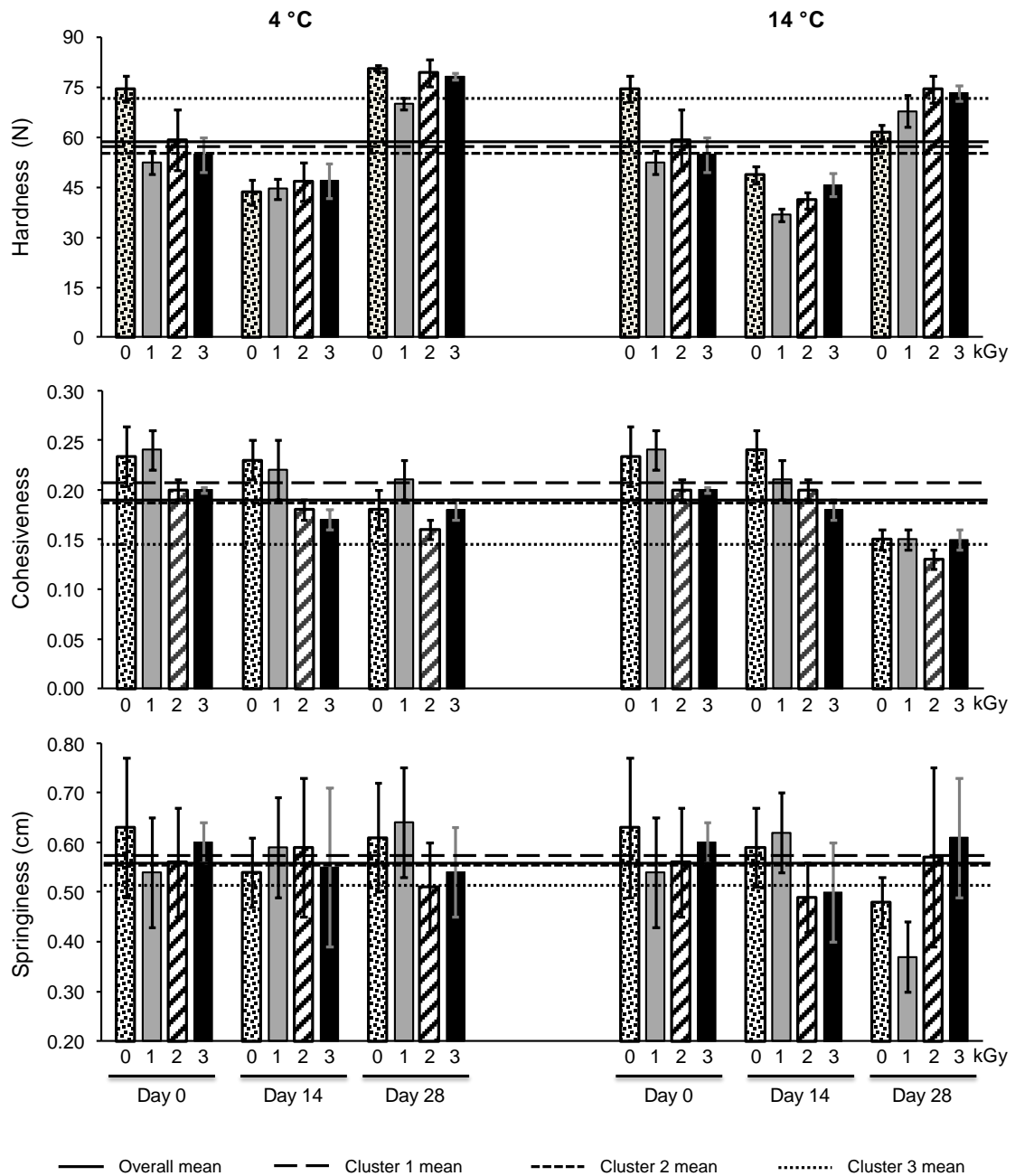


Table S1. The PCA loadings and percentage cumulative variance for the first five principal components (PC) for the study of combined effect of irradiation dose and the storage conditions on colour and textural variables of Cheddar cheese.

Variable	R ²	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
L-0	0.86	0.349	-0.181	-0.017	0.831	-0.120
L-4	0.83	0.446	0.520	0.075	-0.332	-0.490
L-24	0.84	0.747	0.453	0.134	0.115	-0.223
a-0	0.94	-0.922	0.041	0.103	0.062	-0.267
a-4	0.91	-0.930	0.142	-0.007	-0.084	-0.128
a-24	0.89	-0.810	0.426	-0.098	0.207	0.069
b-0	0.75	-0.717	0.119	0.249	0.213	-0.338
b-4	0.86	-0.885	0.140	-0.053	-0.228	-0.015
b-24	0.89	-0.344	0.707	-0.024	0.444	0.270
Hardness	0.81	0.183	0.772	-0.156	-0.217	0.338
Adhesiveness	0.82	0.043	-0.006	-0.820	0.032	-0.384
Cohesiveness	0.64	-0.576	-0.512	0.120	-0.108	0.122
Springiness	0.68	-0.176	-0.136	-0.786	0.015	0.113
% Cumulative variance		38.9	55.2	66.3	75.7	82.4

L-x, a-x, b-x: Lightness, redness and yellowness measured at X hours of air exposure time (AET)

R²: Representation quality of each variable by the first five principal components

5.

DISCUSIÓN INTEGRADORA

La ciencia está hecha de datos, como una casa está hecha de piedras. Pero un montón de datos no es ciencia, igual que un montón de piedras no hace una casa.

Henri Poincaré (1854-1912)

5.1. PREÁMBULO

La transformación de la leche en cualquier tipo de queso sigue, en líneas generales, el mismo proceso. Sin embargo, el término queso engloba a miles de variedades con tamaños, texturas, colores, sabores, aromas, etc. completamente diversos. La procedencia y composición original de la leche contribuyen al desarrollo de las características propias de cada variedad pero, sin duda, los parámetros tecnológicos y los microorganismos que intervienen en el proceso son los principales factores que marcan las diferencias. Por ejemplo, a partir de la leche de vaca pueden elaborarse quesos tan distintos como una rueda de duro Parmesano, un queso blando como el Camembert o un queso azul como el Stilton. Además de la diversidad en el aspecto y perfil sensorial, los quesos también se diferencian en sus propiedades fisicoquímicas que, a su vez, participan activamente en la determinación de la dinámica de las poblaciones microbianas presentes en uno u otro momento durante el proceso madurativo. Es decir, la supervivencia y crecimiento de los microorganismos deseables, alterantes y patógenos dependerán de las condiciones de cada tipo de queso. De estas circunstancias, unidas a la experiencia en la aplicación de electrones acelerados en alimentos del grupo de investigación TECNOLALIMA de la Facultad de Veterinaria de la UCM (véase capítulo 2), en que se integró la autora de esta memoria y al que pertenecen sus supervisores, surgió el planteamiento de la presente tesis doctoral. Las investigaciones realizadas se diseñaron para abordar, por una parte, la necesidad de minimizar las pérdidas de queso debidas a alteraciones y, por otra, garantizar la producción de quesos seguros desde un punto de vista microbiológico.

En lo concerniente a las alteraciones de origen microbiano, destacan especialmente aquellas que se producen por formación de gas y su acumulación en el interior del queso, cuyos signos no suelen manifestarse hasta que la pieza está visiblemente deteriorada. El mantenimiento de unas condiciones higiénicas adecuadas durante el proceso y el uso de leche pasteurizada evita la aparición de la

mayoría de estos defectos. Sin embargo, estas medidas no son suficientes para evitar el hinchamiento tardío (LBD, del inglés *late blowing defect*) causado por el grupo de las bacterias ácido butíricas (BAB), específicamente *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* y *C. beijerinckii*, ya que las esporas de estos microorganismos resisten el tratamiento de pasteurización (Sheehan, 2011). De acuerdo a los estudios de termorresistencia realizados por distintos autores, los tiempos de reducción decimal (valor D) a pH 7,0 y 85 °C de estos clostridios son 2-4 min, 5-7 min y 23 min para *C. beijerinckii* (Brown, 2000), *C. tyrobutyricum* y *C. butyricum* (Russell, 1982), respectivamente, mientras que *C. sporogenes* presenta un valor D, a 95 °C, de 319 minutos (Shamsuzzaman y Lucht, 1993), siendo éste el más termorresistente. Considerando el clostridio más termolábil (*C. beijerinckii*) y suponiendo un valor z de 10 °C, el valor D a la temperatura de pasteurización (75 °C) sería de más de 20 minutos, que excede ampliamente (más de 80 veces) el tiempo estipulado de tratamiento a dicha temperatura (15 s). Como ya se ha indicado en capítulos anteriores, el LBD es propio de quesos duros y semiduros, de cuajadas principalmente enzimáticas, que maduran durante un largo tiempo (habitualmente varios meses) y que, con frecuencia, son piezas de tamaño mediano o grande. En estos quesos, las BAB encuentran las condiciones adecuadas para su germinación y desarrollo. Por ejemplo, la actividad de agua (a_w) mínima para la germinación de *C. butyricum* es de 0,960 (Ghoddusi y col., 2013) y de 0,965 para *C. tyrobutyricum* (Huchet y col., 1995). Estos valores son similares a los de muchos quesos duros y semiduros como, por ejemplo, los quesos Gouda, Edam, Cheddar, etc. (Guinee y Fox, 2017). No obstante, hay que tener en cuenta que en las primeras semanas de maduración, cuando comienzan a multiplicarse los microorganismos causantes del LBD, los quesos presentan valores de a_w superiores a 0,96, y van disminuyendo después debido, principalmente, a la progresiva difusión de la sal y a la pérdida de humedad. Por ejemplo, en quesos semiduros/duros españoles, este parámetro se reduce desde un valor inicial de 0,99 hasta 0,93 en los quesos

Manchego e Idiazábal y a 0,91 en el Zamorano tras 180 y 240 días de maduración, respectivamente (Etayo y col., 2006; Cabezas y col., 2007).

La aparición del LBD conlleva grandes pérdidas económicas atribuibles no solo a la cantidad de queso afectado, sino también al tiempo y recursos empleados para su obtención. Un ejemplo ilustrativo es el queso Grana Padano, con una incidencia de LBD que puede llegar al 15-35% de la producción (Borreani y Tabacco, 2008). De acuerdo al pliego de condiciones de la Denominación de Origen Protegida (DOP) de esta variedad, las ruedas de queso se mantienen en salmuera de 14 a 30 días, tras los cuales se llevan a la cámara de maduración donde, después de un mínimo de 9 meses, alcanzan un peso final entre 24 y 40 kg (Consorzio Tutela Grana Padano, 2020). En queso Manchego, por ejemplo, se ha descrito que, a pesar del uso de lisozima, una media del 0,28% de la producción puede presentar LBD, alcanzando el 0,63% en los meses de verano y, ocasionalmente, puede ser mayor (Garde y col., 2011a).

En la introducción de esta tesis se han analizado las diversas estrategias que se han ideado para prevenir/controlar la aparición del LBD (apartado 1.2). Resumidamente, unas están encaminadas a prevenir la contaminación de la leche en las granjas, algunas dirigidas a separar las esporas de la leche cruda mediante tratamientos físicos y, finalmente, ante la imposibilidad de tratar térmicamente el queso, otras estrategias se han destinado a evitar el crecimiento de las BAB en este producto mediante la aplicación de métodos esporostáticos (aditivos químicos y cultivos antagonistas) o esporicidas (altas presiones hidrostáticas). La aplicación de radiaciones ionizantes es una alternativa eficaz para la eliminación de microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos pero, que la autora sepa, hasta el momento no se ha realizado estudio alguno acerca de la aplicación de este tratamiento para minimizar la aparición de la alteración LBD. De estas circunstancias, surgió la vertiente de esta tesis destinada a averiguar la posibilidad de la aplicación de electrones acelerados para controlar la alteración LBD.

Los quesos duros y semiduros gozan, en general, de un buen historial sanitario debido al efecto combinado de pH y baja a_w , incluyendo los elaborados con leche cruda (D'Amico y col., 2017; EFSA, 2019). La temperatura puede considerarse como un factor coadyuvante. Así, la legislación de EE. UU. únicamente permite el comercio de quesos de leche cruda que hayan sido mantenidos durante al menos 60 días a una temperatura máxima de 35 °F (1,67 °C), basándose en que las condiciones ambientales de los quesos al final de dicho periodo (bajo pH, baja a_w y la presencia de competidores) inactivan a los posibles patógenos que puedan haber alcanzado la leche o la cuajada (Brooks y col., 2012). Esta norma se promulgó en EE. UU. en 1950, pero los brotes de microorganismos patógenos (especialmente *L. monocytogenes* y *E. coli* O157:H7) han conducido a revisar la norma en fechas posteriores (Ryser, 2007; FDA, 2016).

Aunque se ha ensayado el uso de radiaciones ionizantes para reducir la carga de patógenos y ampliar la vida útil de algunos quesos (Hashisaka y col., 1989; Hashisaka y col., 1990b; Boisseau, 1994; Bougle y Stahl, 1994; Tsiotsias y col., 2002; Farkas, 2006; Arvanitoyannis y Tserkezou, 2010; Odueke y col., 2016), son escasas las referencias de su aplicación como medio de higienizar piezas de queso RTE, salvo en queso fundido en lonchas y rallado (Sommers y Boyd, 2005; Kim y col., 2007, 2010). Esta situación llevó a la autora a planificar esta segunda vertiente de la tesis, tomando como patrón de microorganismo a *L. monocytogenes* por ser uno de los patógenos que más preocupa, como lo demuestran los datos epidemiológicos de los últimos años (Martínez-Ríos y Dalgaard, 2018; EFSA, 2019; CDC, 2020) y los decomisos de las redes de alerta sanitaria de la UE (RASFF, 2020) y EE. UU. (FDA, 2020). Para realizar esta parte de la tesis, se tomaron como modelo quesos de tipo Camembert y Brie, ya que se ha estimado que las variedades de pasta blanda son las más vulnerables (véase 1.3.2) a ser contaminadas por *L. monocytogenes*.

La amplia experiencia de los supervisores de esta memoria en la higienización de alimentos RTE con electrones acelerados (véanse en el capítulo 2 los numerosos artículos publicados por el grupo) fue un aspecto determinante para acometer los experimentos oportunos que se recogen en esta tesis referidos a la muerte/supervivencia de *L. monocytogenes* en quesos de pasta blanda. Los resultados que se obtuviesen, por otra parte, podrían extrapolarse a la aplicación de radiaciones ionizantes con rayos gamma o rayos X, puesto que la interacción física de la radiación con la materia depende de su naturaleza, pero no determina ni los efectos químicos ni biológicos derivados de su aplicación (Mittendorfer, 2016).

Los resultados se presentan en las publicaciones incluidas en el capítulo 4 de la memoria. Los dos primeros artículos recogen los estudios llevados a cabo para conocer la dosis de radiación que se requiere para el control del LBD en quesos semiduros (artículo 1) y para la higienización de quesos blandos (Camembert y Brie) madurados por mohos superficiales (artículo 2). Estos estudios implican, además, conocer las repercusiones del tratamiento con radiaciones ionizantes en los factores intrínsecos del queso relacionados con el crecimiento microbiano, como el pH, la a_w y la microbiota láctica (artículos 1, 2 y 4). Lógicamente, se requiere también averiguar el efecto del tratamiento irradiante en los atributos sensoriales de cada variedad, como la textura, el color, la apariencia, el olor y el sabor (artículos 1, 3 y 4). Sin embargo, debido a que las editoriales de las revistas científicas limitan al máximo la extensión de la discusión y análisis de los resultados, en esta *Discusión integradora* se tratan más ampliamente ciertos aspectos generales.

5.2. CONTROL DEL HINCHAMIENTO TARDÍO DE LOS QUESOS

Las medias concebidas para controlar el LBD han sido consideradas en la *Introducción* (apartado 1.2) y resumidamente mencionadas en el preámbulo de este capítulo. El planteamiento propuesto en esta tesis con este fin consiste en la aplicación de electrones acelerados, siendo la primera aproximación descrita para

evitar el LBD mediante el uso de dicha tecnología. En este contexto, se estudió la radiorresistencia de las BAB a dosis de hasta 8 kGy en muestras de queso semiduro contaminadas de forma intencionada, calculándose un valor D de 1,77 kGy para *C. tyrobutyricum*, principal responsable de la alteración. El valor obtenido es acorde con los publicados por Roberts e Ingram (1965) en caldo de carne para *C. butyricum* (1,5 kGy), distintas cepas de *C. sporogenes* (1,6-2,2 kGy) y para el resto de las especies y cepas de clostridios incluidas en dicho estudio (1,0-2,5 kGy) y próximo al hallado para *C. botulinum* tipo A y B (2,5 y 1,26 kGy) en queso Limburger (Wagenaar y Dack, 1955). A partir de dicho valor D, se pudo determinar fácilmente que la aplicación de un tratamiento de 3 kGy lograría 1,69 reducciones decimales en el número de esporas, lo que supone una disminución del 96%.

Se ha descrito en queso Gouda que el número de esporas de *C. tyrobutyricum* que se requiere para que se produzca el LBD depende de la medida y el tamaño del queso (Dasgupta y Hull, 1989), habiéndose estimado que 1 espora/ml de leche puede dar lugar al LBD (Fryer y Hallingan, 1976). No obstante, de forma general, se recomienda que la leche que se utilice para la elaboración del queso Gouda debe contener menos de 1 espora/10 ml de leche (Klijn y col., 1995; Su e Ingham, 2000). Aceptando el valor más exigente (0,1 espora/ml de leche), asumiendo un rendimiento de 1 kg de queso por cada 10 litros de leche y admitiendo que todas las esporas queden retenidas en la cuajada, la concentración crítica en la pieza de queso sería de tan solo 1 espora/g. En la leche de vaca se han registrado concentraciones de 3,14 log esporas/l (Zucali y col., 2014), por lo que, siguiendo el razonamiento anterior, la concentración en la pieza de queso sería de 13,8 esporas/g (log=1,14). Tras el tratamiento con 3 kGy, dicha concentración se reduciría a 0,28 esporas/g. Por tanto, el tratamiento con 3 kGy garantizaría una concentración final de esporas por debajo del límite establecido por Klijn y col. (1995), equivalente a 1 espora/g.

La situación en el caso de quesos fabricados con leche de cabra y de oveja sería menos favorable porque el número de esporas es superior al de la leche de vaca

(véase tabla 1.5), especialmente en verano, pudiendo llegar hasta 10^5 esporas/l (Garde y col., 2011a). Obviamente, el tratamiento con 3 kGy en los quesos de esas especies no lograría evitar la presencia del LBD, ya que sobrevivirían alrededor de decenas de esporas. A partir de los datos aportados por distintos autores (Klijn y col., 1995; Ingham y col., 1998), se deduce un tiempo de generación para *C. tyrobutyricum* en queso de aproximadamente 5-7 días a 13 °C, por lo que la aplicación de una dosis de 3 kGy retrasaría el inicio del LBD entre 28 y 39 días, que es el tiempo que *C. tyrobutyricum* tardaría en recuperar las reducciones decimales (1,69 D) causadas por el tratamiento con 3 kGy. A partir de ese momento se necesitarían, en un queso de leche de oveja y con un tiempo de generación de 5 días (el escenario más desfavorable), unas 12 generaciones (61 días) para llegar a manifestarse la alteración LBD asumiendo que ésta ocurre cuando la carga es de alrededor de 5×10^6 cél/g. El queso tendría ya unos 3 meses de maduración.

Si este periodo fuese suficiente para que la sal que difunde desde la superficie alcance concentraciones que inhiban el crecimiento de los clostridios, puede que no llegara a manifestarse el LBD en el queso. Es un aspecto importante dada la sensibilidad de *C. tyrobutyricum* (y las otras especies que pueden causar también el LBD) al descenso de la a_w . Según el trabajo de Düsterhöft y Van der Berg (2007), en quesos Gouda de 10-12 kg, tal concentración de sal se alcanza a las 8 semanas pero no se ofrecen datos sobre la a_w . De los valores aportados para los quesos Manchego (Cabezas y col., 2007), Idiazábal (Etayo y col., 2006) y el de Teruel (Estrada y col., 2011) puede deducirse que los quesos semiduros/duros tienen una a_w en los primeros días de maduración de 0,97-0,98, manteniéndose a ese nivel hasta los 30 días, cuando empieza a mostrar un descenso y llega a 0,95-0,96 a los 60 días y, luego, sigue descendiendo hasta $\leq 0,95$ a los 120 días. El trabajo de Sanjuán y col. (2002) sobre el queso de Los Pedroches, un queso duro fabricado con leche cruda de oveja, proporciona más información; en él se estudia la evolución de la a_w durante 100 días de maduración: comienza a los 2 días con un valor de 0,979, con un ligero

descenso (entre 0,976 y 0,962) en las siguientes 4 semanas, a los 30 días el valor es de 0,96 y a los 43, la a_w es de 0,953, que puede considerarse como un valor inhibitorio para el crecimiento de *C. tyrobutyricum*; a los 100 días es de 0,929, un nivel típico de los quesos duros al final del proceso madurativo. De estos datos, cabe deducir que *C. tyrobutyricum* germinaría y crecería en quesos irradiados con 3 kGy si hubiese esporas supervivientes, ya que la a_w mínima para la germinación de *C. tyrobutyricum* es de 0,965 (Huchet y col., 1995) y para el crecimiento, de 0,95-0,96 (Ghoddusi y col., 2013). No obstante, transcurridos 40-60 días se ralentizaría su crecimiento y difícilmente se llegaría a los niveles a los que se manifiesta el LBD.

Es probable que los resultados de la irradiación sean aún más prometedores. En los supuestos anteriores se ha asumido que, en el momento de aplicar el tratamiento, todas las BAB presentes en la leche pasarían al queso en forma de esporas. Sin embargo, la totalidad de las esporas de *C. tyrobutyricum* no pasan al queso, ya que se ha estimado que aproximadamente un 23% escapa con el suero y, además, otra parte germina antes del salado (Ávila y col., 2016). Puesto que las células vegetativas son mucho más radiolábiles que las esporas, la concentración de BAB tras el tratamiento sería inferior y el hinchamiento tardaría más tiempo en manifestarse. Puede presumirse, en consecuencia, que, al parecer, la aplicación de un tratamiento con radiaciones ionizantes del orden de 3 kGy evitaría la presentación del LBD.

Un aspecto que no puede obviarse es el escaso poder de penetración de los electrones acelerados. A la energía máxima permitida en alimentos (10 MeV), la radiación solo alcanza los 4-5 cm de espesor. Puesto que los quesos duros y semiduros superan habitualmente los 10 cm de altura, el tratamiento bilateral podría no ser suficiente para tratar toda la pieza. Por tanto, habría que recurrir a utilizar como fuente de radiación los rayos gamma o rayos X, que tienen un mayor poder de penetración.

Además de afectar a los quesos duros y semiduros, el LBD es la principal alteración microbiana de los quesos fundidos (Oliveira y col., 2016). Este tipo de quesos se elabora habitualmente con los excedentes de producción y/o piezas con defectos comerciales de aquellas variedades, incluyendo porciones de quesos en los que se ha detectado el LBD antes de aparecer alteraciones físicas y/o sensoriales manifiestas o en los que el defecto está muy localizado (Albertini y Menguzzato, 1999; Zalazar y col., 2006). Durante el procesado de quesos fundidos, el material de partida se somete a temperaturas de unos 80 °C junto con otros ingredientes (sales fundentes, grasa de origen lácteo, emulsionantes, etc.). Dicho tratamiento térmico destruye las formas vegetativas de la microbiota presente en la mezcla, pero también estimula la germinación de las esporas de *Clostridium* spp. La masa de queso fundido se dispensa en envases que, una vez termosellados y enfriados, se conservan generalmente en refrigeración. Así, la ausencia de otros competidores y las condiciones de pH, sal y escasez de oxígeno favorecen el crecimiento de esporulados cuando se produce un abuso de temperatura. El tratamiento con electrones acelerados podría ser una alternativa eficaz para el control de estos clostridios en los quesos fundidos untables en su envase final, ya que el tamaño de las tarrinas, inferior a los 4-5 cm, permite la penetración de la radiación en todo el producto. Bajo esta premisa se hizo un estudio preliminar en el que se inocularon esporas de *C. tyrobutyricum* (10^5 esporas/g) en tarrinas de queso fundido que posteriormente se irradiaron a dosis de entre 0,5 y 8 kGy. El valor D obtenido fue 1,40 kGy, de manera que la aplicación de 2,5 kGy supondría la eliminación del 98% de las esporas (Cabeza y col., 2011). Restaría un número de supervivientes excesivo (alrededor de 1000 espora/g). A buen seguro aparecería el LBD, sobre todo si durante el almacenamiento se produjera un abuso de temperatura. Por ejemplo, a 13 °C con un tiempo de generación de 5-7 días (Klijin y col., 1995; Ingham y col., 1998), si el abuso de temperatura se mantuviera siempre, se presentaría el LBD tras unas 10 generaciones, cuando se alcance el valor de 6-7 logs, o sea, después de aproximadamente 60 días. No obstante, el efecto que se discute deriva de un modelo

experimental donde la carga de esporas inoculadas es muy elevada (habitualmente se hace así para poder obtener parámetros de destrucción y extraer conclusiones). Sin embargo, en la práctica, por una parte, se supone que el número de esporas presente es más bajo, habiéndose informado que se sitúa entre 10 y unos pocos cientos de esporas/g (Loessner y col., 1997) aunque realmente se desconoce la concentración mínima de esporas en queso fundido que provoca el LBD (Su e Ingham, 2000; Oliveira y col., 2016) y, por otra, el abuso de temperatura durante la vida útil del queso no se produce de forma ininterrumpida sino que, lo más probable, es que sean tiempos discontinuos (normalmente horas o días) durante su vida comercial. De hecho, puede observarse en las etiquetas de los quesos fundidos comerciales una indicación de consumo preferente bajo refrigeración de unos 4 meses.

5.3. HIGIENIZACIÓN, CON RESPECTO A *Listeria monocytogenes*, DE QUESOS DE PASTA BLANDA MADURADOS SUPERFICIALMENTE CON MOHOS

La higienización de los alimentos persigue la eliminación de un microorganismo patógeno hasta un adecuado nivel de protección del consumidor (ALOP, del inglés *Appropriate Level Of Protection*) aplicando un determinado tratamiento. Este término fue acuñado por la Organización Mundial del Comercio en el «Acuerdo sobre la aplicación de medidas sanitarias y fitosanitarias», que reconoce la responsabilidad de cada estado miembro para decidir qué nivel de protección de la salud de las personas, animales o plantas es apropiado en su territorio con las medidas adoptadas para tal fin (OMC, 1995). Así, el ALOP es el nivel de riesgo que cada país estima tolerable tras considerar los factores relacionados con el microorganismo, el alimento, las medidas de control, los requisitos legales, los costes y la disposición de los consumidores a aceptar riesgos asociados a los alimentos (Whiting y Buchanan, 2014). Surgen así los criterios microbiológicos de los diferentes países. En el caso de *L. monocytogenes*, los criterios microbiológicos de EE. UU. son más restrictivos que en la UE, ya que la valoración del peligro realizada por la FDA considera los posibles

e infrecuentes casos debidos a alimentos contaminados a muy baja concentración pero con clones de listerias especialmente virulentos (Archer, 2018) y se ha decantado por el criterio de tolerancia cero, es decir «ausencia en 25 g» de muestra a lo largo de la vida útil del alimento. En cambio, la UE, basándose en informes científicos rigurosos, opina que el nivel estricto de «ausencia en 25 g» para *L. monocytogenes* no proporciona un nivel mayor de protección en individuos normales, ya que se considera que la dosis infectiva de esta bacteria es muy elevada (Ross y col., 2000; ICMSF, 2004). No obstante, si los alimentos van destinados a colectivos especialmente sensibles (p. ej., personas inmunodeprimidas, población infantil, embarazadas, etc.), el criterio es de «tolerancia cero». En la tabla 5.1 se muestra el criterio microbiológico de la UE [Reglamento (CE) 1441/2007] para los alimentos RTE.

Tabla 5.1. Límites máximos de *L. monocytogenes* de acuerdo al criterio microbiológico de la UE para alimentos RTE. (Adaptado del Reglamento (CE) 1441/2007).

Categoría	Límite
Alimentos destinados a lactantes y a usos médicos especiales ⁽¹⁾	Ausencia/25g
Alimentos RTE que NO pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i>	a) pH ≤ 4,4 o $a_w \leq 0,92$ b) pH ≤ 5,0 y $a_w \leq 0,94$ c) Vida útil < 5 días 100 ufc/g (vida útil)
Alimentos RTE que SÍ pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i>	a) El fabricante SÍ puede demostrar que no se superará las 100 ufc/g durante su vida útil ⁽²⁾ 100 ufc/g (vida útil) b) NO se puede demostrar que no se superará las 100 ufc/g durante su vida útil Ausencia/25g (planta de procesado) ⁽³⁾

⁽¹⁾ Salvo excepciones recogidas en el Reglamento, p. ej.: productos tratados térmicamente en el envase final, pan, galletas, aguas embotelladas, azúcar, golosinas.

⁽²⁾ El fabricante puede fijar límites intermedios durante el proceso que deben ser suficientemente bajos para garantizar que no se supere el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil.

⁽³⁾ Antes que el alimento haya dejado el control inmediato del fabricante que lo ha producido.

La industria alimentaria no puede comprometerse a lograr una meta que no pueda alcanzar; imagínese, por ejemplo, que una empresa se plantea el objetivo de que los productos que elabora ocasionen como máximo 10 brotes anuales de

salmonelosis por 100 000 habitantes. Aunque esta meta pudiera ser razonable y deseable, la industria, por sí misma, no puede alcanzarla porque se requiere el esfuerzo conjunto de varios sectores. Para resolver esta situación se acuñó el concepto de «objetivo de seguridad alimentaria» (FSO, del inglés *Food Safety Objective*) que indica incuestionablemente el grado del peligro que se considera tolerable y que las industrias pueden asumir tomando las medidas necesarias para conseguirlo.

En 2002 se celebró un encuentro conjunto FAO/OMS en el que se analizaron profundamente los conceptos ALOP y FSO en relación con la seguridad alimentaria. También en ese año la ICMSF (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods*) publicó un libro (versión en español, ACRIBIA, 2004), donde se discutía, dentro de la gestión de la seguridad alimentaria, la evaluación de riesgos y el establecimiento de objetivos de seguridad alimentaria. El siguiente año, en una reunión conjunta del *International Life Sciences Institute* (ILSI-Europa) y una comisión de la ICMSF celebrada en Marsella se presentó la oportunidad de reunir por vez primera a tres colectivos interesados en la seguridad alimentaria: industriales, científicos y personal gubernamental. En las sesiones de la reunión se abordó extensamente el impacto del entonces reciente concepto de FSO en los principios en que descansa la seguridad microbiológica de los alimentos y los procedimientos para su gestión. Las conclusiones se recogieron en la revista *Food Control* (Stringer, 2005). A partir de entonces, el concepto de FSO se viene utilizando habitualmente para convertir el «riesgo microbiano» en un objetivo definible en los sistemas operacionales en la gestión de la seguridad alimentaria.

El FSO se define como la *frecuencia máxima y/o la concentración máxima de un peligro en un alimento en el momento de su consumo, que permite el nivel adecuado de protección (ALOP)* (ICMSF, 2006). El establecimiento del FSO en un determinado alimento depende de varios factores; cabe citar entre ellos la dosis infectiva del patógeno, las características propias del patógeno, su nivel de exposición, la

concentración inicial en el alimento y su posible multiplicación o destrucción durante el procesado, almacenamiento, distribución y preparación culinaria para su consumo (Ordóñez, 2007).

La consecución del FSO en cualquier matriz alimentaria respecto a un determinado agente patógeno es una tarea que se realiza en varias etapas secuenciales basadas en los conceptos que se han incorporado para la gestión de la seguridad alimentaria. Sucintamente:

- Objetivo de rendimiento (OR, *performance objective*): nivel de un determinado peligro que hay que contemplar para que, tras el aumento que pueda producirse durante una etapa (p. ej., durante el almacenamiento), su número no supere el FSO que se haya establecido.

- Criterio de rendimiento (CR, *performance criterion*): descenso del número de microorganismos (p. ej., reducciones decimales) que hay que conseguir para que se cumpla el FSO establecido.

- Criterio del proceso (CP, *process criterion*): intensidad del proceso tecnológico para lograr el efecto deseado, es decir, el criterio de rendimiento. Este valor depende de la resistencia del microorganismo en cuestión frente a la tecnología empleada.

De acuerdo con el criterio recogido en la tabla 5.1, dadas las características de pH y a_w de los quesos blandos madurados por mohos, el límite máximo en el número de listerias es de ausencia en 25 g antes de que haya dejado el control inmediato de la empresa productora, a no ser que el fabricante pueda demostrar que no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil. Para ello, como indica el reglamento, «el explotador podrá fijar límites intermedios durante el proceso, que deberían ser lo suficientemente bajos para garantizar que no se supere el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil». Por tanto, los FSO con respecto a *L. monocytogenes* establecidos para este tipo de quesos pasarían a ser de 100 ufc/g ($\log=2$) durante su vida útil para UE. Sin embargo, continuaría siendo de ausencia en 25 g (equivalente a 4 ufc/100 g; $\log=-1,39$) para EE. UU. y otros países con el criterio de «tolerancia cero».

El tratamiento de higienización, con cualquier tecnología que se utilice, deberá ser suficiente para que, con independencia de la carga inicial del patógeno (H_0) y el incremento (Δ) de la misma durante la vida útil del producto, la concentración en el momento del consumo no supere el FSO. Así, es necesario establecer el CR. En el contexto de esta tesis, es el número de reducciones decimales necesarias en la carga de listerias para garantizar que no se superará el límite establecido en cada caso, que puede estimarse con la siguiente ecuación (ICMSF, 2004):

$$FSO \geq H_0 + \Delta - CR$$

donde H_0 es la carga inicial del patógeno en el alimento y Δ , el aumento del número de microorganismos durante la vida útil de dicho alimento.

La H_0 de *L. monocytogenes* en la leche de partida depende de las prácticas higiénicas durante el ordeño, limpieza de las instalaciones, etc. La contaminación ambiental en los casos en que no se observan estas medidas se traduce en una concentración inicial de 2,25 listerias/ml de leche cruda (Bemrah y col., 1988). Los quesos Camembert de Normandía y Brie de Meaux, amparados por sus respectivas DOP, han de elaborarse con leche cruda de vaca. Sin embargo, las denominaciones genéricas Camembert y Brie no están sujetas a reglamentos específicos, por lo que en su fabricación puede usarse tanto leche pasteurizada como cruda. Las fuentes de la contaminación y la evolución de la microbiota, incluidas las listerias, en uno u otro caso serán diferentes, pues también se ven afectados algunos sistemas enzimáticos de la leche que influyen en el comportamiento de *L. monocytogenes* (Gay y Amgar, 2005).

De acuerdo a los datos anteriores y asumiendo que para la elaboración de un queso Camembert (piezas de 250 g) y un queso Brie (piezas de 2250 g) se necesitan 2,2 y 22,5 litros de leche, respectivamente y, admitiendo que el 90% de las listerias presentes en la leche quedan retenidas en la cuajada (Bemrah y col., 1988), el queso fresco de estas variedades elaborado con leche cruda contendría inicialmente $4,46 \cdot 10^3$ y $4,56 \cdot 10^4$ células/pieza, respectivamente. Sanaa y col. (2004)

establecieron que la población de *L. monocytogenes* se multiplica hasta el momento del consumo por un factor de $10^{4,41}$ y $10^{5,02}$ en la corteza (10% de la pieza) de los quesos Camembert de Normandía y Brie de Meaux, respectivamente. Mientras, en el interior de estos mismos quesos (90% de la pieza), donde las condiciones son más exigentes, la concentración de listerias al final de su vida útil será, respectivamente, $10^{2,54}$ y $10^{2,37}$ veces mayor que la inicial (Sanaa y col., 2004). Por tanto, en los quesos Camembert y Brie elaborados con leche cruda obtenida sin las adecuadas medidas higiénicas, se calcula que la carga de listerias en el momento del consumo puede llegar a 4,71 y 5,29 log cél/g, respectivamente, unas 1000 veces mayor que el criterio establecido en la UE.

Se ha indicado en la Introducción (véase apartado 1.3.4.2) que, en el caso de los quesos elaborados con leche pasteurizada, el tratamiento térmico generalmente aplicado es de 72 °C, 15 s. En la amplia revisión de Mackey y Bratchell (1989) sobre la termorresistencia de *L. monocytogenes* en leche tratada en flujo continuo, los autores deducen un valor $D_{72\text{ °C}}$ medio de 2,7 (2,4-2,9) segundos. El tratamiento HTST (72 °C, 15 s) provoca, por tanto, una letalidad de 5,5 reducciones decimales. Por otra parte, la carga de listerias que se ha descrito en leche cruda varía entre 0,05-0,1 ufc/ml (Meyer-Broseta y col., 2003). Teniendo en cuenta el mayor valor (0,1 ufc/ml) la leche pasteurizada tendría una carga final del orden de 1 célula/1000 litros, equivalente aproximadamente a 100-114 kg de queso Brie y Camembert, respectivamente. Es decir, una carga totalmente insignificante e intrascendente. En trabajos anteriores al de Meyer-Broseta y col. (2003), p. ej. el de Lovett y col. (1987), se indica que la leche cruda podría contener regularmente 1 célula/ml de *L. monocytogenes*. En este caso, más desfavorable, la carga final de listerias en el queso de leche pasteurizada sería una 10 veces mayor (1 célula/10-11,4 kg de queso), un valor también intrascendente desde el punto de vista de la presencia de *L. monocytogenes* en el queso. Téngase en cuenta que la legislación europea permite 100 células de *L. monocytogenes* por g (Reglamento (CE) 1441/2007). Puede

decirse, pues, que la presencia de niveles cuestionables de *L. monocytogenes* en el queso fabricado con leche pasteurizada es más probable que proceda de una contaminación pospasteurización, lo que también ha sido advertido por varios autores y organismos reguladores (Gould y col., 2014; FDA, 2017; EFSA-BIOHAZ, 2018). Por tanto, el cálculo del FSO tiene que considerar la carga inicial debida a la contaminación durante el proceso. La ICMSF estima, en el peor de los casos, en 10 ufc/g la concentración de *L. monocytogenes* procedente de la contaminación ambiental posproceso de salchichas tipo Frankfurt (ICMSF, 2002) y productos cárnicos loncheados o *deli-meats* (ICMSF, 2018). Asumiendo que el nivel de *L. monocytogenes* en las queserías es similar al de las instalaciones de las industrias cárnicas, se ha considerado una carga inicial (H_0) de 1 log ufc/g para calcular el CR en los quesos elaborados con leche pasteurizada. Dado que *L. monocytogenes* es un organismo psicrotrofo, su concentración aumentará durante la vida útil del producto. En la evaluación de riesgos de *L. monocytogenes* publicado por la FDA (2003) se recoge un incremento típico de 0,071 log ufc/día a 4 °C en queso Camembert. Suponiendo una vida útil del queso de 60 días a esta temperatura, el incremento que se produciría al final de este período será de 5,26 log ufc/g en ambos quesos.

El CP viene dado por el producto del criterio de rendimiento por la dosis de reducción decimal:

$$CP = CR \times \text{valor } D$$

Por tanto, para su cálculo se determinaron los valores D de *L. monocytogenes* y de *Listeria innocua*. Esta última especie, además de presentar un crecimiento similar en queso (Liu y col., 2009), es más radiorresistente que *L. monocytogenes* (Cabeza y col., 2007; Hoz y col., 2008; Cabeza y col., 2011; Cambero y col., 2012). En el presente trabajo, los valores D de *L. innocua* fueron 0,36 y 0,39 kGy en los quesos Camembert y Brie, respectivamente, frente a los de *L. monocytogenes* que fueron de 0,34 kGy en ambos tipos de queso. Por tanto, para el cálculo de los CP se tuvo en

cuenta el dato más desfavorable, esto es, el valor D de *L. innocua* en queso Brie (tabla 5.2).

Tabla 5.2. Parámetros de seguridad alimentaria para la higienización con respecto a *L. monocytogenes* de quesos Camembert (C) y Brie (B) de acuerdo a las reglamentaciones de la UE y EE. UU.

Parámetro ^a	UE		EE. UU.	
	Quesos de leche cruda	Quesos de leche pasteurizada	Quesos de leche cruda	Quesos de leche pasteurizada
FSO	100 ufc/g (log = 2)		Ausencia/25g (log = -1,39)	
CR	↓ 2,71 D (C) ↓ 3,29 D (B)	↓ 3,26 D (C, B)	↓ 6,10 D (C) ↓ 6,68 D (B)	↓ 6,65 D (C, B)
CP	1,06 kGy (C) 1,28 kGy (B)	1,27 kGy (C, B)	2,38 kGy (C) 2,60 kGy (B)	2,59 kGy (C, B)

^a FSO: Objetivo de seguridad alimentaria; CR: Criterio de rendimiento; CP: Criterio de proceso.

Bougle y Stahl (1994) calcularon un valor D de 0,5 kGy en quesos Camembert elaborados con leche cruda inoculada con distintas cargas de *L. monocytogenes*. Estos autores aplicaron una dosis de 2,6 kGy a un queso con un nivel de contaminación de 10^5 ufc/g; tras llevar a cabo cultivos de enriquecimiento para detectar presencia/ausencia en 25 g de queso, observaron resultados positivos hasta los 45 días después de la inoculación, pero fue negativo a los 60 días. Sin embargo, cuando la carga inicial de listerias fue 10^4 ufc/g no detectaron crecimiento incluso después de 60 días. Los autores afirmaron: «A treatment dose of 2,6 kGy... allows a complete destrucción of 10^4 *L. monocytogenes/g*». La fórmula $CP = CR \times \text{valor D}$ ($2,6 = CR \times 0,5$) permite deducir que se produjeron 5,2 reducciones decimales, lo que a su vez significa que la carga final de *L. monocytogenes* en el queso era de 0,06 células/g, es decir, 1,5 células en 25 g. Este valor es equivalente, prácticamente, a «ausencia en 25 g». De hecho los autores en el medio de enriquecimiento no detectaron crecimiento en 25 g de queso. Estos resultados coinciden plenamente con los obtenidos por la autora de esta memoria (nótese en la tabla 5.2 en la columna de

«quesos de leche cruda» del bloque de EE. UU. que el tratamiento de 2,6 kGy aplicado por Bougle y Stahl es igual al CP hallado para el queso Brie).

Los CP hallados en esta tesis, y el tratamiento propuesto por Bougle y Stahl (1994), están en consonancia con la dosis de 2,5 kGy considerada como aceptable por el Comité Científico de la Alimentación Humana de la Comisión Europea (CE, 2001) para el tratamiento de queso Camembert elaborado con leche cruda. Asimismo, se ajusta a lo que en su día estableció Francia para tal fin en la disposición derogada en 2002. No obstante, se ha seguido un planteamiento conservador en los cálculos de los CR con el propósito de asegurar el cumplimiento de los distintos FSO, aunque ello implique sobrestimar la dosis necesaria. Por ejemplo, la concentración inicial de 2,25 listerias/ml en la leche cruda (Bemrah y col., 1988) supera ampliamente (más de 20 veces) la carga que habitualmente se ha descrito en los tanques de leche, en el intervalo de 0,05-0,1 cél/ml (Meyer-Broseta y col., 2003). De hecho, las concentraciones finales de *L. monocytogenes* calculadas en el presente estudio (4,71-5,29 log ufc/g) para hallar el OR superan los valores medios (1,23-3,13 log ufc/g) recogidos por la RASFF en el periodo 2008-2016, y son del mismo orden de magnitud que los registrados en lotes concretos con las concentraciones máximas en dicho periodo, por ejemplo, en queso elaborado con leche cruda de búfala (5,87 log ufc/g), queso de leche cruda de vaca (5,30 log ufc/g), queso Gorgonzola (5,28 log ufc/g) y un tipo de queso sin especificar (5,15 log ufc/g) (EFSA-BIOHAZ, 2018).

Para el cálculo del CR, además, no se ha tenido en consideración el efecto del daño subletal de la radiación ionizante en los parámetros de crecimiento de las listerias supervivientes, y se ha asumido, por una parte, el mismo tiempo de generación que el de la población no irradiada y, por otra, que tras el tratamiento, empezaría a multiplicarse sin fase de latencia. Sin embargo, Cabeza y col. (2010) observaron un aumento significativo tanto de la fase de latencia como del tiempo de generación de *L. monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* en jamón cocido tratado

con electrones acelerados a una dosis de 2 kGy. En la microbiota láctica de los quesos empleados en esta tesis se ha observado el mismo fenómeno (véase 5.4), por lo que cabe inferir que la aplicación de las dosis calculadas para la higienización de los quesos madurados superficialmente por mohos conlleva un margen de seguridad que garantiza la eficacia del proceso.

Como se ha mencionado en el preámbulo de este capítulo, la matriz de los quesos duros es desfavorable para el crecimiento de *L. monocytogenes*. De acuerdo con los datos recopilados por la FDA (2003), la concentración de este microorganismo en queso Cheddar disminuye 0,049 y 0,003 unidades logarítmicas diarias a 4 y 14 °C, respectivamente. Sin embargo, su presencia en esta variedad de queso puede dar lugar a contaminaciones cruzadas en aquellas preparaciones RTE que integren este queso como ingrediente, de manera que, al no precisar de cocinado previo al consumo, las listerias podrían multiplicarse a niveles peligrosos para la salud, siempre que los factores que influyen en el crecimiento lo permitieran, por ejemplo, si la a_w fuese mayor de 0,92. Sin embargo, el escenario preocupante es el relacionado con los países que han impuesto el criterio de ausencia en 25 g. El simple resultado positivo en un test de presencia/ausencia acarrearía el decomiso de la partida, lo que conllevaría un claro perjuicio económico. La posibilidad de ambos escenarios ha motivado la inclusión de esta variedad en los tratamientos propuestos. Se ha informado que la máxima concentración detectada de *L. monocytogenes* en queso Cheddar es de 20 ufc/g (Dalmasso y Jordan, 2013). En consecuencia, se ha partido de este valor inicial para calcular el CP. Esta misma carga sería la que tendría el queso al final de su vida útil, ya que, como se ha mencionado, las características de este producto no permiten el crecimiento de *L. monocytogenes*. De acuerdo con la opinión de la ICMSF (2004), esta contaminación es superior a la que podría darse durante las operaciones de reducción de tamaño (loncheado, rallado, etc.) y envasado (10 ufc/g). La consecución del FSO de acuerdo al criterio de la UE (100 ufc/g) no precisa, pues, ningún tratamiento de las piezas de queso. Sin

embargo, en EE. UU., donde el criterio es de ausencia en 25 g, habría que conseguir 2,69 reducciones decimales. Tomando el valor D para *L. monocytogenes* en lonchas de queso Cheddar (0,64 kGy) aportado por Kim y col. (2007), el CP resultante sería de 1,72 kGy.

5.4. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON RADIACIONES IONIZANTES EN LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y EN LA MICROBIOTA LÁCTICA

El modelo de barreras de Leistner (1992) establece que el crecimiento microbiano en un alimento puede controlarse por la combinación de diversos factores/agentes que inhiban/destruyan al microorganismo. La a_w y el pH son los dos factores propios de las matrices alimentarias que más contribuyen a dicho control. Por ello, se analizaron los posibles cambios que pudiera provocar la aplicación de electrones acelerados en estos factores y que, a su vez, afectara al comportamiento de la microbiota. La microbiota mayoritaria de todos los quesos son las bacterias ácido lácticas (BAL), cuyo número supera ampliamente al de las bacterias diana que se pretende destruir. En cualquier caso, el tratamiento con radiaciones ionizantes reducirá, en mayor o menor grado, el número de BAL. Es necesario investigar este efecto al irradiar el queso porque las BAL participan activamente en los fenómenos bioquímicos que acaecen en un queso en maduración.

Además de los factores dependientes de la matriz y del microorganismo, la temperatura influye decisivamente en el crecimiento microbiano y demás cambios que tienen lugar en cualquier alimento. Por ello, los experimentos se hicieron a temperaturas de almacenamiento en refrigeración (4 °C) y a las que habitualmente se emplean en la maduración del queso (10-14 °C).

5.4.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ELECTRONES ACELERADOS EN LA a_w Y pH DEL QUESO

El tratamiento con electrones acelerados a dosis de hasta 3 kGy produjo pequeños cambios en la a_w y el pH de los quesos semiduro de pasta prensada, blandos

(Camembert y Brie), y duro (Cheddar), como puede apreciarse en los artículos 1, 2 y 4, respectivamente, del capítulo *Resultados*. Inmediatamente después del tratamiento, en ninguno de los casos se encontraron diferencias significativas entre los quesos no tratados y los irradiados a las dosis ensayadas. En general, los quesos duros y semiduros, una vez alcanzaron el grado de maduración deseado, presentaron pocas variaciones en los valores de a_w y pH. Sin embargo, en los quesos Camembert y Brie, estos parámetros se modificaron merced a la acción de la microbiota superficial. Durante el almacenamiento se observaron ligeros incrementos de la a_w tanto en las muestras control como en las tratadas, especialmente en las del queso Camembert. Este fenómeno se ha atribuido a la intensa proteólisis que tiene lugar durante su maduración, ya que, al fragmentarse progresivamente las caseínas, se van acumulando compuestos nitrogenados de menor peso molecular y con mayor actividad osmótica. Por otra parte, la microbiota fúngica superficial metaboliza el ácido láctico, creándose un gradiente de pH entre la corteza y el interior. Las determinaciones del pH en ambas zonas revelaron que en el interior del queso no se producían variaciones, pero en la corteza este parámetro fue disminuyendo durante el almacenamiento hasta alcanzar valores cercanos a 6 tras 41 y 19 días a 4 y 14 °C, respectivamente. Estos cambios fueron independientes de la dosis absorbida.

Puede concluirse que los cambios en las características fisicoquímicas del queso debidos al tratamiento con electrones acelerados no tienen, en caso de producirse, la magnitud suficiente para influir en el crecimiento microbiano.

5.4.2. RESPUESTA DE LAS BAL FRENTE AL TRATAMIENTO CON ELECTRONES ACELERADOS

En los quesos elaborados con leche pasteurizada la principal fuente de BAL es el cultivo iniciador que se añade después del tratamiento térmico. No obstante, es habitual la presencia de otros microorganismos procedentes del ambiente de las instalaciones y del equipamiento (Picón, 2017) e incluso de la propia leche tras sobrevivir (las subpoblaciones de BAL más termorresistentes) al tratamiento térmico

(Ordóñez y col., 1998; Fox y col., 2017). En consecuencia, se trata de una población microbiana diversa cuya composición va variando con el tiempo, pero que, desde un punto de vista cuantitativo, se mantiene en elevadas concentraciones (aprox. 10^8 ufc/g) desde el comienzo de la maduración (Fox y col., 2017) con predominio de las BAL (Ordóñez y col., 1998). Los recuentos realizados en las muestras no irradiadas confirmaron tal observación, lo que permitió determinar con certeza los parámetros de inactivación de las BAL presentes en los quesos frente a los electrones acelerados. Todas las cinéticas de destrucción se ajustaron a una ecuación de primer orden, pudiéndose calcular los correspondientes valores D (tabla 5.3). Los resultados obtenidos están en consonancia con el intervalo de valores D para bacterias Gram positivas (0,4-1,0 kGy) ofrecido por Ordóñez y col. (2019b). Cabe destacar, sin embargo, las «colas» observadas en los quesos Camembert y Brie (véase la figura 2 del artículo 2 de la presente memoria). Tanto la presencia de esta subpoblación más radiorresistente como las diferencias entre los valores D obtenidos se deben, con toda probabilidad, a la diversidad de bacterias que forman la microbiota láctica de cada queso, ya que se ha informado que la radiorresistencia depende de la especie y/o cepa y también de otros factores como la fase de crecimiento y las condiciones previas a las que el microorganismo ha sido sometido (Cabo Verde, 2018). No obstante, también podría ocurrir que, al predominar cuantitativamente la microbiota láctica y ser ésta homogénea, los primeros tramos de las gráficas de supervivencia se ajustarían a una ecuación de primer grado pero, si han alcanzado el queso bacterias del ambiente, las «colas» podrían proceder de esta microbiota si su radiorresistencia es mayor que la de las BAL, lo que se refleja en la gráfica de supervivencia al disminuir el número de BAL.

Tras la reducción de la microbiota, una parte de las células supervivientes consiguió reparar los daños causados y multiplicarse de nuevo hasta alcanzar los niveles típicos en el queso. Esta recuperación estuvo claramente marcada por la temperatura y la dosis de irradiación. A la temperatura de 4 °C, los daños celulares

producidos por el tratamiento fueron reparados, alcanzándose después niveles cercanos a los iniciales (10^7 - 10^8 ufc/g) pero únicamente en las muestras tratadas con las dosis más bajas (tabla 5.3). En los quesos Camembert y Brie, sin embargo, a dosis de 1 y 2 kGy, la concentración de BAL no varió e incluso continuó disminuyendo durante el almacenamiento en refrigeración. Si bien los valores D estimados en los distintos quesos fueron similares, las diferencias en el contenido en humedad pueden contribuir al daño subletal de las BAL. De acuerdo con los análisis realizados, el porcentaje de humedad fue de 35,6% (Cheddar), 44,7% (semiduro), 45,1% (Camembert) y 47,1% (Brie). Por tanto, en los quesos de pasta blanda cabe esperar que haya un mayor número de radicales libres procedentes de la radiolisis del agua que, a su vez, pudiera provocar un mayor número de alteraciones en el material genético (Daly, 2012). Dichas lesiones, si bien no producirían la muerte celular de forma inmediata, sí podrían causar la alteración de funciones metabólicas o del sistema de reparación y conducir a la muerte celular más tarde, durante el almacenamiento. Este hecho podría deberse a la alteración de los equilibrios de óxido-reducción enzimática por los radicales libres, lo que puede repercutir en los procesos de síntesis metabólica y, particularmente, en la de ácidos nucleicos que, a su vez, afectan a la actividad de las enzimas asociadas a la membrana, ocasionando pérdidas de líquido intracelular e incluso la ruptura de la membrana y muerte celular al cabo de un cierto tiempo después del tratamiento (Ordóñez y col., 1998).

Cuando los quesos se almacenaron a una temperatura más elevada (14 °C), se observó la recuperación de la microbiota láctica incluso en aquellos tratados con 3 kGy, aunque los recuentos finales fueron inferiores ($5,10$ - $6,54$ log ufc/g). Como puede verse en los tiempos de generación a 14 °C de los distintos quesos (tabla 5.3), aunque los daños subletales no impidieron el crecimiento, sí ocasionaron su ralentización durante la fase exponencial de forma proporcional a la dosis aplicada. Este efecto ha sido observado por otros autores con *L. monocytogenes* y *S. aureus* en jamón cocido (Cabeza y col., 2010), con *Bacillus cereus* en caldo de cultivo y

jamón cocido (Aguirre y col., 2012) y en la microbiota de lomo de cerdo, tanto fresco como adobado (García-Márquez y col., 2012a,b).

Tabla 5.3. Evolución de la microbiota de los quesos irradiados a 4 y 14 °C.

Tª almacenamiento ►		4 °C			14 °C			
Queso	Dosis (kGy) ►	1	2	3	1	2	3	
Cheddar	Log X ₀ ¹	6,44	4,00	2,04	6,44	4,00	2,04	
	Log X _{EST} ²	8,37	7,50	< 2	7,71	7,30	5,10	
	Valor D: 0,50 kGy	Tiempo para X _{EST} (días) ³	30	48	-	9	18	21
	Tiempo generación (días)	2,19	2,31	NC ⁴	1,78	1,83	1,88	
Semiduro	Log X ₀	6,30	4,72	3,14	6,30	4,72	3,14	
	Log X _{EST}	7,51	7,04	5,35	7,69	7,34	6,54	
	Valor D: 0,66 kGy	Tiempo para X _{EST} (días)	40	65	85	11	15	21
	Tiempo generación (días)	2,76	3,85	4,24	0,75	0,93	1,04	
Camembert	Log X ₀	6,96	3,79	3,89	6,96	3,79	3,89	
	Log X _{EST}	7,18	3,85	< 2	8,49	7,87	5,72	
	Valor D: 0,42 kGy	Tiempo para X _{EST} (días)	-	-	-	3	12	15
	Tiempo generación (días)	NC ⁴	NC ⁴	8(D) ⁵	0,42	0,99	2,04	
Brie	Log X ₀	5,60	4,02	3,80	5,60	4,02	3,80	
	Log X _{EST}	6,29	< 2	< 2	7,51	6,07	5,25	
	Valor D: 0,51 kGy	Tiempo para X _{EST} (días)	72	-	-	10	27	33
	Tiempo generación (días)	16,36	59(D) ⁵	17(D) ⁵	0,89	1,91	2,91	

¹ Concentración (log ufc/g) después del tratamiento (día 0 del almacenamiento)

² Concentración (log ufc/g) en la fase estacionaria o al final del almacenamiento

³ Tiempo hasta alcanzar la fase estacionaria o final del almacenamiento

⁴ NC: Sin crecimiento

⁵ (D): Tiempo de reducción decimal a la temperatura de almacenamiento

Durante la maduración, la principal contribución de las BAL al desarrollo de las características sensoriales se debe a que, tras su muerte, se produce la autólisis liberándose al medio enzimas y otros componentes celulares (Cotter y Beresford, 2017). En este sentido, la destrucción de las BAL por el tratamiento de irradiación no impediría la acción de dichas enzimas. De hecho, Seisa y col. (2004) ensayaron una dosis de 4 kGy para acelerar la maduración del queso Cheddar, sin que la calidad sensorial del mismo se viera afectada. Por otra parte, tras la aplicación del

tratamiento en los quesos duros y semiduros para el control del hinchamiento tardío, la microbiota láctica se recuperaría en unas tres semanas (Velasco y col., 2011) por lo que, dada la larga maduración de estos quesos, quedaría prácticamente restablecida en el producto final.

La transformación de las piezas de queso en formatos de menor tamaño (lonchas, cuñas, dados, rallado, etc.) plantea un escenario distinto, ya que conlleva un aumento del riesgo de contaminación con *L. monocytogenes* durante el proceso de reducción de tamaño, por lo que la irradiación se aplicaría al producto en su envase final, de manera que la disminución del número de BAL no tendría repercusiones en la calidad sensorial de los quesos.

De las consideraciones anteriores, se puede deducir que, desde los puntos de vista microbiológico y sensorial, la aplicación del tratamiento con radiaciones ionizantes, es una estrategia muy útil para lograr los objetivos tecnológicos y de seguridad alimentaria planteados en esta tesis.

5.5. EFECTO DEL TRATAMIENTO EN LAS PROPIEDADES SENSORIALES

El color y la textura pueden determinar la compra de un producto en concreto frente a otros similares. Por tanto, para optimizar el tratamiento con electrones acelerados es imprescindible saber qué dosis se puede aplicar sin que se produzcan alteraciones de las características sensoriales que supongan el rechazo por el consumidor. Este axioma está explícitamente recogido en el *Codex Alimentarius* (2003) como un factor limitante de la dosis máxima admitida en la irradiación de alimentos. Los cambios químicos inducidos por las radiaciones ionizantes tienen una evolución en el tiempo dependiente de la temperatura del medio (Stewart, 2009). Por ello, se analizaron las características de los quesos a lo largo de su almacenamiento en las condiciones habituales de refrigeración (4 °C) y en las que se utilizan comúnmente para la maduración del queso (14 °C). Estas condiciones, en aquellos quesos que deben mantenerse en refrigeración, pueden considerarse como abuso de temperatura. Con

ello, se pretende emular situaciones en las que podría encontrarse el producto desde su producción hasta que abandona la quesería, así como durante su posterior distribución comercial. En este estudio se incluyeron determinaciones instrumentales del color y del comportamiento reológico de los quesos, tratados a distintas dosis y condiciones de almacenamiento, con el fin de conocer el efecto de los electrones acelerados a nivel estructural y su repercusión en el comportamiento físico. En el análisis de los parámetros de color (luminosidad L^* , tendencia al rojo a^* y tendencia al amarillo b^*) se tuvo en cuenta, además de los factores mencionados, el tiempo de exposición al aire tras la apertura de los envases, ya que en ocasiones puede demorarse el consumo de las porciones (lonchas, cuñas y similares).

Los resultados instrumentales se analizaron mediante un ANOVA multifactorial asociado a técnicas estadísticas multivariantes (regresión múltiple; análisis de componentes principales y análisis de conglomerados o clústeres) con el fin de conocer el efecto de los factores tecnológicos (dosis aplicada, tiempo y temperatura de almacenamiento, tiempo de exposición al aire) en la evolución de los parámetros de color y de textura. Con este proceder, se ha pretendido obtener ecuaciones de regresión que explicaran el alcance de cada factor en los cambios producidos en los distintos atributos. Cabe esperar que estas ecuaciones permitan obtener modelos para predecir las características sensoriales previsibles en cada tipo de queso ante determinados tratamientos de irradiación y condiciones de almacenamiento. Además, se realizaron análisis sensoriales de distinta índole para conocer si los cambios producidos eran detectables por el consumidor. Por un lado, mediante análisis triangular, se valoró si es posible distinguir un queso irradiado de otro no tratado; por otro, se llevaron a cabo análisis de preferencia para evaluar si los cambios debidos al tratamiento mejoraban o menoscababan los atributos sensoriales del producto. En ambos análisis, con el fin de obtener información descriptiva de la percepción del sabor, olor y apariencia de los quesos, se solicitó a los evaluadores que indicaran las razones que motivaron la respuesta.

En la tabla 5.4 se recogen los hallazgos más destacados del efecto de la radiación en las propiedades sensoriales de los quesos, así como las interacciones del factor «dosis aplicada» con el tiempo y temperatura de almacenamiento y el tiempo de exposición al aire en el caso del color. A la vista de los resultados, se confirmó la necesidad de abordar este estudio con técnicas estadísticas multifactoriales, ya que la evolución de los quesos durante el almacenamiento fue distinta en función de los efectos combinados de la dosis aplicada, del tiempo y de la temperatura. En el caso de los parámetros de color, se observó que el efecto del tiempo de exposición al aire interaccionó también de forma significativa con el resto de factores. La apertura del envase implica un cambio importante de las condiciones del entorno, ya que, en un periodo relativamente breve, se produce la deshidratación de la superficie y también pueden tener lugar fenómenos de oxidación en presencia del oxígeno del aire, cuya relevancia en la carne, por ejemplo, es sobradamente conocida (Ordóñez y col., 1998). A este respecto, García-Márquez y col. (2012a,b) comprobaron la interdependencia de la exposición al aire, las condiciones de almacenamiento y la aplicación de radiaciones ionizantes en los cambios en el color de lomos de cerdo, frescos y adobados, sometidos a tratamientos con electrones acelerados hasta dosis de 2 kGy.

En general, los cambios en los atributos de textura asociados a la radiación fueron de poca magnitud, siendo apenas perceptibles en el análisis sensorial. Las variaciones en los parámetros de color, aun siendo detectadas en el análisis sensorial, no motivaron el rechazo de los quesos irradiados. Este aspecto es, sin duda, de gran importancia en aquellas variedades de queso cuyo color es una característica distintiva. Por ejemplo, es habitual que el queso Cheddar genuino, o los tipo Cheddar como el empleado en esta tesis, presenten una tonalidad naranja debida a la adición de colorantes (achiote o sus extractos) durante la elaboración. Estos aspectos se tratan con detalle en el capítulo *Resultados* (artículo 4). En él se indica que la radiación reduce las tonalidades rojizas y amarillentas por el efecto de

los radicales libres procedentes de la radiolisis del agua (principalmente el radical hidroxilo OH·) en los dobles enlaces conjugados de los pigmentos (bixina y norbixina) presentes en el achiote (Cosentino y col., 2016). No obstante, incluso aquellos tratados con dosis de hasta 3 kGy se mantuvieron en la gama de color naranja típica de los quesos comerciales, de manera que no repercutió en su aceptación por parte del consumidor. En el resto de quesos empleados, los matices de color inducidos por el tratamiento fueron más sutiles, hasta tal punto que no fueron detectados por el grupo de panelistas (Camembert y Brie) o no influyeron en la aceptación de las muestras (queso semiduro de pasta prensada).

Sin duda, el aspecto que más inconvenientes plantea son los efectos de la radiación en el olor y sabor, ya que son los principales atributos que determinan la aceptación o el rechazo de un producto por el consumidor. Este aspecto ya ha sido apuntado por diversos autores en productos lácteos (Arvanitoyannis y Tserkezou, 2010; Odueke y col., 2016). Tras la irradiación, las características sápidas y aromáticas fueron evolucionando durante el almacenamiento de los quesos, con resultados similares a ambas temperaturas. De forma general, al comienzo del almacenamiento, los quesos irradiados se diferenciaron de los quesos no tratados, y los primeros fueron peor valorados debido a notas de olor y sabor descritas como «a rancio», «a quemado», «a plástico, caucho», etc. La intensidad de estos olores y sabores, proporcional a la dosis aplicada, provocó el rechazo inicial de la mayor parte de los quesos. Sin embargo, durante el almacenamiento, estas características se disiparon en gran medida, de forma que solo fueron percibidas en los quesos semiduro y de pasta blanda tratados a las dosis mayores (3 kGy). En el queso tipo Cheddar, estas características fueron detectadas en todas las muestras, independientemente de la intensidad del tratamiento. No obstante, solo los quesos de pasta blanda y tipo Cheddar tratados con la dosis más alta (3 kGy) fueron rechazados por la intensidad de los atributos anómalos al final del periodo de almacenamiento.

Tabla 5.4. Análisis conjunto del efecto¹ del tratamiento con electrones acelerados (dosis aplicada) y del almacenamiento (tiempo y temperatura) en los atributos sensoriales de distintos tipos de queso.

Queso	Parámetros instrumentales de color	Apariencia	Parámetros instrumentales de textura (TPA)	Sensación en boca	Relación entre la dosis y los factores de almacenamiento	Condiciones de procesado recomendables
Cheddar	<p>La radiación disminuye el parámetro a^* y atenúa la pérdida de luminosidad, L^*, de la superficie debida a la exposición al aire (≥ 1 kGy).</p> <p>A dosis ≥ 2 kGy disminuye el parámetro b^*.</p>	<p>Los cambios de color permiten diferenciar sensorialmente los quesos tratados (≥ 1 kGy) y los controles.</p>	<p>La masa de los quesos tratados se ablanda (≥ 1 kGy) y pierde cohesividad (≥ 2 kGy).</p> <p>Las diferencias entre los quesos tratados y controles se minimizan durante el almacenamiento a 4°C, mientras que a 14°C la tendencia se invierte.</p>	<p>Olores y sabores anómalos, de intensidad proporcional a la dosis (rechazo de muestras tratadas a ≥ 2 kGy). Los defectos se disipan en ≥ 28 días durante el almacenamiento. Sin embargo los quesos tratados con 3 kGy mantienen características sensoriales no aceptables.</p> <p>La alteración progresiva de los quesos no irradiados conlleva cambios sensoriales que provocan el rechazo del producto tras un almacenamiento de ≥ 28 días.</p>	<p>La radiación (≥ 1 kGy) acentúa los cambios (color y textura) durante el almacenamiento en abuso de temperatura (14°C).</p>	<p>A dosis ≤ 1 kGy. Comercialización sin problemas durante su vida útil.</p> <p>A dosis entre 1 y 2 kGy. Comercialización condicionada a un almacenamiento de ≥ 28 días, para reducir o anular el efecto en atributos sensoriales.</p>
Semiduro, pasta prensada	<p>Dosis de ≥ 1 kGy aumenta el parámetro a^* y disminuye el b^*.</p>	<p>Se perciben diferencias entre quesos tratados y controles (≥ 1 kGy).</p>	<p>Al aplicar 3 kGy, las muestras se ablandan y aumenta la cohesividad.</p>	<p>Los olores (≥ 2 kGy) y sabores (3 kGy) anómalos se disipan a lo largo del almacenamiento.</p> <p>Pérdida significativa de la aceptación de las muestras tratadas a 3 kGy, aunque se consideran aceptables para el consumo.</p>	<p>La radiación atenúa la reducción de a^* durante el almacenamiento, pero se potencia al exponer las muestras al aire.</p> <p>Este efecto depende del tiempo y dosis aplicada. A los 14 días no hay diferencias significativas entre los quesos control y tratados a 1 kGy.</p>	<p>A dosis ≤ 2 kGy. Comercialización sin problemas durante la vida útil.</p> <p>A dosis de 3 kGy. Disminuye la calidad sensorial del queso, aunque sin motivar el rechazo por el consumidor.</p>

Tabla 5.4. (Continuación). Análisis conjunto del efecto¹ del tratamiento con electrones acelerados (dosis aplicada) y del almacenamiento (tiempo y temperatura) en los atributos sensoriales de distintos tipos de queso.

Queso	Parámetros instrumentales de color	Apariencia	Parámetros instrumentales de textura (TPA)	Sensación en boca	Relación entre la dosis y los factores de almacenamiento	Condiciones de procesado recomendables
Camembert	Sin cambios significativos en la corteza y en la matriz del queso tras la irradiación.	No se observan diferencias significativas.	Reducción de la dureza, cohesividad y gomosidad proporcionalmente a la dosis aplicada.	Aparición de matices sápidos y aromáticos cuestionables en las muestras irradiadas, que se disipan durante el almacenamiento (4-14°C). A los 20 días solo se detectan en las muestras tratadas a 3 kGy.	La radiación mitiga la pérdida de color (L^* , a^*) originada por el almacenamiento y el contacto con el aire. El efecto del tiempo de almacenamiento tiene mayor alcance en los parámetros de textura que la dosis aplicada.	A dosis ≤ 2 kGy. Comercialización condicionada a un almacenamiento ≥ 20 días para reducir el efecto en atributos sensoriales
Brie	El tratamiento no produce cambios salvo un ligero incremento de a^* en los quesos tratados a 3 kGy.	No se observan diferencias significativas.	No hay efecto dosis en la dureza y gomosidad. La radiación reduce los cambios en la cohesividad durante el almacenamiento.	Efectos similares a los descritos en el queso Camembert.	Mismo comportamiento que el queso Camembert.	Mismas condiciones que para el queso Camembert.

¹ Resultados más destacados obtenidos mediante análisis instrumentales y sensoriales.

La presencia de estos olores y sabores anómalos ha sido descrita en diversos quesos irradiados (Abd El Baky y col., 1986; Tsiotsias y col., 2002; Konteles y col., 2009; Lacivita y col., 2019) y se ha atribuido a fenómenos de oxidación de lípidos y proteínas (Merritt y col., 1967; Lee y Ahn, 2003; Dalsgaard y col., 2010). Su disipación durante el almacenamiento se explica merced a sucesivas reacciones de oxidación (Buttery y col., 1973; Nawar, 1985; Lee y Ahn, 2003; Konteles y col., 2009). Así, los hidroperóxidos formados tras el tratamiento se transformarían en compuestos volátiles —aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, hidrocarburos y alcoholes— responsables de los olores anómalos que se detectan al comienzo del almacenamiento. Posteriormente, estos compuestos pueden desvanecerse o bien dar lugar, mediante reacciones de polimerización e isomerización, a sustancias no volátiles o con un umbral de detección sensorial mayor. Con los datos disponibles, tanto derivados del desarrollo de esta tesis como de la bibliografía científica existente, es difícil explicar la distinta evolución durante el almacenamiento de los quesos Cheddar y los otros quesos analizados con similar contenido en grasa [Cheddar (35,6%), Camembert (31,9%) y Brie (36,8%)] y en proteína [27,9% (Cheddar), 24,5% (Camembert) y algo más bajo en Brie (19,0%)] referidos a base húmeda. No obstante, se considera que el efecto de los tratamientos con radiaciones ionizantes estaría condicionado por el contenido en humedad y por las características estructurales de la matriz del queso, que difiere considerablemente de unos tipos a otros (desde altos grados de organización, con establecimiento de redes tridimensionales más o menos densas, hasta estructuras amorfas, más o menos viscosas). Estos factores condicionarían la cantidad de radicales libres formados (especialmente asociada al contenido acuoso) y los fenómenos de difusión y transferencia tanto de los radicales como de los compuestos volátiles surgidos. En esta línea, en diversos estudios (Taub, 1984; Stachowicz, 1998) se ha indicado que la estabilidad de los radicales libres formados durante la irradiación y, por tanto, el equilibrio oxidativo y el efecto en las propiedades sensoriales dependen, entre otros factores, de las características de la matriz. Por ejemplo, aplicando la técnica de

resonancia de espín electrónico (ESR, *Electron Spin Resonance*), se han detectado en algunos quesos irradiados radicales libres procedentes de la oxidación de las caseínas, con una intensidad de señal dependiente de la dosis aplicada, del tiempo de almacenamiento y del tipo de queso (Escudero y col., 2019). Estos autores observaron señales más intensas en el queso Cheddar, (con un menor contenido de humedad, en torno a 35,6%), que en los quesos Camembert y Brie (45,1 y 47,1%, respectivamente). Asumiendo que la intensidad de señal se relaciona con la concentración de los radicales (Lee y col., 2001a), la mayor presencia del radical procedente de la oxidación de las caseínas en el queso Cheddar implicaría que los fenómenos de disipación sean más lentos y, por ende, las sustancias sápidas y aromáticas se detectarán durante más tiempo; quizás la textura más compacta del queso Cheddar atrapa más enérgicamente a los volátiles responsables de los olores anómalos. No obstante, esta hipótesis debería ser confirmada en estudios futuros.

En los quesos Camembert y Brie, los olores y sabores detectados al comienzo del almacenamiento se disipan en los 20 días siguientes a la irradiación, de forma que no hay diferencias significativas entre los no tratados y los irradiados a dosis de hasta 2 kGy. En ambas variedades, los fenómenos proteolíticos y lipolíticos son muy intensos, incluso en refrigeración, dando lugar a multitud de compuestos de bajo peso molecular con elevado potencial aromático y sávido que podrían enmascarar los matices cuestionables debidos a la aplicación de las radiaciones ionizantes.

5.6. CONSIDERACIONES FINALES

A lo largo de la presente *Discusión integradora* se han considerado distintas líneas de investigación destinadas a optimizar el tratamiento con electrones acelerados en queso. Por un lado, en los apartados 5.2 y 5.3 se han definido los objetivos de control microbiológico del hinchamiento tardío y de *L. monocytogenes*, estimándose las correspondientes dosis mínimas para su consecución. Dichas estimaciones se han llevado a cabo asumiendo el escenario inicial más desfavorable. Por ello, la observación rigurosa de las medidas higiénicas en la granja y en las instalaciones de

la quesería (fundamentales para minimizar la contaminación inicial por los microorganismos diana) permitiría reducir las dosis de tratamiento mínimas para su control. Por otro lado, tras estudiar las repercusiones en las propiedades sensoriales de los quesos que tiene la irradiación (apartado 5.5), se han obtenido las dosis máximas que pueden aplicarse sin comprometer su calidad y provocar el rechazo del consumidor. De acuerdo con el *Manual de Buenas Prácticas de Irradiación* de la OIEA (2017), ambos objetivos son necesarios para definir un proceso de irradiación, pues permiten establecer la «ventana de tratamiento», es decir, el intervalo de dosis en el que la aplicación de la irradiación es viable en un alimento (figura 5.1).

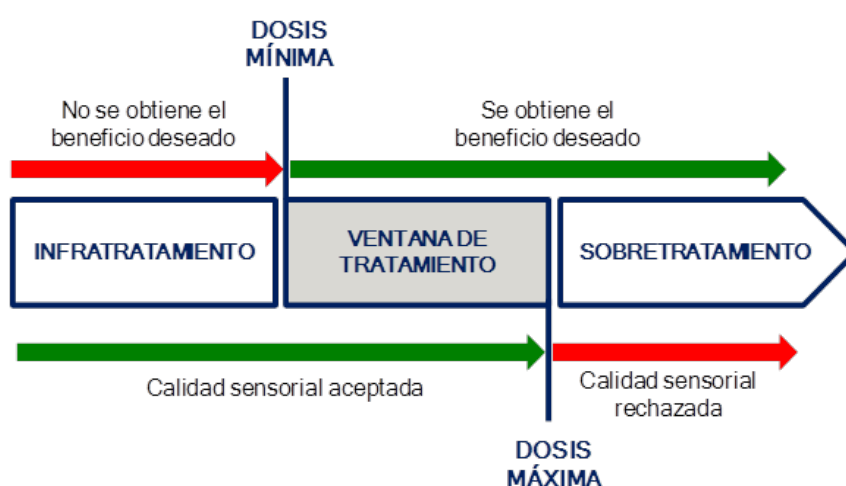


Figura 5.1. Definición del concepto de ventana de tratamiento de irradiación. Adaptado de OIEA (2017)

Como colofón de este capítulo, en la tabla 5.5 se ofrecen las ventanas de tratamiento para alcanzar los objetivos abordados en esta tesis en los correspondientes quesos. Se puede observar que la viabilidad del tratamiento, en algunos casos, requiere la combinación con medidas encaminadas a reducir la dosis mínima. Por ejemplo, según los resultados obtenidos, para cumplir con el criterio de tolerancia cero en la higienización de los quesos Camembert y Brie, se requieren dosis superiores (2,60 kGy) a la máxima que garantiza la aceptación del producto (2 kGy). Así, podrían incorporarse bioconservantes de diversa naturaleza, como fagos, nisina o cultivos bacteriocinógenos, aunque sería imprescindible llevar a cabo

estudios sobre su compatibilidad con la irradiación. En este sentido, recientemente se ha comprobado el efecto sinérgico de la curcumina y la aplicación de rayos X en la eliminación de *L. monocytogenes* en lonchas de queso, sin que afectase a las características sensoriales (Park y Ha, 2020).

Podría considerarse que los objetivos planteados en esta tesis se han alcanzado, pues se ofrecen tratamientos con electrones acelerados que permiten, en las condiciones indicadas, el control del hinchamiento tardío y de la presencia de *L. monocytogenes* en los quesos utilizados. A continuación, en la tabla 5.5 se resumen los objetivos conseguidos.

Tabla 5.5. Tratamientos de irradiación recomendados para la consecución de objetivos sanitarios o tecnológicos con mínimos efectos sensoriales.

QUESO	DOSIS MÍNIMA para alcanzar el objetivo microbiológico		DOSIS MÁXIMA que permite mantener la aceptación sensorial			
			Apariencia/color	Olor	Sabor	Textura
Quesos semiduro de pasta prensada	Control del hinchamiento tardío (LBD)		3 kGy	3 kGy	3 kGy	3 kGy
	Reducción 96% del número de esporas	3 kGy	Tratamiento VIABLE : 3 kGy ⁽¹⁾			
Quesos de pasta blanda madurados por moho superficial (Camembert y Brie)	FSO respecto a <i>L. monocytogenes</i>		3 kGy	3 kGy	2 kGy	3 kGy
	100 ufc/g (UE)	1,28 kGy	Tratamiento VIABLE : 1,28-2 kGy Condiciones postratamiento: ≥ 20 días a 4 °C			
	Ausencia en 25 g (EE. UU.)	2,60 kGy	Tratamiento (≤ 2 kGy) combinado con otras estrategias de control Condiciones postratamiento: ≥ 20 días a 4 °C			
Queso tipo Cheddar	FSO respecto a <i>L. monocytogenes</i> ⁽²⁾		3 kGy	2 kGy	2 kGy	3 kGy
	100 ufc/g (UE)	-	Tratamiento INNECESARIO			
	Ausencia en 25 g (EE. UU.)	1,72 kGy	Tratamiento VIABLE : 1,72-2 kGy Condiciones postratamiento: ≥ 28 días a 4 °C			

¹ El queso tratado con 3 kGy es aceptable sensorialmente aunque hay una ligera pérdida de su calidad sensorial.

² Ver cálculos del CP en el texto del apartado 5.3.

6.

CONCLUSIONES

La ciencia y la vida cotidiana no pueden y no deben ser separadas.

Rosalind Franklin (1920-1958)

En relación con la prevención del hinchamiento tardío en quesos

1. La aplicación de radiaciones ionizantes a dosis de 3 kGy destruye el 96% de las esporas de *Clostridium tyrobutyricum* presentes en quesos duros/semiduros. Este tratamiento, por tanto, puede utilizarse en la industria para evitar, o al menos demorar, la presentación del hinchamiento tardío de los quesos.
2. El tratamiento con dosis de 3 kGy origina la aparición de matices sápidos y aromáticos perceptibles, aunque dentro del límite de aceptación del consumidor.

En relación con la eliminación de *Listeria monocytogenes* en quesos

3. La aplicación de radiaciones ionizantes en quesos blandos (Camembert y Brie) permite alcanzar los objetivos de seguridad alimentaria (FSO) para *L. monocytogenes*, en la Unión Europea (100 ufc/g) con dosis de 1,28 kGy y en países con el criterio de «ausencia en 25 g» (entre ellos EE. UU.) con dosis de 2,60 kGy.
4. La aceptación sensorial se garantiza con tratamientos de hasta 2 kGy y tras 20 días de almacenamiento a temperaturas entre 4 y 14 °C, lo que es factible para países con el criterio microbiológico de la UE. Sin embargo, se requiere la combinación del tratamiento de irradiación con otras estrategias de control para cumplir con el criterio de «ausencia en 25 g».

Efectos derivados del tratamiento de quesos con radiaciones ionizantes

5. El tratamiento con radiaciones ionizantes no modifica significativamente las características fisicoquímicas (pH y actividad de agua) de los quesos.
6. La aplicación de radiaciones ionizantes reduce la microbiota láctica de forma proporcional a la intensidad del tratamiento. La recuperación de esta microbiota depende del tipo de queso y de la temperatura de almacenamiento aunque, en general, se requieren tiempos superiores a dos semanas a 14 °C y más de un mes a 4°C para alcanzar los niveles iniciales.

7. La aplicación de radiaciones ionizantes modifica las características sensoriales de los quesos de forma proporcional a la dosis aplicada. Este efecto condiciona, en algunos casos, la optimización del tratamiento con distintos objetivos.

8. La textura y el color de los quesos se ven afectados por el tratamiento con radiaciones ionizantes dependiendo del tipo de queso, dosis aplicada y condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura). Es posible predecir el nivel de cambios en estos atributos sensoriales mediante modelos de regresión múltiple.

Conclusión general

El tratamiento con electrones acelerados puede utilizarse en la industria quesera como una alternativa eficaz para el control del hinchamiento tardío de quesos semiduros/duros y de la presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos blandos, si bien los cambios sensoriales, aunque ligeros, pueden condicionar su uso para alcanzar el criterio microbiológico más exigente (ausencia en 25 g). No obstante, las alteraciones sensoriales se disipan en gran medida durante el almacenamiento de los quesos, por lo que la prolongación de los tiempos de comercialización es una estrategia válida para recuperar su calidad sensorial.

7.

BIBLIOGRAFÍA

- Abd El Baky, A.A., Farahat, S.M., Rabie, A.M., y Mobasher, S.A. (1986). The manufacture of Ras cheese from gamma irradiated milk. **Food Chemistry**, **20**:201-212.
- AECOSAN (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2015) Informe del Comité Científico de la AECOSAN sobre los riesgos microbiológicos asociados al consumo de leche cruda y productos lácteos elaborados a base de leche cruda. **Revista del Comité Científico**, **21**:45-78.
- AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación) (2010). Análisis sensorial. Vocabulario. UNE-EN-ISO 5492:2008. Asociación Española de Normalización y Certificación, Madrid, España.
- AESA (Agencia Española de Seguridad Alimentaria) (2005). Opinión del Comité científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Presidencia de la AESA, en relación con la aplicación de radiaciones ionizantes a los alimentos. **Revista del Comité Científico**, **2**:11-44.
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2010). Informe del Comité Científico de la AESAN sobre el riesgo asociado a la presencia de ácidos grasos *trans* en alimentos. **Revista del Comité Científico**, **12**:95-114.
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2020). Coadyuvantes tecnológicos. Disponible en: http://www.aecosan.mssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/coadyuvantes_tecnologicos.htm. Último acceso: 27.09.2020.
- Aguirre, J.S., Ordóñez, J.A. y García de Fernando, G.D. (2012). A comparison of the effects of E-beam irradiation and heat treatment on the variability of *Bacillus cereus* inactivation and lag phase duration of surviving cells. **International Journal of Food Microbiology**, **153**:444-452.

- Albertini A. y Menguzzato G. (1999). I difetti dei formaggi Grana: la gestione del prodotto non conforme. **Igiene Alimenti-Disinfestazione e Igiene Ambientale**, **16**:15-24.
- Amato, E., Filipello, V., Gori, M., Lomonaco, S., Losio, M.N., Parisi, A., Huedo, P., Knabel, S.J. y Pontello, M. (2017). Identification of a major *Listeria monocytogenes* outbreak clone linked to soft cheese in Northern Italy – 2009-2011. **BMC Infectious Disease**, **17**:342.
- Anastasiou, R., Aktypis, A., Georgalaki, M., Papadelli, M., De Vuyst, L., y Tsakalidou, E. (2009). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 under conditions mimicking Kasseri cheese production and ripening. **International of Dairy Journal**, **19**:330–335.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1995). Official methods of analysis (16^a ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington, EE.UU.
- Archer, D.L. (2018). The evolution of FDA's policy on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in the United States. **Current Opinion in Food Science**, **20**:64–68.
- Arias, C., Oliete, B., Seseña, S., Jimenez, L., Pérez-Guzmán, M.D. y Arias, R. (2013). Importance of on-farm management practices on lactate-fermenting *Clostridium* spp. spore contamination of Manchega ewe milk: Determination of risk factors and characterization of *Clostridium* population. **Small Ruminant Research**, **111**:120-128.
- Aro, A., Antoine, J.M., Pizzoferrato, L., Reykdal, O. y van Poppel, G. (1998). *Trans* fatty acids in dairy and meat products from 14 European countries: The TRANSFAIR study. **Journal of Food Composition and Analysis**, **11**:150-160.

- Arqués, J.L., Rodríguez, E., Langa, S., Landete, J.M. y Medina, M. (2015). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. **BioMed Research International**, 2015:584183.
- Arvanitoyannis, I.S. y Tserkezou, P. (2010). Application of irradiation on milk and dairy products. En: Arvanitoyannis, I.S. (Ed.), *Irradiation of Food Commodities: Techniques, Applications, Detection, Legislation, Safety and Consumer Opinion*, págs. 265-285. Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Ávila, M., Gómez-Torres, N., Delgado, D., Gaya, P. y Garde, S. (2016). Application of high pressure processing for controlling *Clostridium tyrobutyricum* and late blowing defect on semi-hard cheese. **Food Microbiology**, 60:165-173.
- Ávila, M., Gómez-Torres, N., Delgado, D., Gaya, P. y Garde, S. (2017). Industrial-scale application of *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol as a biopreservation system for inhibiting *Clostridium tyrobutyricum* in semi-hard ewe milk cheese. **International Food Microbiology**, 66:104-109.
- Ball, C.O. (1943). Short-time pasteurization of milk. **Industrial and Engineering Chemistry**, 35:71-84.
- Badr, H.M. (2011). Inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium tuberculosis* in fresh soft cheese by gamma radiation. **Radiation Physics and Chemistry**, 80:1250-1257.
- Banks, J.M. y Williams, A.G. (2004). Cheddar cheese. En: Hui, Y.H., Meunier-Goddik, L., Jytte, J., Nip, W.K., Stanfield, P.S. y Toldrá, F. (Eds.), *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*, págs. 300-322. Marcel Dekker, Nueva York, EE. UU.
- Baranyi, J. y Roberts, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, 23:277-294.

- Barbosa, W.B., Cabedo, L., Wederquist, H.J., Sofos, J.N. y Schmidt, G.R. (1994). Growth variation among species and strains of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, **57**:765-769.
- Bassi, D., Cappa, F. y Cocconcelli, P.S. (2009). A combination of a SEM technique and X-ray microanalysis for studying the spore germination process of *Clostridium tyrobutyricum*. **Research in Microbiology**, **160**:322-329.
- Bassi, D., Puglisi, E. y Cocconcelli, P.F. (2015). Understanding the bacterial communities of hard cheese with blowing defect. **Food Microbiology**, **52**:106-118.
- Bemrah, N., Sanaa, M., Cassin, M.H., Griffiths, M.W. y Cerf, O. (1998) Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. **Preventive Veterinary Medicine**, **37**:129-145.
- Benedito, J., Cambero, M.I., Ortuño, C., Cabeza, M.C., Ordóñez, J.A. y de la Hoz, L. (2011). Modeling and optimization of sensory changes and shelf-life in vacuum-packaged cooked ham treated by E-beam irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, **80**:505-513.
- Bergère, J.L. y Favreau, B. (1987). Immuno-détection des spores de *Clostridium tyrobutyricum*, agent du gonflement butyrique des fromages. **Sciences des Aliments**, **7**:89-98.
- Blank, G. y Corrigan, D. (1995). Comparison of resistance of fungal spores to gamma and electron beam radiation. **International Journal of Food Microbiology**, **26**:269-277.
- Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, **37**:911-917.
- Bogovič Matijašić, B., Koman Rajšp, M., Perko, B. y Rogelj, I. (2007). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. **International Dairy Journal**, **17**:157-166.

- Boisseau, P. (1994). Irradiation and the food industry in France. **Food Technology**, **48**:138-140.
- Bongirwar, D.R. y Kumta, U.S. (1967). Preservation of cheese with combined use of gamma-rays and sorbic acid. **International Journal of Applied Radiation and Isotopes**, **18**:133-134.
- Borreani, G. y Tabacco, E. (2008). Low permeability to oxygen of a new barrier film prevents butyric acid bacteria spore formation in farm corn silage. **Journal of Dairy Science**, **91**:4272-4281.
- Bougle, D.L. y Stahl, V. (1994). Survival of *Listeria monocytogenes* after irradiation treatment of Camembert cheeses made from raw milk. **Journal of Food Protection**, **57**:811-813.
- Bourdichon, F., Lindsay, D., Dubois, A. y Jordan, K. (2019). Ecology of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. Significance in dairy production. **Bulletin of IDF N° 502/2019**.
- Bourne, M.C. (1978). Texture profile analysis. **Food Technology**, **32**:62-72.
- Bourne, M.C. (1979). Theory and application of the puncture test in food texture measurement. En: Sherman, P. (Ed.), *Food Texture and Rheology*, págs. 95-142. Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Bower, J.A. (2009). *Statistical Methods for Food Science: Introductory Procedures for the Food Practitioner* (1ª ed.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Brändle, J., Domig, K.J. y Kneifel, W. (2016). Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. **Food Control**, **67**:96-113.
- Brooks, J.C., Martinez, B., Stratton, J., Bianchini, A., Krokstromb, R. y Hutkins, R. (2012). Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. **Food Microbiology**, **31**:154-158.
- Brown, K.L. (2000). Control of bacterial spores. **British Medical Bulletin**, **56**:158-171.

- Buchanan, R.L., Gorris, L.G.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C. y Whiting, R.C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, **75**:1-13.
- Buttery, R.C., Guadagni, D.G. y Ling, L.C. (1973). Flavor compounds: volatilities in vegetable oil and oil water mixture. Estimation of odor thresholds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **21**:198-201.
- Bylund, G. (2003). Dairy Processing Handbook. Tetra Pak Processing Systems AB, Lund, Suecia.
- Byun, M.W., Lee, J.W., Yook, H.S., Jo, C.R. y Kim, H.Y. (2002). Application of gamma irradiation for inhibition of food allergy. **Radiation Physics and Chemistry**, **63**:369-370.
- Cabeza, M.C., Cambero, M.I., de la Hoz, L. y Ordóñez, J.A. (2007). Optimization of E-beam irradiation treatment to eliminate *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat (RTE) cooked ham. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, **8**:299-305.
- Cabeza, M.C., Cambero, M.I., Nuñez, M., Medina, M., de la Hoz, L. y Ordóñez, J.A. (2010). Lack of growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in temperature abuse of E-beam treated ready-to-eat (RTE) cooked ham. **Food Microbiology**, **27**:777-782.
- Cabeza, M.C., de la Hoz, L., Cambero, M.I., Velasco, R., García-Márquez, I., Manzano, S. y Ordóñez, J.A. (2011). Higienización y vida útil de alimentos listos para su consumo (RTE) tratados con electrones acelerados. En: Ordóñez, J.A., Córdoba, J.J. y Ventanas, J. (Eds.), *Productos Cárnicos para el Siglo XXI: Seguros, Nutritivos y Saludables*, págs. 167-177. Universidad de Extremadura-Servicio de Publicaciones, Cáceres, España.

- Cabeza, M.C., de la Hoz, L., Velasco, R., Cambero, M.I. y Ordóñez, J.A. (2009). Safety and quality of ready-to-eat dry fermented sausages subjected to E-beam radiation. **Meat Science**, **83**:320-327.
- Cabezas, L., Sánchez, I., Poveda, J.M., Seseña, S. y Palop, M.LL. (2007). Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal Manchego cheeses from two dairies. **Food Control**, **18**:11-17.
- Cabo Verde, S. (2018). Food irradiation as sanitary treatment. En: Ferreira, I.C.F.R., Antonio, A.L. y Cabo Verde, S. (Eds.), *Food Irradiation Technologies: Concepts, Applications and Outcomes*, págs. 183-209. Royal Society of Chemistry, Londres, Reino Unido.
- CAC (Comisión del *Codex Alimentarius*) (2007). Directrices sobre la Aplicación de Principios Generales de Higiene de los Alimentos para el Control de *Listeria monocytogenes* en los Alimentos (CAC/GL 61-2007). Comisión del *Codex Alimentarius*, Roma, Italia.
- Cambero, M.I., Cabeza, M.C., Escudero, R., Manzano, S., García-Márquez, I., Velasco, R. y Ordóñez, J.A. (2012). Sanitation of selected ready-to-eat intermediate-moisture foods of animal origin by E-beam irradiation. **Foodborne Pathogens and Disease**, **9**:594-599.
- Cambero, M.I., Cabeza, M.C., Ordóñez, J.A. y de la Hoz, L. (2011). Effect of E-beam treatment on the safety and shelf life of mayonnaise potato salad. **Foodborne Pathogens and Disease**, **8**:221-229.
- Can, F.O., Demirci, A., Puri, V.M. y Gourama, H. (2014). Decontamination of hard cheeses by pulsed UV light. **Journal of Food Protection**, **77**:1723-1731.
- Cárcel, J.A., Benedito, J., Cambero, M.I., Cabeza, M.C. y Ordóñez, J.A. (2015). Modeling and optimization of the E-beam treatment of chicken steaks and hamburgers, considering food safety, shelf-life, and sensory quality. **Food and Bioproducts Processing**, **96**:133-144.

- Carpentier, B. y Cerf, O. (2011). Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, **145**:1-8.
- Case, R.A., Bradley, R.L. y Williams, R.R. (1985). Chemical and physical methods. En: Richardson, G.H. (Ed.), *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (15ª ed.), págs. 327-404. American Public Health Association, Washington, EE.UU.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2020). *Listeria* outbreaks. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>. Último acceso: 27.09.2020
- CE (Comisión Europea) (1986). Irradiated Foods (Opinion expressed on 13 March 1986). Reports of the Scientific Committee of Foods (Eighteenth series). Disponible en: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_reports_18.pdf. Último acceso: 26.06.2020.
- CE (Comisión Europea) (1994). Revisions of previous opinions on food irradiation: use in relation to Camembert cheeses (Opinion expressed on 19 June 1992). Reports of the Scientific Committee of Foods (Thirty-second series). Disponible en: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_reports_32.pdf. Último acceso: 26.06.2020.
- CE (Comisión Europea) (1998). Opinion of the Scientific Committee on Food on the irradiation of eight foodstuffs (expressed on 17.09.1998) Disponible en: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out15_en.pdf. Último acceso: 26.06.2020.
- CE (Comisión Europea) (2001). Comunicación 2001/C 241/03 de la Comisión, relativa a los alimentos e ingredientes alimentarios autorizados para el tratamiento con radiación ionizante en la Comunidad. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas**, **C241**:6-11.

- CE (Comisión Europea) (2002). Comunicación 2002/C 43/05 de la Comisión: Lista de los alimentos o ingredientes alimentarios que los Estados miembros autorizan a tratar con radiación ionizante. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas, C43:18.**
- CE (Comisión Europea) (2003a). Revision of the opinion of the Scientific Committee on Food on the irradiation of food (expressed on 4 April 2003). Disponible en: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out193_en.pdf. Último acceso: 26.06.2020.
- CE (Comisión Europea) (2003b). Comunicación 2003/C 56/03 de la Comisión: Lista de los alimentos o ingredientes alimentarios que los Estados miembros autorizan a tratar con radiación ionizante. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas, C56:5.**
- CE (Comisión Europea) (2006). Comunicación 2006/C 112/05 de la Comisión: Lista de los alimentos o ingredientes alimentarios que los Estados miembros autorizan a tratar con radiación ionizante. **Diario Oficial de la Unión Europea, C112:6-7.**
- CE (Comisión Europea) (2009). Comunicación 2009/C 283/02 de la Comisión: Lista de los alimentos o ingredientes alimentarios que los Estados miembros autorizan a tratar con radiación ionizante. **Diario Oficial de la Unión Europea, C283:5.**
- CE (Comisión Europea) (2019a). EU Agricultural Outlook for Markets and Income, 2019-2030. Comisión Europea, Dirección General de Agricultura y Desarrollo Rural, Bruselas, Bélgica. Disponible en: https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/food-farming-fisheries/farming/documents/agricultural-outlook-2019-report_en.pdf. Último acceso: 10.10.2019.
- CE (Comisión Europea) (2019b). Informe de la Comisión al Parlamento Europeo y al Consejo Relativo a los Alimentos e Ingredientes Alimentarios Tratados con

- Radiaciones Ionizantes en los Años 2016-2017. Disponible en: <https://op.europa.eu/s/n8DB>. Último acceso: 26.06.2020.
- CE (Comisión Europea) (2020). Food Irradiation. Legislation. Disponible en: https://ec.europa.eu/food/safety/biosafety/irradiation/legislation_en. Último acceso: 19.04.2020
- Chen, H. y Hoover, D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2:82-100.
- Chincholle, R. (1991). Action of the ionization treatment on the soft cheese made from unpasteurized milk. **Comptes Rendues de l'Académie d'Agriculture de France**, 77:29-35.
- Christensen, Z.T., Ogden, L.V., Dunn, M.L., y Eggett, D.L. (2006). Multiple comparison procedures for analysis of ranked data. **Journal of Food Science**, 71:132-143.
- Cleland, M.R. (2013). Advances in gamma ray, electron beam, and X-ray technologies for food irradiation. En: Sommers, C.H. y Fan, X. (Eds.), *Food Irradiation Research and Technology* (2ª ed.), págs. 9-27. IFT Press - Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido.
- Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M. y Comi, G. (2004). The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. **International Journal of Food Microbiology**, 90:83-91.
- Codex Alimentarius* (2003). Norma General del *Codex* para los Alimentos Irradiados. CODEX STAN 106-1983, Rev. 1-2003.
- Codex Alimentarius* (2011). Leche y Productos Lácteos (2ª ed.). FAO – OMS, Roma, Italia. Disponible en www.fao.org/3/a-i2085s.pdf. Último acceso: 11.09.2018.

- Consorzio Tutela Grana Padano (2020). Pliego de condiciones de producción Grana Padano. Disponible en: <https://www.granapadano.it/es-ww/pliego-de-condiciones-grana-padano-dop.aspx>. Último acceso: 16.08.2020.
- Cosentino, H.M., Takinami, P.Y.I. y del Mastro, N.L. (2016). Comparison of the ionizing radiation effects on cochineal, annatto and turmeric natural dyes. **Radiation Physics and Chemistry**, **124**:208–211.
- Cotter, P.D. y Beresford, T.P. (2017). Microbiome changes during ripening. En: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P. y Everett, D. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1 (4ª ed.), págs. 389-409. Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Coulon, J.B., Varignier, M. y Darne, D. (1991). Contamination butyrique du lait de vache: étude dans les exploitations de Haute-Loire. **INRA Productions Animales**, **4**:369-372.
- D'Amico, D.J. y Donnelly, C.W. (2017). Growth and survival of microbial pathogens in cheese. En: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P. y Everett, D. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 2 (4ª ed.), págs. 573-594. Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido.
- D'Amico, D.J., Druart, M.J. y Donnelly, C.W. (2008). 60-day aging requirement does not ensure safety of surface-mold-ripened soft cheeses manufactured from raw or pasteurized milk when *Listeria monocytogenes* is introduced as a postprocessing contaminant. **Journal of Food Protection**, **71**:1563–1571.
- Da Silva Aquino, K.A. (2012). Sterilization by gamma irradiation. En: Adrovic, F. (Ed.), *Gamma Irradiation*, págs. 171-206. In Tech, Viena, Austria.
- Dalmasso, M. y Jordan, K. (2013). Absence of growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, **81**:46–53.
- Dalsgaard, T.K., Sørensen, J., Bakman, M., Vognsen, L., Nebel, C., Albrechtsen, R. y Nielsen, J.H. (2010). Light-induced protein and lipid oxidation in cheese:

- Dependence on fat content and packaging conditions. **Dairy Science and Technology**, **90**:565–577.
- Daly, D.F.M., McSweeney, P.L.H. y Sheehan, J.J. (2010). Split defect and secondary fermentation in Swiss-type cheeses - A review. **Dairy Science and Technology**, **90**:3-26.
- Daly, M.J. (2012). Death by protein damage in irradiated cells. **DNA Repair**, **11**:12-21.
- Dasgupta, A.P. y Hull, R.R. (1989). Late blowing of Swiss cheese: Incidence of *Clostridium tyrobutyricum* in manufacturing milk. **The Australian Journal of Dairy Technology**, **44**:82-87.
- De Buyser, M.L., Dufour, B., Maire, M. y Lafarge, V. (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**, **67**:1–17.
- De Moraes, J.O., Hilton, S.T. y Moraru, C.I. (2020). The effect of pulsed light and starch films with antimicrobials on *Listeria innocua* and the quality of sliced cheddar cheese during refrigerated storage. **Food Control**, **112**:107134.
- De Oliveira, C.A.F., Corassin, C.H., Lee, S.H.I., Gonçalves, B.L. y Barancelli, G.V. (2017). Pathogenic bacteria in cheese, their implications for human health and prevention strategies. En: Watson, R.R., Collier, R.J. y Preedy, V.R. (Eds.), *Nutrients in Dairy and Their Implications for Health and Disease*, págs. 61-75. Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Deiana, P., Fatichenti, F, Farris, G.A., Mocquot, G., Lodi, R., Todesco, R. y Cecchi, L. (1984). Metabolization of lactic and acetic acids in Pecorino Romano cheese made with a combined starter of lactic acid bacteria and yeast. **Le Lait**, **64**:380-394.
- Demarquilly, C. (1998). Ensilage et contamination du lait par les spores butyriques. **INRA Productions Animales**, **11**:359-364.

- Dickson, J.S. (2001). Radiation inactivation of microorganism. En: Molins, R.A. (Ed.), *Food Irradiation: Principles and Applications*, págs. 23-36. John Wiley & Sons, Nueva York, EE. UU.
- Diehl, J.F. (1982). Radiolytic effects in foods. En: Josephson, E.S. y Peterson, M.S. (Eds.), *Preservation of Food by Ionizing Radiation*, Vol. I, págs. 279-357. CRC Press, Boca Raton, EE. UU.
- Diehl, J.F. (2001). Achievements in food irradiation during the 20th Century. En: Loaharanu, P. y Thomas, P. (Eds.), *Irradiation for Food Safety and Quality*, págs. 1-8. Technomic Publishing Company, Lancaster, EE. UU.
- Directiva 1999/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de febrero de 1999, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L66:16-22.**
- Directiva 1999/3/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de febrero de 1999, relativa al establecimiento de una lista comunitaria de alimentos e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L66:24-25.**
- Drake, M.A. y Delahunty, C.M. (2017). Sensory character of cheese and its evaluation. En: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P. y Everett, D. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1 (4^a ed.), págs. 517-545. Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Düsterhöft, E.M y Van den Berg, G. (2007). How may late blowing be avoided in Gouda-type cheeses? En: McSweeney, P.L.H. (Ed.), *Cheese Problems Solved*, págs. 242-243. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2020). *Surveillance Atlas of Infectious Diseases*. Disponible en: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>. Último acceso: 15.02.2020.

- EFSA (European Food Safety Authority) (2011). Statement summarising the conclusions and recommendations from the opinions on the safety of irradiation of food adopted by the BIOHAZ and CEF Panels. **EFSA Journal**, **9**:2107.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2019). Scientific report on the European Union One Health 2018 zoonoses report. **EFSA Journal**, **17**:5926.
- EFSA-BIOHAZ (EFSA Panel on Biological Hazards) (2016). Evaluation of the safety and efficacy of Listex™ P100 for reduction of pathogens on different ready-to-eat (RTE) food products. **EFSA Journal**, **14**:4565.
- EFSA-BIOHAZ (EFSA Panel on Biological Hazards) (2018). Scientific opinion on the *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. **EFSA Journal**, **16**:5134.
- EFSA-NDA (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies) (2014). Scientific opinion on the evaluation of allergenic foods and food ingredients for labelling purposes. **EFSA Journal**, **12**:3894.
- Ehlermann, D.A.E. (2014). Safety of irradiated food. En: Motarjemi, Y., Moy, G. y Todd, E. (Eds.), *Encyclopedia of Food Safety*, Vol. 3, págs. 447–452. Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Ehlermann, D.A.E. (2016). Wholesomeness of irradiated food. **Radiation Physics and Chemistry**, **129**:24–29.
- Elias, P.S. (1980). The wholesomeness of irradiated food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **4**:172-183.
- Englund, R.K. (1995). Late Uruk period cattle and dairy products: evidence from proto-cuneiform sources. **Bulletin on Sumerian Agriculture**, **8**:33-50.
- Ennahar, S., Kuntz, F., Strasser, A., Bergaentzle, M., Hasselmann, C. y Stahl, V. (1994). Elimination of *Listeria monocytogenes* in soft and red smear cheeses by

irradiation with low-energy electrons. **International Journal of Food Science and Technology**, **29**:395-403.

Escudero, R., Segura, J., Velasco, R., Valhondo, M., Romero de Ávila, M.D., García-García, A.B. y Cambero, M.I. (2019). Electron spin resonance (ESR) spectroscopy study of cheese treated with accelerated electrons. **Food Chemistry**, **276**:315-321.

Escudero, R., Valhondo, M., Ordóñez, J.A., de la Hoz, L., Cabeza, M.C., Velasco, R. y Cambero, M.I. (2012). Electron spin resonance (ESR) spectroscopy study of dry-cured ham treated with electron-beam. **Food Chemistry**, **133**:1530-1537.

Estrada, O., Juan, T., Ariño, A., Hijazo, P. y Estopañán, G. (2011). Evolución de la actividad de agua y del pH en la maduración de queso artesano de oveja elaborado con un molde octolobulado. VI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Valencia, 8-10 Junio. Disponible en: https://citarea.cita-aragon.es/citarea/bitstream/10532/1661/1/2011_266.pdf.
Último acceso: 26.09.2020.

Etayo, I., Pérez Elortondo, F.J., Gil, P.F., Albisu, M., Virto, M., Conde, S., Rodríguez Barrón, L.J., Nájera, A.I., Gómez-Hidalgo, M.E., Delgado, C., Guerra, A. y de Renobales, M. (2006). Hygienic quality, lipolysis and sensory properties of Spanish Protected Designation of Origin ewe's milk cheeses manufactured with lamb rennet paste. **Le Lait**, **86**:415-434.

Fairchild, T.M. y Foegeding, P.M. (1993). A proposed nonpathogenic biological indicator for thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, **59**:1247-1250.

Fan, X. (2013). Radiation chemistry of food components. En: Sommers, C.H. y Fan, X. (Eds.), *Food Irradiation Research and Technology* (2ª ed.), págs. 75-97. IFT Press - Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido.

- FAO (Food and Agriculture Organization) (2020). Base de datos sobre alimentación y agricultura FAOSTAT. Food and Agriculture Organization, Roma, Italia. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QP>. Último acceso: 23.06.2020
- Farber, J.M. y Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*: a food-borne pathogen. **Microbiological Review**, **55**:476-511.
- Farber, J.M., Coates, F. y Daley, E. (1992). Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, **15**:103-105.
- Farber, J.M., D'Aoust, J.Y., Diotte, M., Sewell, A. y Daley, E. (1998). Survival of *Listeria* spp. on raw whole chickens cooked in microwave ovens. **Journal of Food Protection**, **61**:1465-1469.
- Farkas, J. (2006). Irradiation for better foods. **Trends in Food Science and Technology**, **17**:148-152.
- Fatichenti, F., Bergère, J.L., Deiana, P. y Farris, G.A. (1983). Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *Cl. butyricum*. **Journal of Dairy Research**, **50**:449-457.
- FDA (Food and Drug Administration) (2003). Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/124721/download>. Último acceso: 13.02.2020.
- FDA (Food and Drug Administration) (2012). Irradiation in the production, processing and handling of food. Final Rule. **Federal Register**, **77**:71312-71315.
- FDA (Food and Drug Administration) (2016). FY 2014 - 2016 Microbiological sampling assignment summary report: raw milk cheese aged 60 days. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/99340/download>. Último acceso: 28.02.2020.

- FDA (Food and Drug Administration) (2017). Control of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods: Guidance for Industry. Draft Guidance. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/102633/download>. Último acceso: 28.02.2020.
- FDA (Food and Drug Administration) (2020). Recalls, market withdrawals, & safety alerts. Disponible en: <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts>. Último acceso: 26.06.2020.
- Fernández, M., Hospital, X.F., Arias, K. y Hierro, E. (2016). Application of pulsed light to sliced cheese: effect on *Listeria* inactivation, sensory quality and volatile profile. **Food and Bioprocess Technology**, **9**:1335-1344.
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P. y Stasiewicz, M.J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. **Journal of Food Protection**, **77**:150-170.
- Fox, J.B., Thayer, D.W., Jenkins, R.K., Phillips, J.G., Ackerman, S.A., Beecher, G.R., Holden, J.M., Morrow, F.D. y Quirbach, D.M. (1989). Effect of gamma-irradiation on the B-vitamins of pork chops and chicken breasts. **International Journal of Radiation Biology**, **55**:689-703.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. y McSweeney, P.L.H. (2017). Fundamentals of Cheese Science (2ª ed.). Springer, Nueva York, EE. UU.
- Fröhlich-Wyder, M.T. y Bachmann, H.P. (2007). What causes irregular eye formation, slits or cracks in Emmental cheese?. En: McSweeney, P.L.H. (Ed.), Cheese Problems Solved, págs. 252-253. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido.
- Fryer, T.F. y Halligan, A.C. (1976). The detection of *Clostridium tyrobutyricum* in milk. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, **11**:132.

- Gálvez, A., Lucas-López, R., M., Abriouel, H., Valdivia, E. y Ben Omar, N. (2008). Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, **28**:125–152.
- Gamal-Eldin, H.M., Baraka, A.A.E., Seoudi, O.A., Mahmoud, H.A. y Mohamed, A.G. (2017). Inhibition of processed cheese-late gas using *Candida pelliculosa* yeast. **International Journal of Dairy Science**, **12**:197-203.
- García-Márquez, I., Cambero, M.I., Ordóñez, J.A. y Cabeza, M.C. (2012a). Shelf-life extension and sanitation of fresh pork loin by E-beam treatment. **Journal of Food Protection**, **75**:2179-2189.
- García-Márquez, I., Ordóñez, J.A., Cambero, M.I. y Cabeza, M.C. (2012b). Use of E-beam for shelf-life extension and sanitizing of marinated pork loin. **International Journal of Microbiology**, **2012**:962846.
- Garde Lopez-Brea, S., Gómez-Torres, N. y Ávila Arribas, M. (2017). Spore-forming bacteria in dairy products. En: Poltronieri, P. (Ed.), *Microbiology in Dairy Processing: Challenges and Opportunities*, págs. 11-36. IFT Press Series – John Wiley and Sons, Chichester, Reino Unido.
- Garde, S., Arias, R., Gaya, P. y Nuñez, M. (2011a). Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: identification and characterization of isolates. **International Dairy Journal**, **21**:272-278.
- Garde, S., Avila, M., Arias, R., Gaya, P. y Nuñez, M. (2011b). Outgrowth inhibition of *Clostridium beijerinckii* spores by a bacteriocin-producing lactic culture in ovine milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, **150**:59–65.
- Garde, S., Ávila, M., Gómez-Torres, N., Gaya, P. y Núñez, M. (2016). Método de prevención de la hinchazón tardía en queso mediante la aplicación de alta presión. España, Patente nº 2.537.155, 06-09-2016.
- Gay, M. y Amgar, A. (2005). Factors moderating *Listeria monocytogenes* growth in raw milk and in soft cheese made from raw milk. **Lait**, **85**:153–170.

- Ghoddusi, H.B., Sherburn, R.E. y Aboaba, O.O. (2013). Growth limiting pH, water activity, and temperature for neurotoxicogenic strains of *Clostridium butyricum*. **International Scholarly Research Notices Microbiology**, 2013:731430.
- Gobbetti, M. (2004). Extra-hard varieties. En: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. y Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 2 (3ª ed.), págs. 51-70. Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Gobbetti, M. y Di Cagno, R. (2007). What common problems are associated with Grana-type cheeses?. En: McSweeney, P.L.H. (Ed.), *Cheese Problems Solved*, págs. 252-253. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido.
- González, L. y Zárata, V. (2015). Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* TF711 against *Clostridium sporogenes* when used as adjunct culture in cheese manufacture. **Journal of Dairy Research**, 82:236-241.
- González-Zorn, B. y Suárez, M. (2009). *Listeria* y Listeriosis. **Profesión Veterinaria**, 71:58-67.
- Gonzalo, C. (2017). Milk hygiene in small ruminants: a review. **Spanish Journal of Agricultural Research**, 15:e05R02.
- Gouet, P. (1963). L'ensilage et les produits laitiers. **Fourrages**, 14:50-69.
- Gould, L.H., Mungai, E. y Behravesh, C.B. (2014). Outbreaks attributed to cheese: differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998–2011. **Foodborne Pathogens and Disease**, 11:545-551.
- Gouvea, F.S., Rosenthal, A. y Ferreira, E.H.R. (2017). Plant extract and essential oils added as antimicrobials to cheeses: a review. **Ciência Rural**, 47:e20160908.
- Grandison, A.S. (2006). Irradiation. En: Brennan, J.G. (Ed.), *Food Processing Handbook*, págs. 147-172. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, Alemania.

- Greco, E., El-Aguizy, O., Ali, M.F., Foti, S., Cunsolo, V., Saletti, R. y Ciliberto, E. (2018). Proteomic analyses on an ancient egyptian cheese and biomolecular evidence of brucellosis. **Analytical Chemistry**, **90**:9673–9676.
- Guinee, T.P. y Fox, P.F. (2017). Salt in Cheese: Physical, Chemical and Biological Aspects. En: McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cotter, P. y Everett, D. (Eds.), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology Vol. 1 (4ª ed.), págs. 317-375. Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Guinee, T.P. y O'Callaghan, D.J. (2010). Control and prediction of quality characteristics in the manufacture and ripening of cheese. En: Law, B.A. y Tamime, A.Y. (Eds.), Technology of Cheesemaking (2ª ed.), págs. 260-329. Wiley-Blackwell Publishing Limited, Oxford, Reino Unido.
- Ham, J.S., Jeong, S.G., Lee, S.G., Han, G.S., Jang, A., Yoo, Y.M., Chae, H.S., Kim, D.H., Kim, H.J., Lee, W.K. y Jo, C. (2009). Quality of irradiated plain yogurt during storage at different temperatures. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, **22**:289–295.
- Han, J.H., Patel, D., Kim, J.E. y Min, S.C. (2014). Retardation of *Listeria monocytogenes* growth in mozzarella cheese using antimicrobial sachets containing rosemary oil and thyme oil. **Journal of Food Science**, **79**:2272-2278.
- Hanson, S.W.F., y Olley, J. (1963). Application of the Bligh and Dyer method of lipid extraction to tissue homogenates. **Biochemical Journal**, **89**:101-102.
- Hashisaka, A.E., Einstein, M.A., Fiasco, B.A., Hungate, F.P. y Dong, F.M. (1990a). Sensory analysis of dairy products irradiated with Cobalt-60 at -78 °C. **Journal of Food Science**, **55**:404-408.
- Hashisaka, A.E., Matches, J.R., Batters, Y., Hungate, F.P. y Dong, F.M. (1990b). Effects of gamma radiation at -78 °C on microbial populations in dairy products. **Journal of Food Science**, **55**:1284-1289.

- Hashisaka, A.E., Weagant, S.D. y Dong, F.M. (1989). Survival of *Listeria monocytogenes* in Mozzarella cheese and ice cream exposed to gamma radiation. **Journal of Food Protection**, **52**:490-492.
- Herrero, A.M., Carmona, P., Ordóñez, J.A., de la Hoz, L. y Cambero, M.I. (2009). Raman spectroscopic study of electron-beam irradiated cold-smoked salmon. **Food Research International**, **42**:216-220.
- Holm, S. y Malmberg, R. (1986). Method and plant for producing milk with a low bacterial count. Patente internacional (PCT), WO86/01687, 27-03-1986.
- Hoz, L., Cambero, M.I., Cabeza, M.C., Herrero, A.M. y Ordóñez, J.A. (2008). Elimination of *Listeria monocytogenes* from vacuum-packed dry-cured ham by E-beam irradiation. **Journal of Food Protection**, **71**:2001-2006.
- Huchet, V., Thuault, D. y Bourgeois, C.M. (1995). Modélisation des effets du pH, de l'acide lactique, du glycérol et du NaCl sur la croissance des cellules végétatives de *Clostridium tyrobutyricum* en milieu de culture. **Lait**, **75**:585-593.
- Hunt, K., Drummond, N., Murphy, M., Butler, F., Buckley, J. y Jordan, K. (2012). A case of bovine raw milk contamination with *Listeria monocytogenes*. **Irish Veterinary Journal**, **65**:13.
- Huo, J.X, Bai, C.Y., Guo, L.H. y Zhao, Z. (2013). Effect of electron beam irradiation on the shelf life of mozzarella cheese. **International Journal of Dairy Technology**, **66**:352-358.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (1996). *Listeria monocytogenes*. En: Microorganismos de los Alimentos 5. Características de los patógenos microbianos, págs. 165-175. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (2002). *Listeria monocytogenes* in cooked sausages (Frankfurters). En: Microorganisms

- in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management, págs. 285-312. Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nueva York. EE. UU.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods). (2004). Microorganismos de los Alimentos 7. Análisis Microbiológico en la Gestión de la Seguridad Alimentaria. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (2006). Guía simplificada para el entendimiento y uso de objetivos de inocuidad de alimentos y objetivos de rendimiento. Disponible en: <http://www.icmsf.org/wp-content/uploads/2018/02/GuiaSimplificadosp.pdf>. Último acceso: 26.09.2020.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods) (2018). *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Deli-Meats. En: Microorganisms in Foods 7. Microbiological Testing in Food Safety Management (2ª ed.), págs. 357-384. Springer, Cham, Suiza.
- Ingham, S.C., Hassler, J.R., Tsai, Y.W. e Ingham, B.H. (1998). Differentiation of lactate-fermenting, gas-producing *Clostridium* spp. isolated from milk. **International Journal of Food Microbiology**, **43**:173-183.
- ISO (International Standards Organization) (1981a). Analyze sensorielle. Guide pour l'implantation d'un local destiné aux analyses sensorielles. ISO/DP 66.58. International Standards Organization, Ginebra, Suiza.
- ISO (International Standards Organization) (1981b). Méthodologie essai triangulaire. ISO TC 34/SC 12. International Standards Organization, Ginebra, Suiza.
- ISO (International Standards Organization) (2008). Colorimétrie. Partie 4: Espace chromatique $L^*a^*b^*$ CIE 1976. ISO 11664-4:2008. International Standards Organization, Ginebra, Suiza.
- Jackson, K.A., Gould, L.H., Hunter, J.C., Kucerova, Z. y Jackson, B. (2018). Listeriosis outbreaks associated with soft cheeses, United States, 1998–2014. **Emerging Infectious Diseases**, **24**:1116-1118.

- Jay, J.M., Loessner, M.J. y Golden, D.A. (2009). *Microbiología Moderna de los Alimentos* (5ª ed.). Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Jensen, A., Frederiksen, W. y Gerner-Smidt, P. (1994). Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989-1990. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, **26**:171-178.
- Jo, C., Kim, H.J., Kim, D.H., Lee, W.K., Ham, J.S. y Byun, M.W. (2007). Radiation sensitivity of selected pathogens in ice cream. **Food Control**, **18**:859-865.
- Joanes, D.N. (1985). On a rank sum test due to Kramer. **Journal of Food Science**, **50**:1442-1444.
- Jones, T.H. y Jelen, P. (1988). Low dose-irradiation of Camembert, Cottage cheese and Cottage whey. **Milchwissenschaft**, **43**:233-235.
- Jongen, Y. (2009). Industrial applications of accelerators: Traditional and new. *Accelerators for America's Future Symposium*, Washington. Disponible en: http://www.acceleratorsamerica.org/slides/PM/Y_Jongen_Industrial_Applications.pdf. Último acceso: 10.06.2020.
- Kaddouri, H., Mimoun, S., El-Mecherfi, K.E., Chekroun, A., Kheroua, O. y Saidi, D. (2008). Impact of alpha-radiation on antigenic properties of cow's milk beta-lactoglobulin. **Journal of Food Protection**, **71**:1270-1272.
- Kamat, A., Warke, R., Kamat, M. y Thomas, P. (2000). Low-dose irradiation as a measure to improve microbial quality of ice cream. **International Journal of Food Microbiology**, **62**:27-35.
- Kells, H.R. y Lear, S.A. (1960). Thermal death time curve of *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* in artificially infected milk. **Applied Microbiology**, **8**:234-236.
- Kent, R.G. (1920). The edict of Diocletian fixing maximum prices. **University of Pennsylvania Law Review and American Law Register**, **69**:35-47.

- Kim, H.J., Ham, J.S., Lee, J.W., Kim, K., Ha, S.D. y Jo, C. (2010). Effects of gamma and electron beam irradiation on the survival of pathogens inoculated into sliced and pizza cheeses. **Radiation Physics and Chemistry**, **79**:731-734.
- Kim, H.J., Song, B.S., Kim, J.H., Choi, J.I., Lee, J.W., Jo, C. y Byun, M.W. (2007). Application of gamma irradiation for the microbiological safety of sliced Cheddar cheese. **Journal of Radiation Industry**, **1**:15-19.
- Klantschitsch, T. (1999). Influence of microfiltration on the quality of semi-hard cheese from raw milk with particular emphasis on *Clostridium tyrobutyricum* spores. Tesis doctoral. Institute of Food Science. ETH Zurich-Swiss Federal Institute of Technology.
- Klijn, N., Nieuwenhof, F.F.J., Hoolwerf, J.D., Van Der Waals, C.B. y Weerkamp, A.H. (1995). Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, **61**:2919-2924.
- Konteles, S., Sinanoglou, V.J., Batrinou, A. y Sflomos, K. (2009). Effects of γ -irradiation on *Listeria monocytogenes* population, colour, texture and sensory properties of Feta cheese during cold storage. **Food Microbiology**, **26**:157-165.
- Kume, T. y Todoroki, S. (2013). Food irradiation in Asia, the European Union, and the United States: A status update. **Radioisotopes**, **62**:291-299.
- Labuza, T.P., Acott, K., Tatinl, S.R., Lee, R.Y., Flink, J. y McCall, W. (1976). Water activity determination: a collaborative study of different methods. **Journal of Food Science**, **41**:910-917.
- Lacivita, V., Mentana, A., Centonze, D., Chiaravalle, E., Zambrini, V.A., Conte, A. y del Nobile, M.A. (2019). Study of X-Ray irradiation applied to fresh dairy cheese. **LWT - Food Science and Technology**, **103**:186-191.
- Lado, B.H. y Yousef, A.E. (2007). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food procesors. En: Ryser, E.T. y Marth, E.H. (Eds.), *Listeria*,

Listeriosis and Food Safety (3^a ed.), págs. 157-213. CRC Press, Boca Raton, EE.UU.

Langley, P. (1988). The first irradiation of cheese is planned for 1990. **Revue Laitière Française**, **474**:91-98.

Law, B.A. y Tamime, A.Y. (2010). Technology of Cheesemaking (2^a ed.). Wiley-Blackwell Publishing Limited, Oxford, Reino Unido.

Le Bourhis, A.G., Doré, J., Carlier, J.P., Chamba, J.F., Popoff, M.R. y Tholozan, J.L. (2007). Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. **International Journal of Food Microbiology**, **113**:154-163.

Le Bourhis, A.G., Saunier, K., Doré, J., Carlier, J.P., Chamba, J.F., Popoff, M.R. y Tholozan, J.L. (2005). Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, **71**:29-38.

Leconte, N., Fauquant, J., Robert, B., Beaucher, E., Rousseau, F., Sinet, C., Camier, B., Madec, M.N., Tanguy-Sai, G. y Lopez, C. (2014). Procédé combinant l'homogénéisation et la microfiltration tangentielle pour réduire la teneur bactérienne de lait contenant de la matière grasse. MEMPRO V, 105. Lavoisier Technique et Documentation, Toulouse, Francia.

Lee, E.J. y Ahn, D.U. (2003). Production of volatiles from fatty acids and oils by irradiation. **Journal of Food Science**, **68**:70-75.

Lee, E.J., Volkov, V.I. y Lee, C.H. (2001a). Electron Spin Resonance Studies of free radicals in γ -irradiated soybean paste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **49**:3457-3462.

Lee, J.W., Kim, J.H., Yook, H.S., Kang, K.O., Lee, S.Y., Hwang, H.J. y Byun, M.W. (2001b). Effects of gamma radiation on the allergenic and antigenic properties of milk proteins. **Journal of Food Protection**, **64**:272-276.

- Leistner, L. (1992). Food preservation by combined methods. **Food Research International**, **25**:151-158.
- LII (Legal Information Institute) (2020). 21 CFR § 179.26 - Ionizing radiation for the treatment of food. Disponible en: <http://www.law.cornell.edu/cfr/text/21/179.26>. Último acceso: 27.09.2020.
- Little, C.L., Sagoo, S.K., Gillespie, I.A., Grant, K. y McLauchlin, J. (2009). Prevalance and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in selected retail ready-to-eat foods in the United Kingdom. **Journal of Food Protection**, **72**:1869–1877.
- Liu, S., Puri, V.M. y Demirci, A. (2009). Evaluation of *Listeria innocua* as a suitable indicator for replacing *Listeria monocytogenes* during ripening of Camembert cheese. **International Journal of Food Science and Technology**, **44**:29–35.
- Loessner, M.J. y Carlton, R.M. (2008). Virulent phages to control *Listeria monocytogenes* in foodstuffs and in processed plants. Patente americana número 7,438,901 B2.
- Loessner, M.J., Maier, S.K., Schiwiek, P. y Scherer, S. (1997). Long-chain polyphosphates inhibit growth of *Clostridium tyrobutyricum* in processed cheese spreads. **Journal of Food Protection**, **60**: 493-498.
- Lovett, J., Francis, D.W. y Hunt, J.M. (1987). *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence and pathogenicity. **Journal of Food Protection**, **50**:188-192.
- Lozada-Castro, J.J., Santos-Delgado, M.J. y Polo-Díez, L.M. (2016). Determination of free cholesterol oxide products in food samples by gas chromatography and accelerated solvent extraction: influence of electron-beam irradiation on cholesterol oxide formation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **96**:4215–4223.
- LPSN (2020) List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponible en: <https://lpsn.dsmz.de/genus>. Último acceso: 26.06.2020.

- Mackey, B. y Bratchell, N. (1989). The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, **9**:89-94.
- Mahmoud, B.S.M. (2009). Inactivation effect of X-ray treatments on *Cronobacter* species (*Enterobacter sakazakii*) in tryptic soy broth, skim milk, low-fat milk and whole-fat milk. **Letters in Applied Microbiology**, **49**:562-567.
- Martínez-Ríos, V. y Dalgaard, P. (2018). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: A systematic review and meta-analysis. **Food Control**, **84**:205-214.
- Martínez-Rodríguez, Y., Acosta-Muñiz, C., Olivas, G.I., Guerrero-Beltrán, J., Rodrigo-Aliaga, D. y Sepúlveda, D.R. (2012). High Hydrostatic Pressure processing of cheese. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, **11**:399-416.
- Mathot, A.G., Beliard, E. y Thuault, D. (2003). *Streptococcus thermophilus* 580 produces a bacteriocin potentially suitable for inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in hard cheese. **Journal of Dairy Science**, **86**:3068-3074.
- Mayer-Miebach, E., Stahl, M.R., Eschrig, U., Deniaud, L., Ehlermann, D.A.E. y Schuchmann, H.P. (2005). Inactivation of a non-pathogenic strain of *E. coli* by ionizing radiation. **Food Control**, **16**:701-705.
- McLauchlin, J. y Rees, C.E.D. (2015). *Listeria*. En: Whitman, W.B., Rainey, F., Kämpfer, P., Trujillo, M., Chun, J., De Vos, P., Hedlund, B. y Dedysh, S. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley and Sons, Hoboken, EE. UU.
- McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J. y Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, **92**:15-33.
- McSweeney, P.L.H. y Fox, P.F. (2004). Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. En: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. y Guinee, T.P. (Eds.),

- Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 1 (3^a ed.), págs. 361-371. Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Medina, M. y Núñez, M. (2011). Applications of protective cultures, bacteriocins and bacteriophages in foods and beverages. En: Lacroix, C. (Ed.), Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation, págs. 267-296. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Reino Unido.
- Medina, M., Cabeza, M.C., Bravo, D., Cambero, M.I., Montiel, R., Ordóñez, J.A., Núñez, M. y de la Hoz, L. (2009). A comparison between E-beam irradiation and high pressure treatment for cold-smoked salmon sanitation: microbiological aspects. **Food Microbiology**, **26**:224-227.
- Melero, O. y Pagán, R. (2007). Tecnología de ionización con electrones de alta energía: Aplicaciones en la industria agroalimentaria. En: Jornada sobre Irradiación de Alimentos y Otros Productos. Situación Actual y Perspectivas: "Pros y Cons", págs. 75-92. Fundación Genes y Gentes, Zaragoza, España.
- Melo, J., Andrew, P.W. y Faleiro, M.L. (2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. **Food Research International**, **67**:75-90.
- Merritt, C. Jr., Forss, D.A., Angelini, P. y Bazinet, M.L. (1967). Volatile compounds produced by irradiation of butterfat. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, **44**:144-146.
- Meyer-Broseta, S., Diot, A., Bastian, S., Rivière, J. y Cerf, O. (2003). Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, **80**:1-15.
- Mistry, V.V. y Maubois, J.L. (2004). Application of membrane separation technology to cheese production. En: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. y Guinee, T.P.

- T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1 (3ª ed.), págs. 261-285. Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Mittendorfer, J. (2016). Food irradiation facilities: Requirements and technical aspects. ***Radiation Physics and Chemistry***, **129**:61-63.
- Montiel, R., Cabeza, M.C., Bravo, D., Gaya, P., Cambero, M.I., Ordóñez, J.A., Núñez, M. y Medina, M. (2013). A comparison between e-beam irradiation and high-pressure treatment for cold-smoked salmon sanitation: shelf-life, colour, texture and sensory characteristics. ***Food and Bioprocess Technology***, **6**:3177-3185.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A. y Swann, M.B.R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). ***Journal of Pathology and Bacteriology***, **29**:407-439.
- Nawar, W.W. (1985). Lipids. En: Fennema, O.R. (Ed.), *Food Chemistry* (2ª ed.), págs. 139-244. Marcel Dekker, Nueva York, EE. UU.
- O'Reilly, C.E., Kelly, A.L., Murphy, P.M. y Beresford, T.P. (2001). High pressure treatment: applications in cheese manufacture and ripening. ***Trends in Food Science & Technology***, **12**:51-59.
- Odueke, O. B., Farag, K. W., Baines, R. N., & Chadd, S. A. (2016). Irradiation applications in dairy products: A review. ***Food and Bioprocess Technology***, **9**:751-767.
- OIEA (Organismo Internacional de Energía Atómica) (2017). Manual de Buenas Prácticas para la Irradiación de Alimentos. Aplicaciones Sanitarias, Fitosanitarias y de otro Tipo. Colección de Informes Técnicos Nº 481. Organismo Internacional de Energía Atómica, Viena, Austria.
- Oliveira, R.B.A., Margalho, L.P., Nascimento, J.S., Costa, L.E.O., Portela, J.B., Cruz, A.G. y Sant'Ana, A.S. (2016). Processed cheese contamination by spore-forming

bacteria: A review of sources, routes, fate during processing and control. **Trends in Food Science & Technology**, 57:11-19.

OMC (Organización Mundial del Comercio) (1995). Acuerdo sobre la aplicación de medidas sanitarias y fitosanitarias. Disponible en: https://www.wto.org/spanish/tratop_s/sps_s/spsagr_s.htm. Último acceso: 16.08.2020.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (1981). La comestibilidad de los alimentos irradiados. Informe del Comité Mixto FAO/OIEA/OMS de Expertos. Serie de Informes Técnicos 659. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (1995). Inocuidad e idoneidad nutricional de los alimentos irradiados. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.

OMS (Organización Mundial de la Salud) (1999). Irradiación en dosis altas: salubridad de los alimentos irradiados con dosis mayores de 10 kGy. Informe del Grupo Mixto FAO/OIEA/OMS de Estudio sobre la Irradiación a Dosis Altas. Serie de Informes Técnicos 890. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.

Ordóñez, J.A. (1974). Microbiología y bioquímica del queso tipo «Ulloa» y preparación de un fermento para su elaboración a partir de leche pasteurizada. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria de León. Universidad de Oviedo.

Ordóñez, J.A. (2007). Higienización de alimentos listos para su consumo (RTE) mediante radiaciones ionizantes. En: Jornada sobre Irradiación de Alimentos y Otros Productos. Situación Actual y Perspectivas: "Pros y Cons", págs. 55-73. Fundación Genes y Gentes, Zaragoza, España.

Ordóñez, J.A., Cabeza, M.C., Hoz, L. y Cambero, M.I. (2007). Uso de radiaciones beta para conseguir el objetivo de seguridad alimentaria (FSO) en carne de pollo respecto a *Salmonella* spp. **Revista del Comité Científico de la AESAN**, 6:67-87.

Ordóñez, J.A., Cambero M.I., Fernández, L., García M.L., García de Fernando, G., de la Hoz, L. y Selgas, M.D. (1998). Quesos. En: Ordóñez, J.A. (Ed.), Tecnología de

los Alimentos, Vol. II. Alimentos de Origen Animal, págs. 113-138. Editorial Síntesis, Madrid, España.

Ordóñez, J.A., Cambero, M.I., Fernández, L., García, M.L., García de Fernando, G.D., Selgas, M.D., Fernández, M. y Hierro, E. (2019a). Fermentación en la industria alimentaria. En: Ordóñez, J.A. y García de Fernando, G.D. (Eds.), *Tecnologías Alimentarias*, Vol. 3 (Procesos de Transformación), págs. 180-204. Editorial Síntesis, Madrid, España.

Ordóñez, J.A., Cambero, M.I., Fernández, L., García, M.L., García de Fernando, G.D., Selgas, M.D., Fernández, M. y Hierro, E. (2019b). Irradiación de alimentos. En: Ordóñez, J.A. y García de Fernando, G.D. (Eds.), *Tecnologías Alimentarias*, Vol. 2 (Procesos de conservación), págs. 363-400. Editorial Síntesis, Madrid, España.

Orgaz, B., Puga, C.H., Martínez-Suárez, J.V. y SanJosé, C. (2013). Biofilm recovery from chitosan action: A possible clue to understand *Listeria monocytogenes* persistence in food plants. **Food Control**, **32**:484-489.

Osaili, T.M., Shaker, R.R., Abu Al-Hasan, A.S., Ayyash, M.M. y Martin, E.M. (2007). Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in infant milk formula by gamma irradiation: Determination of D₁₀-value. **Journal of Food Science**, **72**:85-88.

Painter, J. y Slutsker, L. (2007). Listeriosis in humans. En: Ryser, E.T. y Marth, E.H. (Eds.), *Listeria*, Listeriosis and Food Safety (3ª ed.), págs. 85-109. CRC Press, Boca Raton, EE. UU.

Park, J.S. y Ha, J.W. (2020). Synergistic antimicrobial effect of X-ray and curcumin against *Listeria monocytogenes* on sliced cheese. **Food Control**, **110**: 106986.

Pedredo, F.D.L. y Pangborn, R.M. (1989). Evaluación Sensorial de los Alimentos: Métodos Analíticos, págs. 231-232. Alhambra Mexicana, México D.F, México.

Picón, A. (2017). Cheese microbial ecology and safety. En: Papademas, P. y Bintsis, T. (Eds.), *Global Cheesemaking Technology*, págs. 71-99. John Wiley and Sons, Hoboken, EE. UU.

- Piot, M., Vachot, J.C., Veaux, M., Maubois, J.L. y Brinkman, G.E. (1987). Ecrémage et épuration bactérienne du lait entier cru par microfiltration sur membrane en flux tangencial. **Technique Laitière et Marketing**, **1016**:42-46.
- Pirie, J.H.H. (1940). The genus *Listerella* Pirie. **Science**, **91**:383-383.
- Pottier, J. (1989). A new type of RF electron accelerator: the Rhodotron. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, **B40/41**:943-945.
- Proulx, J. Sullivan, G., Marostegan, L.F., VanWees, S., Hsu, L.C. y Moraru, C.I. (2017). Pulsed light and antimicrobial combination treatments for surface decontamination of cheese: Favorable and antagonistic effects. **Journal of Dairy Science**, **100**:1664-1673.
- Radoshevich, L. y Cossart, P. (2018). *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, **16**:32-46.
- RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed Portal) (2020). Comisión Europea, Dirección General de Agricultura y Desarrollo Rural, Bruselas, Bélgica. Disponible en: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>. Último acceso: 30.01.2020
- Real Decreto 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos. **Boletín Oficial del Estado**, **239**:34717-34720.
- Reglamento (CE) 853/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. **Diario Oficial de la Unión Europea**, **L139**:12-29.
- Reglamento (CE) 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) número 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. **Diario Oficial de la Unión Europea**, **322**:12-29.

Reglamento (UE) 1129/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. **Diario Oficial de la Unión Europea, L295:1-177.**

Reglamento (UE) 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) 1924/2006 y (CE) 1925/2006, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE, la Directiva 90/496/CEE, la Directiva 1999/10/CE, la Directiva 2000/13/CE, las Directivas 2002/67/CE y 2008/5/CE y el Reglamento (CE) 608/2004. **Diario Oficial de la Unión Europea, L304:18-63.**

Rilla, N., Martínez, B., Delgado, T. y Rodríguez, A. (2003). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. **International Journal of Food Microbiology, 85:23–33.**

Roberts, P.B. (2014). Food irradiation is safe: Half a century of studies. **Radiation Physics and Chemistry, 105:78–82.**

Roberts, T.A. e Ingram, M. (1965). Radiation resistance of spores of *Clostridium* species in aqueous suspensions. **Journal of Food Science, 30:879-885.**

Robinson, R.K. y Wilbey, R.A. (2018). Fabricación de Queso. R. Scott. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza, España.

Rosenthal, I., Martinot, M., Linder, P. y Juven, B.J. (1983). A study of ionizing radiation of dairy products. **Milchwissenschaft, 38:467-470.**

Ross, T., Todd, E. y Smith, M. (2000). Exposure assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Preliminary Report for Joint FAO/WHO Expert Consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods, Roma, Italia.

Russell, A.D. (1982). The Destruction of Bacterial Spores. Academic Press, Londres, Reino Unido.

- Ryser, E.T. (2007). Incidence and behaviour of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. En: Ryser, E.T. y Marth, E.H. (Eds.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety* (3ª ed.), págs. 405-502. CRC Press, Boca Raton, EE.UU.
- Ryser, E.T., Arimi, S.M. y Donnelly, C.W. (1997). Effect of pH on distribution of *Listeria* ribotypes in corn, hay, and grass silage. **Applied and Environmental Microbiology**, **63**:3695-3697.
- Sanaa, M., Coroller, L. y Cerf, O. (2004). Risk assessment of listeriosis linked to the consumption of two soft cheeses made from raw milk: Camembert of Normandy and Brie of Meaux. **Risk Analysis**, **24**:389-399.
- Sanjuán, E., Millán, E., Saavedra, R., Carmona, M.A., Gómez, R. y Fernández-Salguero, J. (2002). Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening. **Food Chemistry**, **78**:281-289.
- Sauders, B.D. y Wiedmann, M. (2007). Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. En: Ryser, E.T. y Marth, E.H. (Eds.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety* (3ª ed.), págs. 21-53. CRC Press, Boca Raton, EE.UU.
- Schöbitz, R., Uribe, C., Molina, L.H. y Espina, F. (2005). Control del desarrollo de bacterias ácido butíricas en queso tipo Gouda empleando diferentes concentraciones de nitrato y temperaturas de maduración. **Agro Sur**, **33**:48-57.
- Scintu, M.F., Mannu, L. y Caria, A. (2004). Presence of spores of *Clostridium* spp. in ewes' raw milk. En: IDF symposium on: The future of the sheep and goat dairy sectors, Zaragoza, Spain (p. 187). Special issue of the International Dairy Federation 0501/Part 3.
- Seisa, D., Osthoff, G., Hugo, C., Hugo, A., Bothma, C. y Van der Merwe, J. (2004). The effect of low-dose gamma irradiation and temperature on the microbiological

and chemical changes during ripening of Cheddar cheese. **Radiation Physics and Chemistry**, **69**:419-431.

Shamsuzzaman, K. y Lucht, L. (1993). Resistance of *Clostridium sporogenes* spores to radiation and heat in various nonaqueous suspension media. **Journal of Food Protection**, **56**:10-12.

Sheehan, J.J. (2011). Avoidance of gas blowing. En: Fuquay, J.W., Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (Eds.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 1, págs. 661-666. Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido.

Silva, C.C.G., Silva, S.P.M. y Ribeiro, S.C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. **Frontiers in Microbiology**, **9**:594.

Silvetti, T., Morandi, S., Hintersteiner, M y Brasca, M. (2017). Use of hen egg white lysozyme in the food industry. En: Hester, P.Y. (Ed.), *Egg Innovations and Strategies for Improvements*, págs. 233-242. Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido.

Simonart, P. (1962). Method of pasteurizing. EE. UU., Patente nº 3.058.833, 16-10-1962.

Sommers, C.H. y Boyd, G. (2005). Elimination of *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat turkey and cheese tortilla wraps using ionizing radiation. **Journal of Food Protection**, **68**:164-167.

Sommers, C.H., Delincée, H., Smith, J.S. y Marchioni, E. (2013). Toxicological safety of irradiated foods. En: Fan, X y Sommers C.H. (Eds.), *Food Irradiation Research and Technology* (2ª ed.), págs. 53-73. IFT Press - Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido.

Song, B.S., Choi, S.J., Jin, Y.B., Park, J.H., Kim, J.K., Byun, E.B., Kim, J.H., Lee, J.W., Kim, G.S. y Marchioni, E. (2014). A critical review on toxicological safety of 2-alkylcyclobutanones. **Radiation Physics and Chemistry**, **103**:188-193.

- Spinnler, H.E. y Gripon, J.C. (2004). Surface mould-ripened cheeses. En: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M. y Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 2 (3ª ed.), págs. 208-259. Elsevier Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Stachowicz, W. (1998). Aspect of detection of irradiated foods by ESR spectroscopy. **Applied Magnetic Resonance**, **14**:337-344.
- Stewart, E.M. (2009). Food irradiation. En: Stadler, R.H. y Lineback, D.R. (Eds.), *Process-induced Food Toxicants: Occurrence, Formation, Mitigation, and Health Risks*, págs. 387-412. John Wiley & Sons, Nueva York, EE. UU.
- Stringer, M. (2005). Summary report: Food safety objective-role in microbiological safety management. **Food Control**, **16**:775-794.
- Su, Y.C., e Ingham, S.C. (2000) Influence of milk centrifugation, brining and ripening conditions in preventing gas formation by *Clostridium* spp. in Gouda cheese. **International Journal of Food Microbiology**, **54**:147-154.
- Szczesniak, A.S. (1986). Sensory texture evaluation methodology. **Reciprocal Meat Conference Proceedings**, **39**:86-96.
- Tahergorabi, R., Matak, K.E. y Jaczynski, J. (2012). Application of electron beam to inactivate *Salmonella* in food: Recent developments. **Food Research International**, **45**:685-694.
- Taub, I.A. (1984). Free radical reactions in food. **Journal of Chemical Education**, **61**:313-324.
- Tsiotsias, A., Savvaidis, I., Vassila, A., Kontominas, M. y Kotzekidou, P. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* by low-dose irradiation in combination with refrigeration in the soft whey cheese 'Anthotyros'. **Food Microbiology**, **19**:117-126.

- Urbain, W.M. (1986). Food Irradiation. Food Science and Technology Monographs. Academic Press Inc., Orlando, EE. UU.
- Van Beynum, J., y Pette, J.E. (1935). Zuckervergärung and laktatvergärende Buttersäurebakterien. **Zentralblatt für Bakteriologie**, **93**:197-212.
- Velasco, R., Ordóñez, J.A., Cabeza, M.C., de la Hoz, L. y Cambero, M.I. (2011). Use of the E-beam radiation to diminish the late blowing of cheese. **International Dairy Journal**, **21**:493-500.
- Vissers, M.M.M., Driehuis, F., Te Giffel, M.C., De Jong, P. y Lankveld, J.M.G. (2007) Minimizing the level of butyric acid bacteria spores in farm tank milk. **Journal of Dairy Science**, **90**:3278-3285.
- Wagenaar, R.O. y Dack, G.M. (1955). Effect in surface ripened cheese of irradiation on spores and toxin of *Clostridium botulinum* types A and B. **Journal of Food Science**, **21**:226-234.
- Walker, S.J., Archer, P. y Banks, J.G. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. **Journal of Applied Bacteriology**, **68**:157-162.
- Walstra, P., Noomen, A. y Geurts, T.J. (1999). Dutch-type varieties. En: Fox, P.F. (Ed.), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Vol. 2 (2ª ed.), págs. 79-82. Aspen Publishers, Gaithersburg, EE. UU.
- Ward, L.S., Schaik, E.V., Samuel, J. y Pillai, S.D. (2020). Reduction in microbial infection risks from raw milk by electron beam technology. **Radiation Physics and Chemistry**, **168**:108567.
- Wesley, I.V. (2007). Listeriosis in animals. En: Ryser, E.T. y Marth, E.H. (Eds.), *Listeria*, Listeriosis and Food Safety (3ª ed.), págs. 55-84. CRC Press, Boca Raton, EE.UU.

- Whiting, R.C. y Buchanan, R.L. (2014). Food Safety Objective. En: Batt, C.A. y Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*, vol. 1 (2ª ed.), págs. 959–963. Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Yüceer, S. y Gündüz, G. (1980). Preservation of cheese and plain yogurt by low-dose irradiation. **Journal of Food Protection**, **43**:114-118.
- Zalazar, C.A., Candiotti, M.C. y Meinardi, C.A. (2006). Defectos producidos durante la maduración. En: Reinherimer, J. y Zalazar, C. (Eds.), *Avances en Microbiología, Bioquímica y Tecnología de Quesos*, págs. 285-298. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Zanardi, E., Battaglia, A., Ghidini, S., Conter, M., Badiani, A. y Ianieri, A. (2009). Lipid oxidation of irradiated pork products. **LWT - Food Science and Technology**, **42**:1301–1307.
- Żegota, H. y Małolepszy, B. (2008). The decontamination of industrial casein and milk powder by irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, **77**:1108-1111.
- Zucali, M., Bava, L., Colombini, S., Brasca, M., Decimo, M., Morandi, S., Tamburinia, A. y Crovetto, G.M. (2014) Management practices and forage quality affecting the contamination of milk with anaerobic spore-forming bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, **95**:1294-1302.