

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**Aplicación de electrones acelerados a jamón curado
deshuesado: eliminación de Listeria monocytogenes y
detección de marcadores del tratamiento**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Juan Raúl Lucas López

Directoras

María Concepción Cabeza Briales
María Dolores Selgas Cortecero

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA GALÉNICA Y TECNOLOGÍA

ALIMENTARIA



TESIS DOCTORAL

**APLICACIÓN DE ELECTRONES ACELERADOS A
JAMÓN CURADO DESHUESADO: ELIMINACIÓN DE
Listeria monocytogenes Y DETECCIÓN DE MARCADORES
DEL TRATAMIENTO**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

JUAN RAÚL LUCAS LÓPEZ

Directoras

María Concepción Cabeza Briales

María Dolores Selgas Cortecero

Madrid, 2020



Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria

FACULTAD DE VETERINARIA

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid

Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 37 43

El trabajo experimental que ha dado lugar a esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, excepto el que se refiere a la microscopía electrónica, que se hizo en el CAI de Microscopía y Citometría de la Universidad Complutense de Madrid; a la identificación de compuestos volátiles, que se hizo en el Servicio de Análisis e Innovación en Productos de Origen Animal (SIPA) de la Universidad de Extremadura; al estudio de la expresión génica, que se realizó en el Instituto Universitario de Investigación de la Carne y Productos Cárnicos (IProCar) de la Universidad de Extremadura y al desarrollo del modelo matemático que se realizó en el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia. Ha sido financiado mediante los proyectos de investigación:

- Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), proyectos: RTA 2017-00027-C03-02 y RTA 2013-00070-C03-02
- El Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)
- El Grupo de Investigación “Tecnología de los Alimentos de Origen Animal” Nº 920276 Ref GR3/14. Universidad Complutense.
- Además, J. R. Lucas es beneficiario de una beca del CONCYTEC de Perú, contrato 215-2015-FONDECYT.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a

A María Dolores Selgas Cortecero y Gonzalo Doroteo García de Fernando Minguillón, Directores de la Sección Departamental de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, durante el periodo de realización de este trabajo de investigación, por acogerme en el Departamento, darme la oportunidad de ser parte de este equipo y por la gran calidad humana mostrada a través de estos años.

A mis directoras de tesis, María Concepción Cabeza Briales y María Dolores Selgas Cortecero, y a María Luisa García Sanz quien, hasta antes de su jubilación, me acompañó gran parte de este camino como una de mis directoras. Gracias por la confianza depositada en mí, la dedicación, sus consejos y experiencias, por su implicación en los momentos más difíciles, por brindarme las herramientas para seguir convirtiéndome en una mejor versión de mí mismo, en especial, como investigador y docente universitario. De todo corazón gracias.

A Raquel Velasco, quién en muchas oportunidades también me ha guiado; gracias por el gran apoyo, la generosidad y las palabras de ánimo. A Carlos Santos Arnaiz, de quién también he aprendido en el laboratorio, por su empatía, positivismo y por los momentos de risa, tan importantes en aquellos días más interminables de trabajo.

A Manuela Fernández, por todo el apoyo brindado con la documentación requerida por las entidades peruanas, durante el proceso de obtención de la financiación que finalmente me permitió iniciar el programa de doctorado.

Al Dr. Juan José Córdoba y Alberto Alía, de la Universidad de Extremadura, por acogerme durante mi estancia, la amabilidad mostrada y compartir conmigo momentos agradables.

A Antonio Silva del Servicio de Análisis e Innovación en Productos de Origen Animal (SIPA) de la Universidad de Extremadura, por el apoyo durante la identificación de los compuestos volátiles.

A José Benedito y Juan cárcel de la Universidad de Valencia por la colaboración en el desarrollo del modelo matemático de la penetración de los electrones.

Al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, al Fondo Europeo de Desarrollo Regional y al Grupo de Investigación “Tecnología de los Alimentos de Origen Animal”, cuya la financiación permitió la realización de este trabajo.

A la República del Perú, que a través del CONCYTEC canalizó la financiación que hizo posible mi estancia en España. A título personal este aporte fue decisivo y, quizás, el más importante. De todo corazón, muchas gracias.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por brindarme todas las facilidades y concederme la licencia para poder realizar este perfeccionamiento académico, además por haberme respaldado económicamente todo este tiempo. Muchas gracias UNMSM.

A nivel personal agradezco a todos los compañeros y amigos con quiénes he desarrollado a la par el trabajo de doctorado, en especial al grupo de doctorandos peruanos que realizan o han realizado su tesis en Madrid, a José, Mariela, Bernardo, Nathaly, Viviana y Jorge, gracias por el soporte y la empatía, creo que nadie mejor que ustedes para entender lo que hoy significa dejar el hogar y los seres amados por cumplir con un objetivo de esta naturaleza.

A los amigos que hice en el camino, con quienes compartí momentos inolvidables y que siempre guardaré en la memoria y el corazón. Y a los de toda la vida, con quienes los lazos de amistad no solo aún perduran, sino que además se han fortalecido con el tiempo.

A mi familia, que han sido mi soporte y mayor motivación, gracias sus palabras, bendiciones y buenos deseos. Por hacerme sentir a diario que estoy con ustedes e inmune a la adversidad, gracias por todo su amor.

Gracias a todos

DEDICATORIA

Cada logro en mi vida, como finalizar esta tesis de doctorado, ha sido resultado de una mezcla de valor, sacrificio y disciplina. A esta fórmula se suma el “espíritu” resiliente que he ido construyendo con el paso de los años. Cada una de estas cualidades, que me permiten sobrevivir sobre mis defectos, han sido posibles gracias a acontecimientos y seres maravillosos a quienes dedico esta tesis. Dedico esta tesis a los paisajes infinitos, al Dios de Spinoza, a la melodía de la vida, a las historias que tocan el alma. Dedico esta tesis a las personas que me formaron, a las personas valientes, a los que nos dan esperanza con sus actos de fe, a los inconformes ante la injusticia. Se lo dedico a quienes confían en mí, porque me abrigan con su esperanza, y a los que no, porque gracias a ellos conservo el coraje necesario para persistir. Se lo dedico a mis padres, quienes me acompañan desde el primero de mis días y cuyo legado me acompañará hasta el último de ellos. Se lo dedico a Susan, mi compañera, mi amor, quien tuvo la difícil tarea de criar a nuestro hijo por ambos durante este tiempo, quien ha sabido resguardarme sin importar el tiempo ni la distancia, y a Franra, que nació mientras este trabajo estaba en desarrollo, te lo dedico hijo porque que también forma parte de tu historia. Se lo dedico a mis familiares, en especial a mis hermanos, mi cuñado y mis sobrinos. Por último, me permito brindar mis condolencias a todo aquel que perdió a alguien en esta pandemia, extendiendo un abrazo a todo aquel que como yo enfermó de Covid 19 y luchó desde casa por superar esta infección ante el colapso de los sistemas de salud, y me solidarizo con todos aquellos que a raíz de todo el estado de emergencia sanitaria, hayan sido afectados de alguna forma.

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1.- Jamón curado	14
1.1.1.- Antecedentes históricos	14
1.1.2.- Definición de jamón curado y bases anatómicas	16
1.1.3.- Tipos de jamón curado.....	17
1.1.4.- Proceso de elaboración de los jamones curados	19
1.1.4.1.- Fase de recepción y clasificación de los perniles.....	21
1.1.4.2.- Preparación de los perniles	22
1.1.4.3.- Fase de salazón	23
1.1.4.4.- Fase de post-salado o reposo.....	25
1.1.4.5.- Fases de secado-maduración y bodega	25
1.1.5.- Cambios físico-químicos durante el procesado del jamón.....	28
1.1.6.- Cambios bioquímicos durante el procesado del jamón.....	29
1.1.7.- Microbiota del jamón curado	31
1.1.8.- Presentaciones comerciales del jamón curado	35
1.1.9.- Producción, consumo y exportación del jamón curado español	38
1.2.- Jamón curado reestructurado	38
1.2.1.- Sistemas de reestructuración.....	39
1.2.2.- Agentes de ligazón en frío	40
1.2.3.- Legislación y etiquetado de los productos cárnicos reestructurados	43
1.3.- <i>Listeria monocytogenes</i>	43
1.3.1.- Antecedentes históricos	43
1.3.2.- Características generales.....	45
1.3.3.- Crecimiento y supervivencia.....	46
1.3.4.- Factores de virulencia y resistencia al estrés de <i>Listeria monocytogenes</i>	47
1.3.5.- Listeriosis.....	50
1.3.5.1.- Incidencia y mortalidad.....	51
1.3.5.2.- Contaminación de los alimentos con <i>Listeria monocytogenes</i>	53
1.3.5.3.- Biofilms de <i>Listeria monocytogenes</i> en entornos agroalimentarios.....	54
1.3.5.4.- Alimentos principalmente implicados en brotes de listeriosis	54
1.4.- Tratamientos higienizantes del jamón curado.....	57
1.5.- Irradiación de alimentos.....	59
1.5.1.- Antecedentes históricos	59
1.5.2.- Fundamentos de la radiación ionizante	61
1.5.3.-Fuentes de irradiación permitidas para su uso en alimentos	62
1.5.4.- Efecto de las radiaciones ionizantes en los microorganismos	66

1.5.4.1.- Sensibilidad de microorganismos a las radiaciones ionizantes	66
1.5.5.- Efecto de las radiaciones ionizantes en los alimentos.....	67
1.5.6.- Objetivos tecnológicos de la irradiación de alimentos.....	69
1.5.7.- Ventajas e inconvenientes de la irradiación de alimentos.....	70
1.5.8.- Regulación de la irradiación de alimentos	71
1.5.9.- Identificación de alimentos irradiados	75
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	78
3. MATERIAL Y MÉTODOS	84
3.1- Material.....	85
3.1.1- Material general de laboratorio	85
3.1.2.- Material empleado para ensayos microbiológicos	86
3.1.3.- Material de la Planta Piloto.....	87
3.1.4.- Material biológico.....	88
3.1.5.- Material empleado en el tratamiento de irradiación.....	88
3.1.6.- Material empleado para la preparación de muestras y el análisis de compuestos volátiles del jamón curado deshuesado.....	88
3.1.7.- Material empleado para el estudio con jamones curados reestructurados	89
3.1.8.- Material empleado en la expresión de los genes de virulencia y de respuesta al estrés de <i>Listeria monocytogenes</i>	90
3.2.- Métodos	92
3.2.1.- Revitalización de las cepas de <i>Listeria</i>	92
3.2.2.- Recuentos microbiológicos.....	92
3.2.3.- Tratamiento con electrones acelerados	93
3.2.4.- Estudio de la cinética de destrucción de las cepas de <i>Listeria</i> ensayadas.....	94
3.2.5.- Estudio de la capacidad de penetración de los electrones acelerados en jamones curados deshuesados.....	95
3.2.6.- Evaluación del efecto listericida de los electrones acelerados en el jamón curado deshuesado	96
3.2.7.- Influencia del espesor del jamón curado deshuesado en el efecto higienizante de los electrones acelerados.....	96
3.2.8.- Modelización de la penetración de los electrones acelerados en jamones curados deshuesados.....	98
3.2.8.1.-Preparación de las muestras	98
3.2.8.2.-Tratamiento de irradiación y mapeo de la dosis.....	99
3.2.9.- Análisis sensoriales	100
3.2.9.1.-Prueba de ordenación	100
3.2.9.2.-Prueba de nivel de agrado	101
3.2.10.- Identificación de compuestos volátiles como posibles indicadores de tratamiento de irradiación con electrones acelerados en jamón curado	102
3.2.10.1.- Preparación y tratamiento de las muestras	102

3.2.10.2.- Análisis de compuestos volátiles	102
3.2.11.- Efecto del tratamiento con electrones acelerados en la capacidad de unión del plasma en polvo utilizado para elaborar jamones curados reestructurados.....	103
3.2.11.1.- Elaboración de modelos de jamón curado reestructurado (MJR)	104
3.2.11.2.- Contaminación de las piezas cárnicas reestructuradas.....	105
3.2.11.3.- Establecimiento de las condiciones de procesado para los MJR	106
3.2.11.4.- Análisis de los parámetros físico-químicos	106
3.2.11.5.- Análisis microbiológicos	107
3.2.11.6.- Determinación de la fuerza de pegado del plasma en polvo (PP).....	108
3.2.11.7.- Determinación de la microestructura	108
3.2.12.- Efecto de los electrones acelerados sobre la expresión de los genes de virulencia (<i>plcA</i> , <i>hly</i> e <i>iap</i>) y de respuesta al estrés (<i>sigB</i>) de <i>Listeria monocytogenes</i>	109
3.2.12.1.- Preparación de las muestras	109
3.2.12.2.- Extracción de ARN	110
3.2.12.3.- Síntesis del ADN complementario.....	111
3.2.12.4.- Evaluación de los genes de virulencia <i>plcA</i> , <i>hly</i> , <i>iap</i> y de respuesta al estrés <i>sigB</i>	111
3.2.13.- Análisis estadístico.....	114
3.2.13.1.- Microbiología y curvas de penetración	114
3.2.13.2.- Análisis sensoriales	114
3.2.13.3.- Parámetros físico-químicos y fuerza de pegado.....	114
3.2.13.4.- Expresión de genes de respuesta al estrés y de virulencia	115
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	116
4.1.- Evaluación del riesgo microbiológico y estimación de los parámetros relacionados	119
4.2.- Control de <i>Listeria monocytogenes</i> en jamón curado deshuesado mediante el tratamiento con electrones acelerados.....	121
4.2.1.- Estudio de la cinética de inactivación de <i>Listeria</i> y aspectos de seguridad alimentaria .	121
4.2.2.- Efecto del tratamiento con electrones acelerados en la calidad sensorial de lonchas de jamón curado	123
4.2.3.- Estudio de la capacidad de penetración de los electrones acelerados en el jamón curado deshuesado	125
4.2.4.- Evaluación del efecto listericida del tratamiento con electrones acelerados en jamones curados deshuesados	128
4.2.5.- El espesor del jamón curado deshuesado como factor limitante del tratamiento con electrones acelerados.....	129
4.3.- Modelización de la penetración de los electrones acelerados para la optimización del tratamiento higienizante de los jamones curados deshuesados	132
4.3.1.- Evaluación del efecto de la composición de la matriz del jamón curado en la penetración de los electrones acelerados	133
4.3.2.- Modelo matemático de la penetración de los electrones acelerados en el jamón curado deshuesado	136
4.4.- Efecto del tratamiento sobre las propiedades sensoriales de jamón curado deshuesado	139

4.5.- Compuestos volátiles como posibles marcadores del tratamiento de irradiación en jamón curado.....	141
4.6.- Efecto del tratamiento con electrones acelerados en la fuerza de pegado del plasma en polvo utilizado para elaborar jamones curados reestructurados.....	148
4.6.1.- Evolución de los parámetros físico-químicos de los modelos de jamones reestructurados durante su procesamiento	149
4.6.2.- Efecto del tratamiento con electrones acelerados en la fuerza de pegado del plasma en polvo (PP).....	151
4.6.3.- Determinación de la microestructura de la zona de pegado.....	154
4.6.4.- Efecto listericida del tratamiento con electrones acelerados en los modelos de jamones curados reestructurados	157
4.7.- Efecto de los electrones acelerados sobre la expresión de los genes de virulencia (<i>plcA</i> , <i>hly</i> e <i>iap</i>) y de respuesta al estrés (<i>sigB</i>) de <i>Listeria monocytogenes</i> en jamón curado.....	158
5. CONCLUSIONES	169
6. BIBLIOGRAFÍA.....	171

RESUMEN

Introducción:

El jamón curado es un producto cárnico muy apreciado por sus características sensoriales y por ser un alimento microbiológicamente seguro; su baja a_w ($\leq 0,92$) y alta concentración de sal, restringen el crecimiento de la mayoría de microorganismos. En España, se comercializa tradicionalmente en piezas enteras, pero en la actualidad hay una creciente demanda del producto deshuesado, especialmente para la exportación. Sin embargo, la operación de deshuesado implica una manipulación adicional posterior al procesado que conlleva un riesgo de contaminación con microorganismos presentes en el entorno industrial, como *Listeria monocytogenes*.

Las condiciones del jamón no favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes*, pero su presencia supone una barrera comercial en países donde el criterio microbiológico es de “tolerancia cero”. Por tanto, tras el deshuesado es necesario aplicar un tratamiento que permita lograr este objetivo de seguridad alimentaria (FSO). Una de las alternativas es el tratamiento con electrones acelerados, cuya eficacia para la higienización de alimentos ha sido ampliamente demostrada. No obstante, presenta un escaso poder de penetración, lo que supone un inconveniente para su empleo en alimentos de mayor grosor, como el jamón curado deshuesado.

Objetivo:

Establecer las condiciones del tratamiento con electrones acelerados efectivas para disminuir la carga de *L. monocytogenes* del jamón curado deshuesado hasta niveles seguros, es decir, que permitan alcanzar el FSO, preservando, a su vez, las características sensoriales del producto original. Además, se pretende conocer el efecto de este tratamiento sobre la expresión de los genes de virulencia y de respuesta al estrés de las células que han sobrevivido a la irradiación.

Metodología:

Los diferentes estudios realizados, se exponen a continuación:

- Determinación de las cinéticas de inactivación frente al tratamiento con electrones de cuatro cepas de *L. monocytogenes* (S2, S4-2, S12-1 y S7-2) y una de *L. innocua* (NCTC 11288), y obtención de los correspondientes valores D .

- Estudio de la capacidad de penetración de diferentes dosis de electrones acelerados en el jamón curado deshuesado e influencia del grosor y de la composición del producto sobre dicha capacidad.
- Aplicación del tratamiento de higienización con electrones acelerados a jamones curados deshuesados contaminados de forma intencionada con la cepa de *Listeria* más radiorresistente.
- Estudio del efecto del tratamiento sobre las propiedades sensoriales del jamón curado deshuesado.
- Identificación de compuestos volátiles en jamones curados irradiados que pudieran emplearse como marcadores radiolíticos.
- Estudio del efecto del tratamiento con electrones acelerados sobre las propiedades ligantes del plasma en polvo utilizado como agente de ligazón en frío en la elaboración de jamones curados reestructurados, como formato alternativo a los jamones deshuesados.
- Estudio del efecto del tratamiento subletal con electrones acelerados sobre la expresión de los genes de respuesta al estrés (*sigB*) y de virulencia (*plcA*, *hly* e *iap*) de *Listeria monocytogenes*.

Resultados:

A continuación, se resumen los resultados más relevantes:

- En el jamón curado deshuesado se asume, en el peor de los casos, una contaminación inicial de 1 log UFC de *Listeria monocytogenes*. Así, para alcanzar el FSO, es necesario un tratamiento que ocasione 2,39 reducciones decimales en la carga del microorganismo.
- Las cepas *L. innocua* NCTC11288 y *L. monocytogenes* S4-2 fueron las más radiorresistentes, con un valor *D* de 0,55 kGy. Considerando este valor *D*, se determinó, que sería necesario aplicar una dosis de 1,32 kGy para lograr las 2,39 reducciones decimales.
- El tratamiento con electrones acelerados aplicado de forma unilateral a jamones curados deshuesados no logra el FSO, incluso a dosis de 6 kGy. Sin embargo, con un tratamiento bilateral, a dosis de tan solo 2 kGy, sí se alcanza este objetivo.

- La capacidad de penetración de los electrones acelerados fue mayor en la parte grasa del jamón que en la magra. Sin embargo, la aplicación de 2 kGy de forma bilateral permite la penetración de los electrones acelerados en todo el producto.
- El efecto listericida de los electrones acelerados se optimizó en función del espesor del jamón curado deshuesado. Un tratamiento bilateral con dosis de 1 kGy es suficiente para eliminar *Listeria* en jamones de espesor ≤ 7 cm. Para tamaños superiores, es necesario aplicar un tratamiento bilateral con 2 kGy.
- No se observaron cambios en las propiedades sensoriales de las lonchas de jamón por efecto del tratamiento unilateral con dosis de hasta 2 kGy. Sin embargo, el tratamiento unilateral con 3 kGy tuvo un efecto negativo, principalmente en el olor, aunque dicho olor desapareció después de 15 días de almacenamiento a 4°C. Cuando se aplicó un tratamiento bilateral con 2 kGy en jamones curados deshuesados, se produjeron cambios únicamente en el olor que desaparecieron tras 15 días de almacenamiento a 4°C.
- Se proponen 18 compuestos volátiles como posibles marcadores radiolíticos; 10 de ellos se generan incluso a bajas dosis, manteniéndose durante el almacenamiento (nonano, 2,2,4,6,6-pentametil heptano, 3-metil pentano, 2-hexanona, 5-etilhidro-2(3H)-furanona, pentadecano, tridecano, undecano, 1-hepteno, 1-deceno) y 8 se detectan únicamente en los jamones sin irradiar (2,4-dimetilheptano, 2,3,4-trimetilpentano, 2-metil-1-penteno, 2,4-dimetil-1-hepteno, 2-metil-2-propanol, 2-pentanol, metil-isobutil-cetona y 2-etoxi-2-metil-propano).
- Se observaron cambios microestructurales, debido al tratamiento bilateral con 2 kGy, en la zona de pegado en jamones curados reestructurados, pero la irradiación no alteró la fuerza de pegado.
- La relación entre la expresión absoluta de los genes *sigB*, *plcA*, *hly* e *iap* de *L. monocytogenes* y el número de listerias supervivientes, sugiere que las dosis subletales de electrones acelerados podrían ocasionar un aumento de la expresión de estos genes, sin que la temperatura y del tiempo de almacenamiento influyan de forma manifiesta.

Conclusión general:

La aplicación de electrones acelerados de forma bilateral a una dosis de 2 kGy es adecuada para alcanzar, en jamón curado deshuesado, el FSO para *Listeria monocytogenes*, independientemente del tamaño y de la composición del producto. El tratamiento propuesto puede hacerse extensivo a jamones curados reestructurados. Sin embargo, el tratamiento subletal podría inducir la expresión de genes de respuesta al estrés y de virulencia de *L. monocytogenes*, lo que supone un mayor riesgo para la salud pública. La relevancia de estos resultados radica en la necesidad de optimizar el tratamiento con electrones acelerados para evitar la supervivencia de células de *L. monocytogenes*, que son potencialmente más virulentas.

Electron beam irradiation of boned dry-cured ham: elimination of *Listeria monocytogenes* and detection of radiation-induced markers

Introduction:

Dry-cured ham is a meat product highly appreciated for its sensory characteristics and for being a microbiologically safe food; its low a_w (≤ 0.92) and its high concentration of salt restrict the growth of most microorganisms. In Spain, this product is traditionally marketed as bone-in ham with the hoof, but currently there is a growing trend in demand for the boned product, especially for export. However, the boning process involves additional post-processing handling, which increases the risk of contamination with microorganisms from the industrial environment, such as *Listeria monocytogenes*.

The properties of a ham do not favour the growth of *L. monocytogenes*. However, from a commercial point of view, the presence of *Listeria* is a problem in countries such as the United States, where a microbiological criterion of “zero tolerance” for this microorganism is applied. Therefore, to achieve this food safety objective (FSO), it is necessary to apply a treatment after boning. One of the alternatives is the electron beam irradiation (E-beam), whose effectiveness for the food sanitation has been widely documented. However, E-beam has a limited penetration depth, which is a disadvantage for its use in thicker foods such as boned dry-cured ham.

Objective:

To establish the adequate conditions for E-beam treatment to accomplish the FSO with regard to *Listeria monocytogenes* in boned dry-cured ham with negligible changes in the sensory quality of the product. Also, it is aimed to know the effect of this treatment on the expression of virulence and stress-response genes in cells that have survived to the irradiation.

Methodology:

The studies performed were the following:

- Determination of inactivation kinetic of four *L. monocytogenes* strains (S2, S4-2, S12-1 and S7-2) and one of *Listeria innocua* (NCTC 11288) by E-beam treatment, so that the *D* values could be obtained.

- Study of the penetration capacity of different doses of E-beam in boned dry-cured ham. Also determining the influence of the thickness and composition of the product on this capacity.
- Application of E-beam sanitization treatment to boned dry-cured hams intentionally contaminated with the most radioresistant *Listeria* strain.
- Study of the effect of E-beam treatment on the sensory properties of boned dry-cured ham.
- Identification of volatile compounds in irradiated dry-cured hams that could be used as radiolytic markers.
- Study of the effect of E-beam treatment on the binding properties of plasma powder (PP) used as a cold binding agent in the restructured dry-cured ham processing.
- Study of the effect of E-beam treatment on the expression of virulence (*plcA*, *hly* and *iap*) and stress-response (*sigB*) genes of *Listeria monocytogenes* in dry-cured ham.

Results:

The most relevant results were the following:

- In the worst case, an initial contamination level of 1 log UFC of *Listeria monocytogenes* would occur in boned dry-cured ham. Therefore, to reach the FSO, it is necessary to apply a treatment that results in 2.39 decimal reductions in the load of *L. monocytogenes*.
- *L. monocytogenes* S4-2 and *L. innocua* NCTC11288 were the most radioresistant strains, with a *D*-value of 0.55 kGy. Considering this *D*-value, to achieve 2.39 decimal reductions in the *Listeria* level, a treatment of 1.32 kGy would be necessary to reach the FSO.
- The E-beam treatment applied unilaterally to boned dry-cured hams does not achieve the FSO, even at a dose of 6 kGy. However, with a bilateral treatment at only 2 kGy the FSO is achieved.
- The penetration capacity of E-beam was greater in the lard than in the lean part of dry-cured ham. Independently of this difference, it could be established a generic treatment in this product applying a dose of 2 kGy bilaterally.
- The listericidal effect of the E-beam treatment was optimised according to the thickness of the boned dry-cured ham. A bilateral treatment with a dose of 1 kGy is sufficient to

eliminate *Listeria* in hams up to 7 cm thick. It is necessary to apply a bilateral treatment with 2 kGy when the thickness of the ham is greater than 7 cm.

- No changes were observed in the sensory properties of the dry-cured ham slices due to the effect of unilateral treatment with doses of up to 2 kGy. However, the unilateral treatment with 3 kGy had a negative effect, mainly on the odour, although this effect disappeared after 15 days of storage at 4°C. When a bilateral treatment with 2 kGy was applied on boned dry-cured hams, changes occurred only in the odour which also disappeared after 15 days of storage at 4°C.
- Eighteen volatile compounds are proposed as possible radiolytic markers; 10 of them because are generated even at low doses, remaining during storage (nonane, 2,2,4,6,6-pentamethyl heptane, 3-methyl pentane, 2-hexanone, 5-ethylhydro-2(3H)-furanone, pentadecane, tridecane, undecane, 1-heptene and 1-decene) and 8 because are detected only in unirradiated hams (2,4-dimethylheptane, 2,3,4-trimethylpentane, 2-methyl-1-pentene, 2,4-dimethyl-1-heptene, 2-methyl-2-propanol, 2-pentanol, methyl isobutyl ketone and 2-etoxy-2-methyl-propane).
- Microstructural changes, due to bilateral treatment with 2 kGy, were observed in the binding area of restructured dry-cured hams. However, the irradiation did not alter the binding force of the PP.
- The relationship between the absolute expression of the *sigB*, *plcA*, *hly* and *iap* genes of *L. monocytogenes* and the number of surviving *Listeria*, suggest that sublethal doses of E-beam would could cause an increase in the expression of these genes, without a clear influence of storage temperature and time.

Conclusion:

The application of E-beam bilaterally at a dose of 2 kGy is adequate to achieve, in boneless cured ham, the FSO for *Listeria monocytogenes*, irrespective of the size and composition of the product. The proposed treatment can be applied to restructured dry-cured hams. However, sublethal treatment could induce the expression of stress-response and virulence genes of *L. monocytogenes*, which constitutes a greater risk to public health. These results are relevant because they highlight the importance of optimising E-beam treatment to avoid the survival of *L. mocyto*genes cells, which are potentially more virulent.

1. INTRODUCCIÓN

1.1.- Jamón curado

1.1.1.- Antecedentes históricos

Para conocer los orígenes del jamón curado hay que remontarse a la historia misma del cerdo doméstico y su relación con el hombre, lo cual es muy complejo pues a través del tiempo ha sido desde venerado hasta prohibido. Las primeras representaciones rupestres del cerdo salvaje datan de aproximadamente 40.000 años y han sido halladas simultáneamente al sur de Rodesia en África y en Altamira en Europa (Bello-Gutiérrez, 2008).

Los pasos iniciales en la domesticación del cerdo datan de hace por lo menos 12 mil años siendo descritas principalmente en Europa y Asia. Esta domesticación estuvo alentada por la gran fecundidad de esta especie y su capacidad de alimentarse de material orgánico, desde residuos de alimentos hasta de carroña, convirtiendo así en proteína animal lo que de otra forma suponía una amenaza sanitaria para los asentamientos humanos (Larson y col., 2007; Vigne et al., 2009; Marom y Bar-Oz, 2013; Larson y Fuller, 2014).

La carne del cerdo domesticado formó parte de la dieta cotidiana de civilizaciones como Grecia, Mesopotamia y China. También hay evidencias de su presencia en algunos lugares de la actual Hungría por lo menos 2.500 años a.C. No existen reseñas sobre la crianza y consumo de cerdo en el Egipto faraónico. Otra gran cultura que carece de estos vestigios es la hebrea, en la que estaba prohibido su consumo (Grigson, 2007; Stankus, 2016).

A través de la historia, la principal preocupación ha sido conservar los alimentos para asegurar la subsistencia en épocas de escasez, sobre todo la carne por ser uno de los alimentos más preciados. Así, surgieron la cocción, el ahumado, la conservación en frío (hielo), sobre todo en el norte de Europa, o el secado, en zonas de clima mediterráneo (Toldrá, 2002).

Los egipcios desarrollaron la salazón, un método que permitía conservar la carne y el pescado por largos periodos debido a la acción deshidratante de la sal y las pequeñas cantidades de nitritos y nitratos presentes en ella, hecho que se descubrió siglos más tarde (Pegg y Honikel, 2015). Los antiguos griegos importaron esta tecnología y la aplicaron en la carne de cerdo naciendo así el jamón curado. En torno al siglo V a.C., en Grecia era popular un antecesor del jamón curado conocido como *kolia* (*perna* en latín). Es probable que los etruscos también conocieran e incluso abastecieran a Grecia con este alimento, ya que se han encontrado miles de esqueletos de cerdos con ausencia de patas traseras en excavaciones realizadas en Italia. El médico Hipócrates lo recomendaba para a ciertos

enfermos y el dramaturgo Aristófanes y el filósofo Platón aludían a sus bondades (Bello-Gutiérrez, 2008).

La elaboración de perniles de cerdo salados, ahumados o no, está bien documentada en el Imperio Romano y en Europa occidental. Los emperadores Augusto y Agripa crearon monedas con forma de jamón, e incluso había medallas de las legiones romanas con forma de cerdo (Illescas, 2012). Los pueblos nativos asentados en las zonas de la actual Francia, Bélgica, España, Portugal y Croacia suministraban jamones a una Italia cuya capacidad para la fabricación era superada por la demanda de una población en crecimiento (MacKinnon, 2001; D'Arms, 2004). Las culturas Celta e Íbera elaboraban jamones muy apreciados en Roma, lo cual ha quedado documentado por Estrabón en su obra "Geographyka", donde comenta la exquisitez de los jamones de origen íbero y cantábricos cuya tradición se remonta a épocas prerromanas (Ventanas, 2006; Illescas y col., 2012).

En China, entre los años 618-907 d.C., durante la Dinastía Tang, se realizó una descripción completa del método de elaboración de jamones curados, los jamones Jinhua, cuya popularidad perdura hasta hoy (Zhou y Zhao, 2012; Stankus, 2016). En la Edad Media, en Europa, aumentó el consumo de carne de cerdo debido a la influencia de los pueblos germanos. Por ello, se perfeccionaron las explotaciones porcinas y se favoreció el desarrollo de razas como la Ibérica, propiciado además por la reconquista de la península ibérica (Bello-Gutiérrez, 2008).

Los cerdos y el jamón curado llegaron a América durante el segundo periplo de Cristóbal Colón, aunque la técnica del salado de la carne era de uso común en el Imperio Inca para la producción de charqui o carne seco-salada de camélidos sudamericanos (Salvá y col., 2012). El jamón curado se extendió en todo el continente americano y derivó con el tiempo en productos muy populares en la actualidad: como el jamón "Country style" en América del Norte y tasajo (o carne de vacuno salada) y Jerki (carne salada y ahumada de cordero, vacuno o cerdo) en América del Sur (Fadda y Vignolo, 2015; Hanson y col., 2015).

En el siglo XVII, Góngora, Tirso de Molina o Lope de Vega hicieron referencia al jamón curado como objeto de agasajo, por su importancia, cualidades y virtudes. Por su parte, Cervantes en el Quijote destacaba el mérito de Dulcinea del Toboso para tratar los productos del cerdo (Illescas y col., 2012).

Hoy en día, es un producto cárnico tradicional de los países mediterráneos, principalmente España e Italia, ampliamente consumido y reconocido mundialmente por sus características sensoriales. La calidad del jamón curado español ha sido distinguida con

menciones como la Denominación de Origen protegida (DOP) de los jamones de Teruel, Jabugo, Guijuelo, Los Pedroches y Dehesa de Extremadura; la Indicación Geográfica Protegida (IGP) de los jamones de Trevélez y Serón; y la Especialidad Tradicional Garantizada (ETG) otorgada al Jamón Serrano (Toldrá y Aristoy, 2010; MAPA, 2020).

1.1.2.- Definición de jamón curado y bases anatómicas

El Real Decreto 1469/2007 por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos define el jamón curado como el “producto elaborado con la extremidad posterior, cortada a nivel de la sínfisis isquiopúbica, con pata y hueso, que incluye la pieza osteomuscular íntegra, procedente de cerdos adultos, sometido al correspondiente proceso de salazón y curado/maduración”. Esta definición, aunque menciona al jamón Ibérico, puede también utilizarse para los jamones curados no Ibéricos.

La extremidad posterior o pernil, es la materia prima del jamón curado y está compuesta principalmente de hueso, un importante grupo muscular, grasa subcutánea y, piel. El pernil puede dividirse en tres porciones según su plano anatómico (Pérez-Juan y col., 2006; Bello-Gutiérrez, 2008; Popesko, 2010; Illescas y col., 2012):

- Porción inferior o distal, que incluye las áreas denominadas comercialmente como: pezuña, caña, y jarrete, que incluye una estructura articular llamada el codillo trasero o del jamón. La parte muscular está constituida principalmente por los siguientes músculos: *biceps femoris*, *popliteus*, *soleus*, *gastrocnemius*, *peroneus longus y tertius*, *tibialis cranialis*, *flexor digitorum longus* y *superficialis*.
- Porción central, que incluye las áreas denominadas maza, contramaza y babilla y está formada principalmente por los músculos: *biceps femoris*, *semitendinosus*, *semimembranosus*, *gastrocnemius*, *gracilis*, *adductor*, *rectus femoris*, *vastus medialis*, *intermedius* y *lateralis*.
- Porción proximal, constituida principalmente por la cadera o punta, cuya base ósea es el hueso coxal, y consta principalmente de los músculos: *biceps femoris*, *tensor fasciae latae*, *sartorius*, *pectinus*, *piriformis*, *gluteous accesorius*, *medius* y *profundus*.

La Figura 1 muestra un esquema del pernil y el jamón curado elaborado a partir de lo descrito por Pérez-Juan y col. (2006), Popesko (2010), Bello-Gutiérrez, 2008; Illescas y col. (2012) y Petrova y col. (2015).

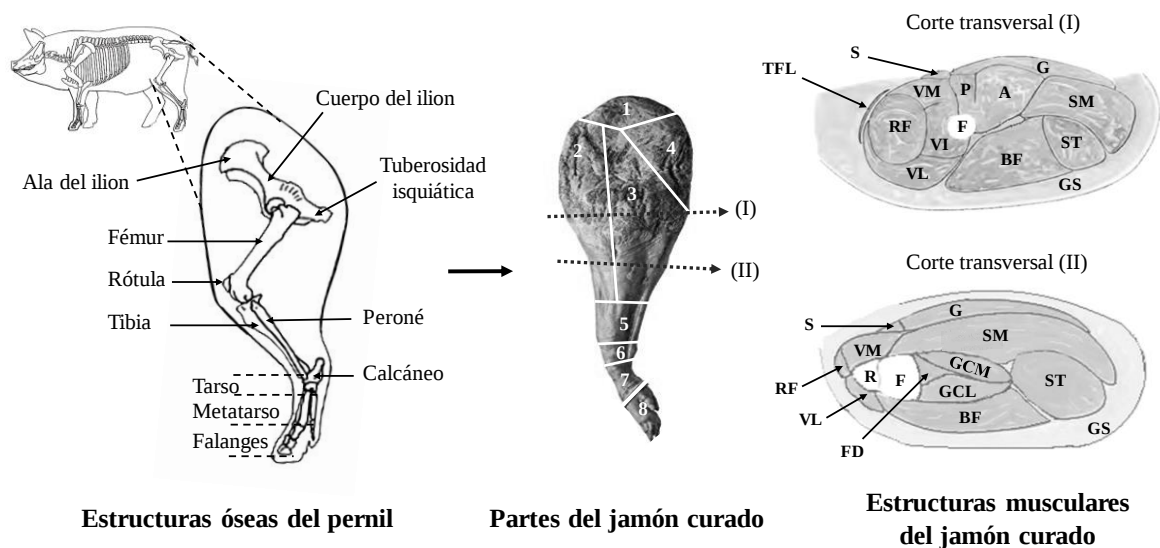


Figura 1. Puntos anatómicos de interés en el pernil y jamón curado. Partes del jamón curado (denominaciones comerciales): 1 (Punta o cadera), 2 (Babilla), 3 (Maza), 4 (Contramaza), 5 (Osobuco o jarrete), 6 (Codillo trasero o del jamón), 7 (Caña) y 8 (Pezuña). Estructuras musculares del jamón curado: TFL (*tensor fasciae latae*), S (*sartorius*), RF (*rectus femoris*), VM (*vastus medialis*), VL (*vastus lateralis*), VI (*vastus intermedius*), P (*pectineus*), A (*adductor*), G (*gracilis*), SM (*semimembranosus*), ST (*semitendinosus*), BF (*biceps femoris*), GCM y GCL (*gastrocnemius*, cabeza medial y cabeza lateral, respectivamente), FD (*flexor digitorum superficialis*). Otras estructuras: F (Fémur), R (Rótula) y GS (Grasa subcutánea).

1.1.3.- Tipos de jamón curado

Hoy en día existe una amplia gama de jamones curados. Entre los más reconocidos están los jamones españoles Ibérico y Serrano y algunos italianos como el de Parma. En Europa se distinguen los franceses, portugueses, belgas, alemanes, croatas, eslovenos y escandinavos, y del resto del mundo, los chinos y los estadounidenses (Toldrá, 2012, 2016).

En las diferentes zonas geográficas donde se producen, se han desarrollado procesos de elaboración con condiciones específicas. Se tienen en cuenta la línea genética del cerdo, su alimentación, su sistema de crianza, etc., y, en cuanto al procesado, tratamientos específicos de salazón, condiciones ambientales (temperatura y la humedad), duración del secado o la aplicación o no del ahumado, entre otros (Gou y col., 2012). Todo ello repercute en la calidad del producto final y da lugar a jamones con diversos perfiles morfológicos y características sensoriales específicas.

Tipos de jamón curado según las características de la materia prima

Para elaborar los diferentes jamones se utiliza una gran diversidad de razas y líneas porcinas pero las más comunes son Large White, Pietrain, Landrace o sus cruces (Petrova y col., 2015). En general, los países mediterráneos prefieren cerdos con una infiltración grasa

mayor como los Ibéricos mientras que en Europa del Norte se prefiere cerdos más magros (Jiménez-Colmenero y col., 2010).

Algunos jamones curados proceden de genotipos de cerdos rústicos y criados en libertad, como el Ibérico, que utiliza cerdos de raza del mismo nombre, el francés de Córcega, que usa la raza Nustrale, el italiano Cinta Senese y el húngaro-rumano de Mangálica, que emplean razas del mismo nombre. Por el contrario, otros jamones se obtienen de cerdos blancos de crianza intensiva, como de Parma, Serrano, el francés de Bayona, etc. (Toldrá y Aristoy, 2010; Ilescas, 2012; Pugliese y col., 2013; Bosse y col., 2018).

Otra cualidad importante es la edad y peso de los cerdos sacrificados. En general, los jamones producidos de cerdos con más edad suelen tener un mejor color por la mayor cantidad de mioglobina y un buen sabor, lo que se relaciona con una mejor calidad. Algunos ejemplos son: 8-9 meses (160-180 kg) para el jamón de Parma o 9-12 meses (120-140 kg) para el de Bayona. En España, los cerdos cuyos perniles serán destinados a jamón Serrano se sacrifican a los 5-6 meses con 100-120 kg, mientras que los destinados a jamón Ibérico, entre 14-18 meses y 140-180 kg (Toldrá, 2012; Estévez y col., 2015; Petrova y col., 2015).

Estos factores influyen en la forma y tamaño del jamón. Así, los jamones de Parma Bayona, el italiano de Toscana y el alemán Westphalia son más redondeados que el ibérico o el jamón portugués de Barrancos, más alargados, estrechos y de menor peso, de 8 y 5 kg, respectivamente (Bosse y col., 2018). Los jamones Jinhua y Xuanwei son de menor tamaño pues proceden de razas pequeñas con perniles de 3-4 kg (Petrova y col., 2015).

Tipos de jamón curado según las particularidades del procesamiento

La forma de algunos jamones depende exclusivamente del perfilado de pernil, como los italianos de San Daniele, Módena y Norcia, que presentan forma de pera o violín o el jamón belga de Las Ardenas, con forma redondeada y bajo peso (4 kg) debido a que se recortan (Gou y col., 2012; Bosse y col., 2018).

En España es común comercializar jamones con el hueso coxal, que permite mantener la conformación muscular. En Francia e Italia se retira casi la totalidad de este hueso, aunque permanece una porción de esta estructura (“anchetta”) para evitar la formación de cavidades que obstaculicen el secado (Estévez y col., 2015; Toldrá y Aristoy, 2010; Toldrá, 2012).

El jamón Serrano, Ibérico, el italiano de Aosta, San Daniele, el de Barrancos y el Jinhua mantienen la pezuña en el producto final, mientras que los italianos de Toscana, de Parma, Bayona, el esloveno de Kraski, los croatas Dálmata y de Istria, entre otros, presentan perniles

enteros, pero sin la pezuña. Algunos jamones se deshuesan antes del procesado como los alemanes de Ammerland y el Selva Negra, aunque hoy en día, y con el fin de satisfacer las demandas del consumidor, es común encontrar formatos deshuesados de la mayoría de los jamones (Zhou y Zhao, 2012; Gibis y col., 2014; Bosse y col., 2018).

En la cuenca mediterránea, la salazón se realiza en seco y empleando sal común sin refinar la cual suele contener sales nitrificantes en cantidades residuales, por lo que es frecuente la adición de nitritos y/o nitratos. Algunos jamones como los de Parma, San Daniele, Dalmata, de Istria o Kraski utilizan únicamente sal marina y no permiten la adición de sales nitrificantes. En el norte de Europa se suele usar sal refinada acompañada de nitritos que favorecen el acortamiento del curado (Bosse y col., 2018; Zadavec y col., 2020).

En otros jamones como los de Aosta, de Toscana, Ammerland e Istria, la sal marina se mezcla con especias, como pimienta, ajo y hierbas aromáticas. Algunos como el de Las Ardenas se salan en seco o en salmuera; otros, como el de Westphalia, son frotados con sal y salados en salmuera (Bello-Gutiérrez, 2008; Gibis y col., 2014; Marušić y col., 2014).

La fase de maduración del jamón curado puede ser particularmente larga y está relacionada con la calidad y coste del producto final. Algunos ejemplos son el jamón Ibérico cuyo procesado dura 24 - 48 meses; el jamón Kraski, de 12-24 meses; el de Córcega, de 12-36 meses; el de Carpegna, más de 14 meses (Bello-Gutiérrez, 2008; Andronikov y col., 2013).

El ahumado está generalmente asociado con un procesado más corto como ocurre en jamones del norte de Europa, la península Balcánica, Portugal e Italia. Son los jamones Ammerland, Selva Negra o Westphalia, cuyo procesado dura de 3 a 5 meses, el de Las Ardenas de 4 meses, el finlandés Sauna de 2 a 4 meses y los “Country-style ham” de Estados Unidos, de 3 a 6 meses (Toldrá, 2012; Gibis y col., 2014; Petrova y col., 2015). Sin embargo, otros jamones ahumados conllevan largos periodos de maduración como en el noruego Santa Cristina y el jamón de Dalmata, que se maduran durante 15-24 meses (Petrova y col., 2015; Maksan y Brečić, 2019).

1.1.4.- Proceso de elaboración de los jamones curados

Durante siglos, para la elaboración artesanal de los jamones se criaban a los cerdos en casa y se sacrificaban a principios del invierno, es decir, a finales de noviembre. Los jamones se salaban a mano, frotando sal en las superficies del pernil, y luego reposaban en el frío un par de semanas. La fase de secado tenía lugar durante la primavera y el verano. Durante este

periodo los jamones eran colgados en la parte superior de la casa para facilitar el control de la temperatura y la humedad mediante la apertura de las ventanas dependiendo de las condiciones meteorológicas. Finalmente, los productores artesanos evaluaban sensorialmente cada jamón y determinaban el término del proceso basándose en una experiencia que era transmitida de generación en generación (Toldrá y Aristoy, 2010; Toldrá, 2012). Esta práctica casi ha desaparecido con el desarrollo tecnológico, procesándose de forma controlada en instalaciones industriales.

Actualmente, las diferentes fases del procesamiento, tomando a los jamones mediterráneos como modelo, se observan en el esquema de la Figura 2.

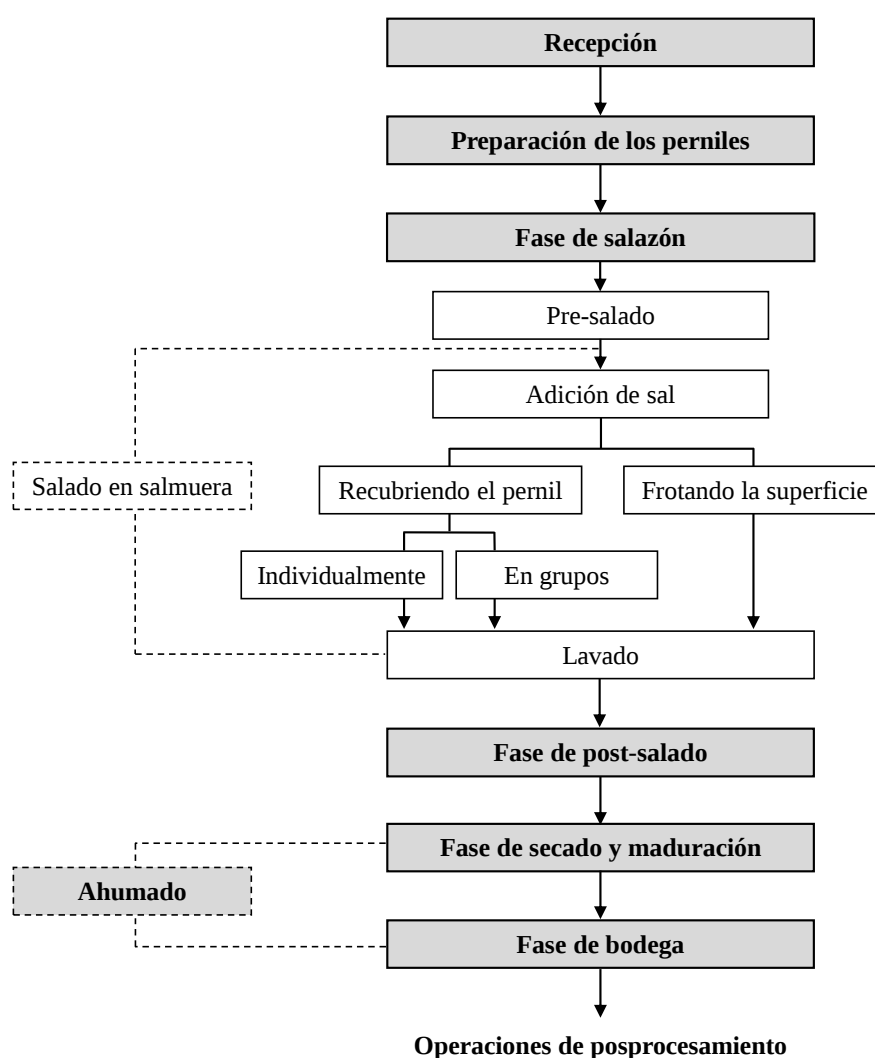


Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de elaboración de jamón curado. Las fases del proceso se observan en gris, en blanco se señalan algunas operaciones importantes dentro de cada fase y en líneas discontinuas algunos procedimientos excepcionales que no corresponden a jamones mediterráneos.

El proceso de elaboración del jamón curado puede variar de un tipo de jamón a otro, en función de diferentes condicionantes, como se ha descrito previamente. No obstante, y de forma general, la elaboración industrial actual consta de diferentes fases que, de acuerdo con Estévez y col. (2015), se pueden agrupar en dos:

- Una etapa “fría” que incluye las fases de recepción, preparación de los perniles, salazón y post-salado o reposo a baja temperatura en la que se produce la estabilización del producto.
- Una etapa “caliente” que incluye las fases de secado-maduración y de bodega, donde las temperaturas ya no son de refrigeración y en la que se generan los sabores y aromas finales.

1.1.4.1.- Fase de recepción y clasificación de los perniles

La calidad de la materia prima repercute directamente sobre la calidad final del producto, por lo que en esta fase el pernil se somete a una inspección sanitaria y visual para corroborar la ausencia de pelos, hematomas, fracturas y otros requerimientos específicos como la presencia o no del hueso coxal y pezuñas (Gou y col., 2012). Tras ello, los perniles se clasifican en función de su peso, el pH, la temperatura y el espesor de la capa de grasa. En esta etapa los jamones son registrados y etiquetados para facilitar su trazabilidad y seguimiento (Toldrá y Aristoy, 2010; Toldrá, 2012).

El pH del pernil fresco es particularmente importante, ya que un pH más bajo de lo normal ($\text{pH} < 5,5$) es signo de una carne pálida, blanda y exudativa que, al presentar una baja capacidad de retención de agua, conduce a grandes pérdidas de peso y al riesgo de formación de una superficie exudativa que favorecería la penetración en exceso de sal y un mayor sabor salado final. Un alto valor de pH ($\text{pH} > 6,2$) es indicativo de carne oscura, firme y seca, por lo que debe rechazarse al comprometer la seguridad microbiológica del producto. La carne más adecuada debe tener un pH entre 5,6 y 6,0 pasadas las 24 h de sacrificio ya que facilita la penetración de las sales de curado (Bello-Gutiérrez, 2008; Bosse y col., 2018).

Los jamones se clasifican en función de su peso y se agrupan los de pesos similares y con diferencias máximas de 1 kg. Esta clasificación será especialmente importante para la fase de salazón y permite obtener piezas lo más uniformes posible. También se clasifican por el espesor de la capa de tocino; no debe ser superior a 5 cm y, si lo es, se ajusta con un perfilado posterior (Toldrá, 2012).

La materia prima puede recibirse refrigerada o congelada. El primer caso es habitual en las zonas donde hay mataderos y salas de despiece cercanas y en abundancia. En cambio, los jamones congelados se utilizan con mayor frecuencia cuando la materia prima debe ser transportada por largos periodos, cuando se necesitaran varios días para completar una cantidad de perniles mínimos para constituir un lote, si las salas de corte que nutren la industria son pequeñas o de baja producción o simplemente por razones de tipo económico. Sin embargo, el uso de perniles congelados conlleva una adaptación del proceso posterior de salado. Además, el congelado podría producir cristales, grietas, quemaduras por frío y, en algunos casos, una deshidratación severa en el pernil, lo que dificultaría la penetración de la sal (Gou y col., 2012). La elección del tipo de materia prima dependerá en gran medida de la disponibilidad del mercado, aunque el factor determinante estará definido en primer lugar por las características propias del tipo de jamón que se esté elaborando.

1.1.4.2.- Preparación de los perniles

Tras la recepción, los perniles se preparan y acondicionan de acuerdo a las características específicas según el tipo de jamón. Esta fase consta de tres operaciones: perfilado, sangrado y enfriamiento de las piezas.

Durante el perfilado se elimina parte de la musculatura, grasa y piel de la cara externa de la pieza, dándole las proporciones convenientes en función de las características que se desean alcanzar e intentando homogeneizar todas las piezas de un mismo lote. El perfilado no solo tiene un fin estético, también busca asegurar que no quede ninguna fisura que pueda albergar polvo, insectos o cualquier otro contaminante y además permitir la penetración de la sal y la evaporación del agua (Bello-Gutiérrez, 2008; Toldrá y Aristoy, 2010). Hay varias formas de perfilar: con o sin piel, corte redondo, en media luna y corte en “V” que es el más conocido y común en España (Illescas y col., 2012; Gou y col., 2012; Marušić y col., 2014).

Los perniles ya perfilados se someten a una operación de sangrado con el fin de evacuar la sangre que haya quedado en las arterias femoral y safena y con ello reducir el riesgo de contaminación microbiológica y mejorar el aspecto. Esta suele hacerse ejerciendo presión, desde la pezuña hasta la parte media de los perniles y de forma manual o mediante de rodillos que ejercen este aplastamiento en el mismo sentido (Toldrá, 2012; Gou y col., 2012).

Finalmente, los perniles refrigerados se llevan a una cámara de enfriamiento durante 1-2 días para alcanzar una temperatura interna de 2-4°C. Si son perniles congelados, se descongelan hasta que alcancen esa temperatura interna (Toldrá y Aristoy, 2010; Toldrá, 2012; Gou y col., 2012).

1.1.4.3.- Fase de salazón

Pre-salado

En esta etapa, los perniles se ponen en contacto con una mezcla de NaCl y sales de nitratos y/o nitritos (aproximadamente 150-100 mg/kg) mediante frotación directa, aunque también puede hacerse dentro de un tambor rotatorio (Subramanian y col., 2014; Pegg y Honikel, 2015). En algunos tipos de jamón, la adición de sales nitrificantes no está permitida y solo se puede usar la sal marina, que contiene estos compuestos como impurezas (Toldrá y Aristoy, 2010; Gou y col., 2012; Toldrá, 2012, 2016).

El nitrato se reduce a nitrito mediante la enzima nitrato-reductasa producida por microorganismos de la familia *Micrococcaceae* que se encuentran como parte de la microbiota natural del jamón. Este nitrito tiene efectos inhibitorios sobre los microorganismos y además es necesario para el desarrollo del color rojo de carne curada (Arnau y col., 2003; Toldrá, 2004; Honikel, 2008; Armenteros y col., 2012a). La adición directa de nitritos es más común en la elaboración de jamones en el norte de Europa donde el procesamiento es de menor tiempo.

En esta etapa se puede agregar ascorbato para favorecer las reacciones del curado disminuyendo, además, la formación de nitrosaminas. También se pueden adicionar azúcares con el fin de promover el crecimiento de una microbiota deseable y el desarrollo de sabores (Pegg y Shahidi, 2000; Gou y col., 2012; Bosse y col., 2018). Por ejemplo, se agrega dextrosa y ascorbato de sodio a razón de 1 y 0,5 g / kg de pernil, respectivamente (Pérez-Santaescolástica y col., 2018).

Salazón

La salazón consiste en poner en contacto la superficie del pernil con la sal con el objetivo de que penetre una cantidad suficiente que, tras su difusión hacia el interior, favorezca la deshidratación del pernil. Como resultado ocurre una disminución de la a_w hasta valores suficientes para inhibir una microbiota potencialmente alterante o patógena. A su vez, da el sabor salado típico a los jamones (Toldrá y Aristoy, 2010; Toldrá, 2012).

La cantidad de sal a usarse dependerá de la variedad de jamón, del peso y la forma. En los países del Mediterráneo, la salazón se realiza normalmente en seco y de dos formas diferentes: cubriéndolos con sal (individualmente o en sistemas de "apilado") o utilizando una cantidad de sal en función al peso del pernil.

- Cubriéndolos con sal: La salazón se realiza apilándolos de forma que la superficie de grasa subcutánea quede siempre en la parte inferior y en capas alternas pernil-sal-pernil hasta una altura máxima de 8-9 perniles con el fin de evitar que los que estén más abajo soporten mucho peso, lo que favorecería la penetración de una mayor cantidad de sal y su deshidratación. El apilamiento puede hacerse en grandes naves (salazón en pilas) con suelos de cemento o cerámica (para facilitar el lavado) o bien en grandes cubetas o contenedores de acero inoxidable. En esta técnica hay que controlar el tiempo de salado, aproximadamente 1 día/kg, más que la cantidad de sal de las piezas. La sal utilizada tiene normalmente 4-5% de humedad para asegurar un correcto salado, y la humedad relativa (HR) en las salas es $\geq 75\%$ para evitar la desecación del jamón. En otros tipos de jamones, como por ejemplo el San Daniele, los perniles también se cubren con sal pero de forma individual (Bello-Gutiérrez, 2008; Arnau, 2014).

- Utilizando una cantidad de sal en función al peso del pernil: En otro tipo de jamones, como el de Parma, el salado se realiza utilizando una cantidad de sal proporcional al peso del pernil. Para ello, se aplica la sal en la superficie externa, de forma mecánica o frotando con la mano y se deja en estanterías en posición horizontal durante 3-4 semanas, dependiendo del tamaño del pernil, con una HR de 70-95%. Suelen usarse de 20 a 30 g de sal seca por kg sobre la superficie magra y de 10 a 20 g de sal húmeda/kg sobre la piel. En esta metodología, la aplicación de sal en el jamón se realiza en dos tiempos, lo que permite conseguir un salado uniforme (Gou y col., 2012). En algunos jamones también puede continuar con un apilado.

En ambos casos, la salazón debe realizarse siempre a temperaturas entre 1 y 3°C para controlar el crecimiento microbiano. Finalizado el periodo de salado, el pernil habrá perdido el 3-4% de su peso (Toldrá y Aristoy, 2010; Toldrá, 2012).

En los países del norte de Europa también se utiliza la salazón en salmuera. La salmuera produce un menor nivel de deshidratación y requiere un menor gasto de sal que el salado en seco (Toldrá y Aristoy, 2010; Gou y col., 2012; Arnau, 2014).

Lavado

Finalizada la salazón se quita la sal superficial y, posteriormente, la pieza recibe un baño de agua tibia por chorros, para eliminar los cristales de sal que quedan en la superficie del jamón. Excepcionalmente, algunos jamones italianos suelen lavarse al final de la fase de post-salado (Arnau, 2014).

Tras el lavado se hace un escurrido y secado rápido de la pieza para evitar el crecimiento de microbiota indeseable. Este lavado y secado se puede realizar en lavadora de jamones y cámaras de secado (Gou y col., 2012; Estévez y col., 2015). Al final del proceso de salazón, es aconsejable realizar un segundo sangrado y se puede conformar de nuevo la pieza (para alargarla y darle forma) adquiriendo una mejor presentación (Gou y col., 2012). Finalmente se cuelgan en ganchos de acero inoxidable con argollas de plástico o de cuerda para iniciar el proceso de post-salado (Illescas, 2012). Una operación excepcional es el prensado tras el salado como en el jamón de Istria o el de Véneto (Bosse y col., 2018). En otros jamones, como los de Jinhua o San Daniele, se realiza un secado al sol tras el lavado (Zhou y Zhao, 2012; Estévez y col., 2015).

1.1.4.4.- Fase de post-salado o reposo

El objetivo de esta fase es que la sal impregnada durante el salado se difunda homogéneamente por el interior hasta alcanzar el centro de los perniles, para que toda la pieza mantenga su contenido característico en sal. La difusión de la sal es un proceso lento ya que ha de recorrer una masa tisular heterogénea. Por ello, se necesita un periodo de tiempo aproximado de entre 40 y 90 días, dependiendo de variables como el tamaño del pernil, el pH, las condiciones de la cámara y el espesor de la capa de grasa. Este último factor es importante debido a que la difusión de la sal a través del tocino es mucho más lenta por su menor contenido acuoso (Toldrá y Aristoy, 2010; Gou y col., 2012; Estévez y col., 2015)

La HR en la cámara de post-salado es usualmente del 90-95%. Los perniles deben reposar siempre en refrigeración a 1-5°C pues, hasta que no difunda la sal en la totalidad del producto, la temperatura es el único factor que puede controlar el crecimiento microbiano. Durante el post-salado, la a_w disminuye por debajo de 0,96 en los tejidos magros como resultado de la acción de la sal y de la deshidratación; las pérdidas de peso oscilan entre el 4-6%. La baja a_w alcanzada al final de esta etapa, además de la difusión de la sal y las sales nitrificantes, permitirá el aumento de la temperatura en etapas posteriores (Toldrá, 2012; Arnau, 2014; Petrova y col., 2015).

1.1.4.5.- Fases de secado-maduración y bodega

Fase de secado-maduración

Durante esta etapa existen dos objetivos principales: continuar con la deshidratación del jamón y proporcionar el tiempo suficiente para que se desarrolle una actividad enzimática que origine los compuestos sápidos y aromáticos responsables de las características

sensoriales. El jamón experimenta una reducción progresiva de su contenido de humedad hasta alcanzar aproximadamente el 32% de pérdida de peso, lo que ocasiona la concentración de sal en el interior y una disminución mayor de la a_w , resultando en una reducción de la velocidad de las reacciones enzimáticas, evitando degradaciones excesivas y defectos como una textura blanda y pastosa (Toldrá y Aristoy, 2010; Arnau, 2014; Estévez y col., 2015).

En este periodo, se desarrolla un gradiente de presión que fuerza una salida de agua hacia la superficie del jamón produciéndose el secado del producto. La velocidad a la que un jamón se seca, y por tanto la duración de esta etapa, depende de dos mecanismos que se desarrollan simultáneamente: i) la evaporación del agua de la superficie, que depende de las condiciones de la cámara y del área de la superficie expuesta, y ii) el movimiento del agua desde la parte interna del producto hasta el exterior, que depende a su vez de los factores intrínsecos como la naturaleza de la matriz, la cantidad de grasa intramuscular y su contenido de sal y humedad (Toldrá y Aristoy, 2010; Toldrá, 2012; Mujumdar, 2015).

Aunque en casos específicos la etapa de secado-maduración puede durar un mínimo de 3 meses, normalmente se requieren al menos de 6 a 9 meses para obtener un jamón de calidad, lo que supone una pérdida de peso de alrededor del 32-36% (Hoz y col., 2008). Las condiciones en la cámara de secado (velocidad del aire, temperatura, HR, tiempo) repercuten directamente sobre calidad final del jamón curado, por lo que deben ser controladas y verificadas con precisión de acuerdo al tipo de jamón. Así, los jamones españoles se someten a un aumento de temperatura lento y progresivo y la temperatura de las cámaras va incrementándose a lo largo del tiempo hasta llegar a un máximo de 28-30°C, lo que permite la fusión de la grasa impregnando el tejido muscular que forma parte de sus propiedades sensoriales características (Bello-Gutiérrez, 2008); por el contrario, los jamones franceses se llevan a 22-26°C inmediatamente después de la etapa de post-salado (Toldrá, 2012).

En el jamón Ibérico, esta fase es de aproximadamente 90 días y la temperatura aumenta lentamente hasta alcanzar los 18-20°C. Después, la temperatura se incrementa lentamente durante un período de alrededor de 1-1,5 meses hasta unos 30°C y la HR es de 60-80% (Gou y col., 2012). En el caso de los jamones Serranos, la temperatura se incrementa lentamente de 10°C a 12°C hasta alcanzar un máximo de entre 28°C y 34°C y la HR es, como en el caso anterior, de entre el 60% y el 80% para mantener la deshidratación del jamón (Arnau, 2014).

En el jamón de Parma, la fase de secado se realiza a una temperatura de unos 15°C y una HR de alrededor del 65-80%. Después de 6-8 meses, se ralentiza la fase de secado mediante la aplicación de una mezcla pastosa de grasa, harina, pimienta y sal que se añade varias veces

a medida que el jamón se va secando. Esta fase dura al menos 10-12 meses dependiendo del peso del producto (Gou y col., 2012; Estévez y col., 2015).

Fase de bodega

El objetivo de esta etapa es obtener una mayor calidad sensorial y desarrollar un sabor más intenso. Para ello, después de la etapa de secado-maduración, los jamones se mantienen bajo temperaturas de 12-20°C durante un período de tiempo que depende del tipo de producto y de la calidad sensorial que se desea (Estévez y col., 2015).

Un ejemplo de jamones curados con periodos largos de bodega es el jamón Ibérico que se mantiene en bodega entre 10-22°C, HR de 65-82% y hasta 24 meses. Este lapso permite el desarrollo de sabores intensos, generados a través de intensas reacciones de lipólisis, proteólisis y oxidativos, generando compuestos volátiles de los que dependerá el aroma y sabor del producto final. La proteólisis es intensa y origina grandes cantidades de aminoácidos libres; en la mayoría de los casos, los cristales de tirosina, que son bastante insolubles, se observan como manchas blancas en la superficie de corte. Los jamones Serranos de gran calidad también se someten a fase de bodega a temperaturas de 12°C a 20°C y HR de 50% a 80% (Toldrá y Aristoy, 2010; Arnau, 2014; Toldrá, 2016).

La calidad de estos jamones (textura, apariencia, color y sabor) se controla mediante observación directa de las piezas y mediante la prueba de olfateo o cala. Esta técnica tradicional para la evaluación rápida de la calidad, consiste en la inserción de una pequeña sonda o “cala” en la unión de los huesos, por ser una zona propensa al deterioro, que inmediatamente es olfateada por un experto para detectar cualquier olor desagradable y para determinar la conformidad del proceso (Toldrá y Aristoy, 2010; Toldrá, 2012).

Los jamones deben cubrirse con una fina capa de manteca (engrasado del jamón) para evitar una deshidratación excesiva y endurecimiento de la superficie y a la vez permitir una acción enzimática lenta y más prolongada (Toldrá y Aristoy, 2010, Toldrá, 2012). Asimismo, permite tapar grietas que son más evidentes en el músculo aductor y alrededor de la articulación coxofemoral. Este engrasado dificulta además el crecimiento en la superficie de ácaros, bacterias, mohos y/o levaduras, que pueden producir defectos (Illescas, 2012; Gou y col., 2012; Arnau, 2014). Cuando las piezas son suficientemente grasas el propio sudado resulta suficiente para protegerlas (Bello-Gutiérrez, 2008; Gou y col., 2012).

El engrasado coincide con el final del procesamiento ya que un engrasado prematuro podría generar texturas muy blandas pero el momento idóneo lo marcan las condiciones del

pernil y el proceso tecnológico. Así, puede realizarse antes de la fase de bodega; en este momento la pieza presenta normalmente una capa de mohos del secadero que se elimina mediante un cepillado antes de la aplicación de la película de manteca de cerdo o aceite (Illescas 2012). En algunos jamones italianos (San Daniele y Parma) esta grasa va mezclada con sal, pimienta y harina, y se aplica durante la maduración (Estévez y col., 2015).

Ahumado

El ahumado no se aplica en la mayoría de los jamones curados, pero suele ser frecuente en los jamones de corto procesamiento, y suele realizarse en la etapa final, comúnmente durante la fase de secado-maduración. El uso del ahumado es común en países con climas fríos y húmedos donde el secado era originalmente más difícil: norte de Europa y América. El ahumado proporciona un color y sabor *sui generis* y ejerce un papel antioxidante y antimicrobiano (Toldrá y Aristoy, 2010; Toldrá, 2012, 2016; Arnau, 2014).

1.1.5.- Cambios físico-químicos durante el procesado del jamón

Los principales cambios físico-químicos durante el procesamiento del jamón curado son resultado de la pérdida de agua y la penetración de sal. Si bien la mayoría presenta un contenido final de sal del 7-8%, existe mucha variabilidad dependiendo del tipo de jamón. En los extremos tenemos al jamón de Jinhua que suele presentar entre 8-15%, y a los jamones Ibéricos, de Parma y Dalmata, conteniendo entre 4,5-6,5% (Cabezas y col., 2013; Petrova y col., 2015; Maksan y Brečić, 2019).

La mayor parte del agua de la masa muscular se encuentra retenida en la red de miofibrillas debido a fenómenos de capilaridad, por lo que cualquier factor que reduzca el espacio entre filamentos miofibrilares genera una disminución en la capacidad de retención de agua. Esto ocurre durante el salado ya que el anión cloruro (Cl^-) se une a los grupos proteicos cargados positivamente e incrementa la fuerza iónica del medio. Consecuentemente, se incrementa la solubilidad de las proteínas miofibrilares lo que, sumado a su desnaturalización parcial, favorece su reorganización molecular y el posterior fenómeno de gelificación durante la maduración que confiere al jamón las propiedades de la textura. Además, esta solubilización proteica permite enmascarar el sabor salado y contribuye al desarrollo de las características organolépticas en el producto final, ya que participan en reacciones que conducen a formación de compuestos responsables del aroma y el sabor (Bello-Gutiérrez, 2008; Toldrá, 2012).

Asimismo, el pH tiene influencia directa sobre la textura de la carne por su efecto en la actividad de muchos sistemas proteolíticos. El pH varía poco durante el transcurso del proceso de salado, 0,1-0,2 unidades, para remontar algo en el post-salado y situarse a unas 0,5 unidades por encima del pH inicial, aproximadamente (Bello-Gutiérrez, 2008). En general, el producto final tiene una humedad de 50-30% y valores de pH y de a_w del orden de 5,68-6,4 y 0,85-0,92, respectivamente (Asensio y Díaz, 2001; Toldrá y Aristoy, 2010; Cabezas y col., 2013; Petrova y col., 2015). A modo de ejemplo, en la Tabla 1, se muestran estos parámetros con las características más importantes de algunas variedades de jamón.

Tabla 1. Características y parámetros físico-químicos de algunos tipos de jamones curados

Jamón	Raza de cerdo	Proceso (mes)	Peso (kg)	NaCl (%)	a_w	pH
Serrano	LW y D	9-18	8	4,5-8	<0.92	5,7-6,4
Ibérico	Ibérico	24-48	8	3,5-6,5	0.87	5,1
Parma	LW, L y D	12-18	8-10	4,5-6,4	0.94	5,7
Toscano	LW y L	≥12	8-9	≤8.3	0.87	5,5
Bayona	Pie Noir	≥9	8-Set	7.7	0.89	5,8

Todos los valores son del producto final. Razas de cerdo: LW (Large White), D (Duroc) y L (Landrace). Fuente: Cabezas y col. (2013), Petrova y col. (2015), Menéndez y col. (2018)

1.1.6.- Cambios bioquímicos durante el procesado del jamón

Proteólisis

La proteólisis consiste en la degradación progresiva de las proteínas musculares y ocurre fundamentalmente por la acción de enzimas endógenas como las calpaínas que tienen una actividad importante durante las fases de salado y post-salado, pero en fases posteriores de secado-maduración presentan una actividad insignificante ya que su estabilidad es pobre a las temperaturas más elevadas de estas fases (Toldrá, 2006; Mora y col., 2009; Ortega y Ariza, 2012; Toldrá y Reig, 2015). Otras son las catepsinas y las exopeptidasas musculares (tripeptidilpeptidasas, dipeptidasas, aminopeptidasas, etc.), que son estables durante todo el procesamiento del jamón, aunque con mayores actividades al inicio y en etapas finales (“etapa caliente”). Estas actividades enzimáticas disminuyen considerablemente conforme baja la a_w e incrementa el nivel de sal, pero parte se recupera durante la fase de secado-maduración y continúa hasta el final de la fase de bodega. Como resultado de la acción de estas enzimas, se generan numerosos aminoácidos libres que, a su vez, pueden ser sustratos

de otras reacciones dando lugar a un conjunto complejo de volátiles responsables del sabor y aroma (Zhou y Zhao, 2007; Flores y Toldrá, 2011; Toldrá, 2012; Petrova y col., 2015).

El alcance de la proteólisis depende de muchos factores, como la raza y edad de los cerdos, de los que dependen el perfil y la actividad de las enzimas (Mora y col. 2016; Toldrá, 2012). Otros factores son el contenido de sal, la temperatura y el tiempo de secado-maduración (Toldrá, 2012).

La proteólisis influye en la textura del jamón curado, debido al debilitamiento de la red miofibrilar. Asimismo, el sabor global del producto depende de los aminoácidos libres predominantes y de los umbrales de detección de cada uno de ellos. Así, el sabor salado se asocia con el ácido glutámico, algunos péptidos formados por ácido glutámico y tirosina han sido relacionados con el sabor “añejo” y los que corresponden a valina-glutámico y glicina-glutámico con el sabor “agrio” (Bello-Gutiérrez, 2008).

Lipólisis

La lipólisis consiste en la descomposición de triglicéridos y fosfolípidos por acción de lipasas y fosfolipasas, respectivamente, que hidrolizan los enlaces ésteres que vinculan la molécula de glicerol con los ácidos grasos (Bryksa y Yada, 2018). Estos ácidos grasos libres pueden contribuir de forma directa al sabor e indirecta al aroma a través de la generación de compuestos volátiles mediante reacciones de oxidación adicionales (Toldrá, 2011).

Las lipasas implicadas son: monoacilglicerol lipasa (MGL), lipasa hormono-sensible citosólica (LHS) y lipoproteínlipasa (LPL). LPL y LHS son capaces de hidrolizar los tri y diglicéridos para dar lugar a monoglicéridos, que finalmente son hidrolizados por MLG (Gandemer, 2002; Toldrá, 2012; Toldrá y Reig, 2015). Estas enzimas son estables a lo largo de todo el proceso. Su actividad suele ser rápida en los primeros 5-10 meses, para luego hacerse muy lenta hasta el final del procesamiento. La generación de ácidos grasos libres también es alta durante los primeros 10 meses, observándose posteriormente una tendencia inversa debido a las reacciones oxidativas (Bello-Gutiérrez, 2008; Toldrá, 2012).

Oxidación lipídica

Los ácidos grasos insaturados libres generados por la lipólisis son sustrato de las reacciones de autooxidación, principalmente catalizadas por oxidasas endógenas. La oxidación produce numerosos radicales libres que pueden originar compuestos volátiles de gran importancia en las características sensoriales del jamón (Reis y Spickett, 2012; Yada y col., 2012). Es el caso de los hidrocarburos alifáticos, alcoholes, aldehídos y cetonas. A su

vez, los alcoholes pueden interactuar con los ácidos grasos libres produciendo ésteres relacionados con su olor a “viejo” (Toldrá, 2012; Estévez, 2017)

Las reacciones oxidativas se ven favorecidas por las altas temperaturas y los largos tiempos de secado-maduración, así como una alta concentración de sal y la baja a_w , por lo que el control de estos factores es de gran relevancia. Por el contrario, ejercen una actividad antioxidante: los nitritos, algunas enzimas y péptidos, la vitamina E, etc. (Gilles, 2009).

Reacciones de Maillard y Strecker

Los aminoácidos libres producidos durante la proteólisis pueden ser sustrato de las reacciones de Maillard y Strecker, y dar lugar a compuestos volátiles que influyen en el aroma del jamón curado. La reacción de Maillard genera numerosos de estos compuestos, como furanonas, furfural, dicarbonilos, cetonas, etc., algunos de los cuales a su vez pueden reaccionar con aminas, aminoácidos, sulfuro de hidrógeno, tioles o amoníaco, produciendo compuestos heterocíclicos (pirazinas, oxazoles, tiofenos, tiazoles) con bajo umbral de olor. La reacción de Strecker también produce compuestos heterocíclicos, compuestos sulfúricos y, principalmente, aldehídos como el 2-metilbutanal, 3-metilbutanal y 2-metilpropanal, todos con impacto en el aroma (Bello-Gutiérrez, 2008; Estévez, 2017; Flores, 2017).

1.1.7.- Microbiota del jamón curado

Los microorganismos contaminantes pueden llegar a la superficie de los pernils procedentes de las labores de sacrificio, desde el animal vivo (principalmente desde la piel, cavidad oral y contenido gastrointestinal) y desde utensilios y equipos utilizados en la obtención de la canal o de su despiezado (Barrientos y col., 2015; Morganti y col., 2016; Zuber y col., 2019). Tras la muerte del animal, el único obstáculo físico-químico que retrasa el crecimiento de estos microorganismos contaminantes es el pH relativamente ácido, a consecuencia del aumento muscular de ácido láctico durante la conversión del músculo en carne, pero esto resulta insuficiente (Zagorec y Champomier-Verges, 2017).

Sin embargo, el jamón curado es considerado tradicionalmente como un producto seguro desde el punto de vista microbiológico. Ello se debe a algunas de sus propiedades físico-químicas, como la baja a_w , el ambiente microaerófilo interno, los efectos bacteriostáticos e inhibidores de la sal y los nitratos y nitritos, y la presencia de algunos metabolitos inhibidores derivados del crecimiento de su propia microbiota (Menéndez y col., 2018). De todos estos factores, la a_w es el factor más importante que rige el crecimiento microbiano y el deterioro de los alimentos. Así, la baja a_w en el jamón curado provoca una pérdida del agua intracelular

de los microorganismos hasta alcanzar un equilibrio osmótico con el medio extracelular, lo que afecta las reacciones enzimáticas normales, aumenta la fase de latencia y disminuye el número de células en la fase estacionaria del crecimiento de los microorganismos (Erkmen y Bozoglu, 2016).

La mayoría de las bacterias tienen una a_w óptima de crecimiento por encima de 0,92. A una a_w de 0,98, predominan las bacterias Gram (-) y a a_w de 0,97, las Gram (+). Bacterias Gram (-), como *Pseudomonas* spp. y la mayoría de las *Enterobacteriaceae*, pueden crecer por encima de 0,96 y 0,93, respectivamente. Las Gram (+) no esporuladas son menos sensibles, por ejemplo los lactobacilos se desarrollan con un mínimo de 0,94, mientras que las micrococáceas son capaces de crecer por debajo de 0,90. El mínimo de a_w para el crecimiento de *Staphylococcus aureus* es de alrededor de 0,86 en condiciones aeróbicas y 0,90 bajo anaerobiosis, pero este microorganismo no produce enterotoxinas por debajo de 0,93. La mayoría de las bacterias esporuladas no crecen a valores de $a_w < 0,93$; Por ejemplo, la germinación de esporas y el crecimiento de *Bacillus cereus* se previene con una a_w de 0,93, mientras que el límite inferior de a_w para el crecimiento y producción de toxinas de *Clostridium botulinum* es de 0,94 (Juneja y col., 2012; Montville y Matthews, 2013). La mayoría de levaduras y mohos alterantes de los alimentos pueden crecer a valores mínimos de a_w de 0,88 y 0,80, respectivamente, aunque las levaduras osmófilas y los mohos xerófilos podrían resistir niveles límites de a_w de 0,61 (Jay y col., 2005; Erkmen y Bozoglu, 2016).

Además de la a_w , otros factores limitantes como la sal y las sales nitrificantes también tienen un impacto importante. Los nitritos y nitratos tienen un efecto inhibitorio sobre los microorganismos alterantes y patógenos, lo que contribuye a prevenir el desarrollo de esporas de *Clostridium botulinum* (Arnau y col., 2003; Honikel, 2008; Toldrá y col., 2009). La difusión de sal en el interior del jamón curado ejerce una selección en la microbiota, favoreciendo los de tipo halófilo y halotolerante, como los lactobacilos y micrococáceas. Dentro de este último grupo son de destacar diferentes especies de los géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kocuria*, de gran importancia en el desarrollo de determinadas características organolépticas del jamón curado (Martínez-Onandi y col., 2019; Toledano y col., 2019). Así, los estafilococos, mediante su actividad nitrato reductasa, transforman el nitrato a nitrito el cual se reducirá a óxido nítrico, que se combina con la mioglobina formando nitrosomioglobina, responsable del color rojo de la carne curada. También participan en la inhibición del enranciamiento a través de su actividad antioxidante y en el desarrollo del sabor a través del catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada y el piruvato (Vermassen y col., 2016).

Durante la etapa de salado, los microorganismos procedentes de la sal colonizan la superficie del jamón. La microbiota predominante en la sal corresponde a los géneros *Staphylococcus* (60%) y *Micrococcus* (25%) y las especies mayoritariamente aisladas son *S. xylosus*, seguida de *M. lylae* y *S. equorum* (Cordero y Zumalacárregui, 2000). Durante la etapa de post-salado, la difusión de la sal a las zonas interiores y la pérdida de agua dan lugar a un predominio gradual de la microbiota halotolerante, incluidos algunos lactobacilos (Blesa y col., 2008). Microorganismos como las enterobacterias se reducirán hasta niveles indetectables durante el salado y post-salado (Vilar y col., 2000; Toledano y col., 2019). Además, en las etapas iniciales, las bajas temperaturas pueden favorecer el desarrollo de algunos microorganismos psicrófilos. Durante la fase de maduración-secado, las bacterias predominantes son los *Staphylococcus* spp. Coagulasa negativos, *Micrococcus* spp. y *Kocuria* spp. Entre ellos, los más prevalentes son *S. equorum*, *S. saprophyticus* y *S. succinus*, pero siendo *S. xylosus* la especie predominante (Cebrián y col., 2020).

En el jamón Ibérico, la mayoría (aproximadamente 93%) de los microorganismos aislados son también del género *Staphylococcus*, siendo *S. xylosus* seguido por *S. equorum* las especies predominantes (Martínez-Onandi y col., 2019). Las bacterias de ácido lácticas como *L. sakei*, *L. curvatus* y *P. pentosaceus*, pueden estar presentes en pequeñas proporciones (Toldrá y Aristoy, 2010).

Además, mohos y levaduras osmófilas son también microorganismos dominantes en el jamón curado y se encuentran en la superficie del producto (Toldrá y Aristoy, 2010). A niveles bajos de a_w , hasta 0,93, crecen bien varias especies de levadura en productos cárnicos curados, como *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula anomala* y *Candida seudotropicalis*. Por otro lado, los mohos xerotolerantes más comunes pertenecen al género *Eurotium*, que requieren un mínimo de 0,71 de a_w para su crecimiento (óptimo = 0,96) (Montville y Matthews, 2013).

Debaryomyces hansenii es la especie de levadura más frecuentemente aislada en el jamón Serrano e Ibérico, llegando a representar el 75% de todas las levaduras, seguida de *Candida zelandoides*. En el jamón de Parma se ha identificado un predominio de los géneros de levaduras *Torulopsis* y *Trichosporum*. En cuanto a los mohos, especies de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Eurotium* son los predominantes en el jamón, especialmente especies como *P. commune*, *P. aurantiogriseum* y *P. expansum*, aunque también se detectan miembros de los géneros *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Curvularia* y *Syncephalastrum* (Cocconcelli y Fontana, 2015; García y Selgas, 2015; Martínez-Onandi y col., 2019).

Algunos de estos mohos son peligrosos para la salud debido a su capacidad de producir micotoxinas, incluidas las aflatoxinas y ocratoxinas. Sin embargo, algunos microorganismos como *S. xylosum* han mostrado tener el potencial de reducir el crecimiento y la producción de micotoxinas (Cebrián y col., 2020). *D. hansenii* ha mostrado reducir la tasa de crecimiento y producción de aflatoxinas de *Aspergillus* toxigénicos (Peromingo y col., 2019). Asimismo, *D. hansenii* (Peromingo y col., 2018) y un cultivo conjunto de *D. hansenii* y *P. chrysogenum* (Cebrián y col., 2019) han mostrado reducir el crecimiento y producción de ocratoxina de *Penicillium* toxigénicos (*P. nordicum* y *P. verrucosum*).

La microbiota del jamón es importante porque contribuye en el desarrollo de las características sensoriales de este producto. Así, algunos mohos y levaduras contribuyen al sabor y aroma a través de la lipólisis y proteólisis, puesto que se encuentra en estas zonas superficiales del producto un incremento de los compuestos resultantes de estas reacciones. Por ejemplo, se ha descrito la actividad proteolítica del *P. chrysogenum* y *D. hansenii*. La microbiota fúngica forma una capa que protege de la luz la superficie del jamón, lo que inhibe el enranciamiento y mejora la estabilidad del color, además de originar un microclima superficial capaz de graduar las pérdidas de agua, evitando así un secado excesivo. *Micrococcus* puede también participa de la lipólisis y además puede producir una catalasa antioxidante que neutraliza los peróxidos responsables de enranciamiento. La pequeña tasa de lactobacilos también contribuye mínimamente a la proteólisis (Martin y col., 2002; Toldrá y Aristoy, 2010; Montville y Matthews, 2013; Martínez-Onandi y col., 2019).

Como se ha mencionado anteriormente, las condiciones físico-químicas particulares de los jamones curados no permiten el crecimiento de microorganismos patógenos e incluso el mismo procesamiento del producto puede ser letal para microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7, llegando a reducirlos hasta niveles indetectables (Reynolds y col., 2001; Portocarrero y col., 2002; Stollewerk y col., 2014; Montiel y col., 2020; Serra-Castelló y col., 2020). Solo *S. aureus* podría desarrollarse en el jamón curado, aunque sin posibilidad de producir toxinas (ICMSF, 2002).

Sin embargo, las operaciones de posprocesamiento como el deshuesado, corte y envasado pueden aumentar el riesgo de contaminación microbiana cruzada, comprometiendo la vida útil y la seguridad del producto. Durante estas operaciones, patógenos como *Listeria monocytogenes* pueden contaminar el jamón ya que se puede encontrar en las áreas de procesado (Martín y col., 2014; Morganti y col., 2016; Alía y col., 2020) y resistir las condiciones adversas de baja a_w . De hecho, en diversos estudios se ha detectado presencia de este microorganismo en un 2,3% de productos portugueses loncheados (Mena y col.,

2004), en un 2,7% de productos españoles loncheados (Gómez y col. 2015) y en un 2-4,1% de jamones curados deshuesados de Parma y San Daniele (Giovannini y col., 2007; Prencipe y col. (2012). Sin embargo, en todos estos estudios los recuentos en el producto no superaron 1 log UFC/g de *L. monocytogenes*.

1.1.8.- Presentaciones comerciales del jamón curado

La comercialización tradicional del jamón curado español, así como la de algunos jamones italianos, portugueses y chinos, se realiza en piezas enteras. En otros mercados, en cambio, el consumidor está poco familiarizado con el aspecto de las piezas enteras, reduciendo su aceptación y, por tanto, sus ventas (Mesías y col., 2013). Además, el estilo de vida actual influye sobre los hábitos alimentarios y preferencias del consumidor popularizando las presentaciones deshuesadas, en lonchas y trozos del jamón curado, envasados a vacío o en atmosferas modificadas (Arnau, 2014).

El deshuesado del jamón curado es la operación de posprocesamiento más importante en términos económicos. En 2018, España exportó 52 mil toneladas métricas (Tm) de jamón curado de las que el 77% estaban deshuesados, representando unas ventas de casi 350 millones de euros (Rodríguez, 2018; Mercasa, 2019). El deshuesado consiste en retirar la base ósea del pernil de forma mecánica o manual y con utillaje propio para este fin. El formato de jamón deshuesado tiene muchas ventajas comerciales: presenta un ciclo de producción más corto (debido al aumento de la velocidad de pérdida de agua y la penetración de la sal), permite un envasado más fácil, facilita la reducción de tamaño en trozos y lonchas, ofrece un buen rendimiento en la venta al por menor y posee una presentación más atractiva para los consumidores (Cilla y col., 2006; Zhang y col., 2019).

Normalmente, se procede al deshuesado del jamón al final de su procesamiento, para luego darle forma y envasarlo a vacío. Esta técnica tiene la ventaja de ser microbiológicamente más segura, pero durante esta práctica se perderá una parte del producto, lo que supone un menor rendimiento y acarrea pérdidas económicas. También se puede deshuesar a mitad del periodo de maduración, lo que facilita la extracción del hueso y la conformación de las piezas, pero requiere sellar las oquedades, mediante ceras o grasas, para evitar la difusión de la microbiota superficial del producto, además de ocasionar la pérdida de parte del producto ya procesado. Una tercera opción consiste en aplicar el procesamiento convencional de jamón curado a un pernil fresco deshuesado. A su vez, el deshuesado del pernil fresco puede realizarse “en frío” (convencional) o “en caliente” si la carne es deshuesada antes de enfriarse. Si bien la conformación del jamón puede favorecerse

durante las distintas fases del procesamiento, se requieren modificaciones notables de la fase de salazón y secado-maduración y el producto resultante no suele presentar una gran calidad. Estos inconvenientes se han superado con la reestructuración del pernil fresco deshuesado con ligantes en frío (Romero de Ávila, 2013; James y James, 2014; Zhang y col., 2019).

Tras el deshuesado, el jamón suele cortarse y/o perfilarse en sus diferentes variantes: “centro de jamón”, “jamón block”, “trozos”, etc., que se distribuyen en comercios especializados, donde se retiran de su envase y se cortan a demanda de los consumidores o bien se venden directamente en los supermercados, tanto para consumo interno como para exportación. El formato de “jamón block” es una pieza en forma de “ortopedro” que suele estar deshuesada y acondicionada para facilitar su corte a máquina y, a diferencia del formato “centro de jamón”, está perfilada, cortada y/o pulida y sin grasa exterior. También se pueden encontrar otros cortes como “medio centro” o “medio block”, o incluso trozos más pequeños como los de medio kilogramo (Estévez y col., 2015; Rodríguez, 2018).

En España, solo un 5,6% de los consumidores mostraron preferencia por el jamón curado en trozos pequeños frente a otros formatos (Mesías y col., 2013). Sin embargo, a nivel industrial, de charcuterías y para la exportación, estos formatos son preferidos no solo porque ofrecen una mayor facilidad del manejo para su envasado e incrementan el rendimiento cuando se someten a un posterior loncheado, sino también porque pueden congelarse cuando hay excedentes de producto. Se ha determinado que después de 24 meses de congelados, los trozos de jamón deshuesado pierden olor y sabor y cambia su textura, pero sin que represente una modificación de la calidad suficiente como para que los consumidores los rechazaran o mostraran una satisfacción menor en una compra hipotética (Cilla y col., 2006).

El loncheado es la operación por la que se obtienen lonchas de jamón mediante cortes inmediatos que se realizan al producto entero o a porciones del mismo, de forma manual o mecánica. En algunos países europeos este formato representa el 80% del consumo total de productos cárnicos curados (Mesías y col., 2013). En España, un estudio determinó que el 45,5% de los consumidores prefieren el formato de lonchas envasadas de jamón Serrano mientras que solo el 14% prefieren este formato para el jamón Ibérico (Mesías y col., 2009). Aun así, el formato de lonchas envasadas es uno de los de mayor crecimiento en España y que además permite al industrial obtener un mayor rédito económico (Rodríguez, 2018).

La comercialización de estas lonchas suele realizarse envasadas a vacío, con lo que mejora su preservación. No obstante, a diferencia del producto entero, tras la apertura del envase y eliminación del vacío, las lonchas podrían sufrir una pérdida de calidad (deterioro

por deshidratación y oxidación) condicionada por el manejo doméstico. Un formato que puede superar estos inconvenientes es el del “bloque de lonchas”. Este consiste en lonchear un bloque de jamón, superponer estas lonchas de forma que juntas recuerden la forma original del bloque y envasar a vacío. La principal ventaja es que el consumidor puede tomar lonchas del producto gradualmente desde un extremo, sin exponer al resto, lo que minimiza el deterioro por deshidratación y oxidación (Mesías y col., 2013).

En cuanto al envasado del jamón curado, el más común es a vacío, el cual consiste en la eliminación del oxígeno en contacto con el producto. Esto mejora la preservación pues obstaculiza el crecimiento microbiano, previene pérdidas de humedad y cambios oxidativos, proporcionando una mejor estabilidad al color, por lo que es ideal para la distribución y almacenamiento en frío de los productos (Cilla y col., 2006; Mesías y col., 2013). El envasado a vacío de jamones enteros (deshuesados o no) previene problemas de secado excesivo o ácaros además que favorece la homogeneización de la textura del producto. Asimismo, los trozos de jamón que van a ser congelados deben envasarse a vacío, porque de lo contrario podría afectarse su aroma debido a una merma de sustancias volátiles favorables (Gou y col., 2012; Arnau, 2014).

Sin embargo, el producto así envasado puede experimentar cierta deformación como consecuencia de la presión mecánica a la que se somete. Además, el envasado a vacío se ha relacionado con fenómenos de migración de agua, que podrían causar cambios de textura en las diferentes zonas del jamón (Cilla y col., 2006). Por otro lado, las lonchas envasadas a vacío suelen adherirse y presentar un aspecto encerado, inconvenientes que se superan envasando el producto en atmósferas modificadas que permite una presentación más natural (Gou y col., 2012).

El envasado en atmósferas modificadas consiste en reemplazar el aire por un gas o mezcla de gases en el interior de un envase que funciona como una barrera a la difusión gaseosa; en el envasado del jamón curado es muy empleada una mezcla de nitrógeno y CO₂. Es de gran utilidad para conservar lonchas de jamón, pues obstaculiza el crecimiento microbiano y retrasa el deterioro a la vez que conserva las propiedades físico-químicas del producto (Parra y col., 2010, 2012). Sin embargo, los consumidores han mostrado preferencia por lonchas de jamón Ibérico envasadas a vacío, a pesar de que presentan una valoración inferior del olor que las envasadas en atmósfera modificada (Ortiz y col., 2020). Además, el cambio brusco de temperatura en productos en atmósferas modificadas puede resultar en una condensación dentro del envase, causando un aumento local de la a_w (Gou y col., 2012; Arnau, 2014). El

principal inconveniente de las lonchas envasadas en atmósfera modificada es su menor vida útil frente a las envasadas a vacío (Parra y col., 2012).

1.1.9.- Producción, consumo y exportación del jamón curado español

La producción actual de jamones y paletas curadas en España es de casi 317 mil Tm. Esta producción ha crecido de manera sostenida desde el 2010 al 2018, incrementándose en un 26,3% durante este lapso. Específicamente, en el mercado interno durante el 2018, el consumo de jamones curados y las paletas fue de 2,1 kg/persona/año, lo que supuso un gasto de 29,8 euros/persona/año (Cruz, 2019; Mercasa, 2019). El jamón curado de cerdo blanco es el producto que más contribuye a esta producción, representando casi el 70% de todas las piezas comercializadas (Cruz, 2017; Mercasa, 2019).

Asimismo, las exportaciones del jamón español han crecido sostenidamente desde el 2008 hasta la fecha. En el 2010, por ejemplo, se exportaron algo más de 22 mil Tm, mientras que en el 2018 fueron más de 52 mil Tm (aproximadamente 9 millones de piezas) (Cruz, 2017; Rodríguez, 2018; Mercasa, 2019). Este crecimiento ha continuado incluso durante primer el trimestre del 2020, pese a la caída de las ventas a la restauración a causa del estado de alarma por el SARS-CoV-2. Las exportaciones del jamón curado en este trimestre han mostrado un crecimiento del 6,4% respecto al mismo periodo en el 2019, con ventas que casi alcanzaron los 100 mil euros (Cruz, 2020).

El jamón curado se ha exportado en los últimos años a un total de 134 países, siendo entre el 82 y el 84% de ellos países de la Unión Europea, y el 16-18% restante a países como México, Estados Unidos, Australia y Chile, entre otros (Rodríguez, 2018). Los principales países importadores del jamón curado español son Francia, seguido de Alemania, Portugal, Italia, y en menor medida Reino unido y Holanda. En el 2018, países terceros como México y Estados unidos, representaron el séptimo y décimo lugar de destino, respectivamente (Mercasa, 2019). Sin embargo, durante el primer trimestre del 2020, se detectó una reducción en las ventas a países europeos como Francia, Alemania e Italia, mientras que México se convirtió en el quinto destino, con ventas que rondaban los 4 millones de euros, seguido de Estados Unidos (el sexto destino) con ventas de 3,8 millones de euros (Cruz, 2020).

1.2.- Jamón curado reestructurado

El término “producto reestructurado” surgió en los 70s para referirse a los productos fabricados a partir de porciones cárnicas, que podían ser trozos o incluso finas pastas. Así,

la reestructuración es el procedimiento mediante el cual se unen porciones de carne de diverso tamaño a través de compuestos ligantes, para formar una masa cohesiva que se asemeja a una pieza cárnica íntegra, produciendo las llamadas piezas cárnicas “reestructuradas”, “formadas” o “pegadas”. El objetivo de la reestructuración es obtener un mayor rendimiento en la industria y un producto más atractivo para el consumidor. Consecuentemente, el reestructurado más popular es el elaborado con porciones cárnicas de bajo valor y recortes de difícil comercialización que se ligan y moldean para imitar el aspecto de un músculo íntegro. Pero también se reestructuran cortes enteros sin hueso y que comprenden un número de músculos íntegros o secciones musculares de animales como el cerdo, oveja y bovinos (Farouk, 2010; Romero de Ávila, 2013; Sorapukdee y Tangwatcharin, 2018).

La elaboración de un producto cárnico reestructurado se consigue gracias a un elemento de “unión” que genera interacciones, en caliente o en frío, entre las porciones cárnicas, dando consistencia al producto. La reestructuración en frío, que requiere de los llamados agentes de ligazón o cohesión, gelificantes o aglutinantes, es la que se ha ensayado con éxito en la obtención de jamones curados reestructurados.

1.2.1.- Sistemas de reestructuración

Los métodos de reestructuración pueden dividirse en dos grandes sistemas:

- Reestructuración por calor: En esta metodología las proteínas miofibrilares se extraen por el efecto combinado de la sal, el fosfato y la acción mecánica, para formar una matriz miofibrilar de unión que luego se gelifica mediante calor. Para incrementar la consistencia final se pueden agregar otros componentes como polisacáridos y proteínas de lactosuero y caseínas, proteínas vegetales de soja, garbanzo, lenteja, guisante, arroz y tapioca, almidón de patata, carragenina, gluten, clara de huevo en polvo y cruda, gelatina, etc. El mayor inconveniente de esta forma de proceder es que el producto tiene una consistencia muy frágil antes del tratamiento térmico, por lo que debe comercializarse precocido y/o congelado (Modi y col., 2004; Serdaroglu y col., 2005; Farouk, 2010; Baugreet y col., 2016).
- Reestructuración en frío: Esta metodología no precisa de tratamiento térmico y utiliza las propiedades gelificantes de algunos agentes de ligazón en frío, de los que se hablará de forma detallada a continuación.

1.2.2.- Agentes de ligazón en frío

Son los aglutinantes de elección para reestructurar piezas cárnicas cuyo procesamiento convencional no incluye un tratamiento térmico, como es el caso del jamón curado o la reestructuración del pernil deshuesado fresco (Romero de Ávila, 2013). También, se ha descrito su uso para la reestructuración de trozos pequeños de carne de cerdo que, tras su pegado y moldeado, se someten al procesamiento del jamón curado (Sadeghi-Mehr y col., 2016). Entre los agentes de ligazón en frío más importantes caben mencionar los alginatos, la transglutaminasa y los derivados del plasma sanguíneo.

Alginatos

Son polisacáridos extraídos de las algas marinas que pueden utilizarse en la industria de alimentos como aglutinantes, espesantes, gelificantes y en la formación de films. En sistemas de reestructuración suelen usarse en forma de sales junto con una fuente de calcio, un acidulante y un secuestrante. Los geles se forman cuando los iones calcio se introducen en una solución de alginato (Boles, 2011; Qin y col., 2018).

Transglutaminasa

Se trata de una enzima ampliamente distribuida en la naturaleza (microorganismos, plantas y animales invertebrados, aves, peces, mamíferos y humanos) que se usa en la industria cárnica por sus propiedades gelificantes. La reacción que cataliza es de acil-transferencia o entrecruzamiento de las cadenas laterales (residuos) de glutamina (su grupo γ -carboxiamida) y lisina (su grupo ϵ -amino) de proteínas y péptidos para formar enlaces isopeptídicos; aunque puede catalizar esta misma reacción con una variedad de aminas primarias en lugar de lisina. La transglutaminasa también participa en la desaminación de los residuos de glutamina con intervención de moléculas de agua como receptoras del grupo acilo (Santhi y col., 2017; Duarte y col., 2020).

Los productos ACTIVATM (Ajinomoto Co., Inc.) son preparados comerciales de transglutaminasa microbiana y se utilizan para la reestructuración de carne (Farouk, 2010; Jira y Schwägele, 2017). Varios autores han descrito el uso de esta enzima en la reestructuración de carne de cerdo para su procesamiento como jamón curado, ya sea a partir de pernils deshuesados (Romero de Ávila y col., 2010; Zhang y col., 2019), cubos de carne (Sadeghi-Mehr y col., 2016; Jira y col., 2017) o una mezcla de cubos de carne y grasa (Hui y col., 2017).

Agentes de ligazón derivados del plasma sanguíneo

La sangre se compone de dos fracciones: la soluble o plasma (60-70%) y la insoluble o porción celular. El plasma es un líquido claro y amarillento constituido principalmente de agua (91%) y de proteínas (6-8%), esencialmente albúminas (50-60%), globulinas (40-50%) y fibrinógeno (1-5%). Estas proteínas tienen propiedades tecnológicas relevantes como gelificante, capacidad de retención de agua, solubilidad, emulsionante, ligante de grasa y espumante, para su empleo en el procesamiento de alimentos (Toldrá y col., 2016; Ockerman y col., 2017).

El proceso de obtención del plasma sanguíneo comienza con la recogida higiénica de sangre en el matadero. La coagulación de la sangre es inhibida por la adición de ácido cítrico (0,7-0,8%). La sangre se almacena en frío (3°C) hasta llegar a la planta de producción. Luego, las células sanguíneas y el plasma se separan por centrifugación. El plasma se separa por medios físicos en plasma enriquecido con fibrinógeno y plasma desfibrinado, del cual se puede separar la protrombina usando cromatografía de intercambio iónico (EFSA, 2015).

El plasma se utiliza ampliamente en la industria alimentaria porque posee un sabor neutro y está desprovisto del color oscuro asociado a los glóbulos rojos. Por ello no solo ha sido utilizado como ligante en productos cárnicos, sino también como sustituto del huevo en panadería, en pastas enriquecidas con proteínas, sustituto de la grasa, o incluso de polifosfatos o caseinatos (Hurtado y col., 2011; Ofori y Hsieh, 2016).

Sistema fibrinógeno-trombina

El fibrinógeno es una glicoproteína compuesta por un dímero de tres pares de cadenas polipeptídicas ($A\alpha$, $B\beta$ y γ), que están unidas entre sí por enlaces disulfuro en la parte central de la molécula, donde convergen los extremos amino de estas cadenas proteicas. Durante el proceso de reestructuración de la carne, los fibrinopéptidos A y B son eliminados del extremo amino de las cadenas α y β por acción de la proteasa trombina. En consecuencia, el fibrinógeno soluble se convierte en monómeros de fibrina, que forman protofibrillas o agregados de fibrina debido a la aparición de interacciones iónicas. Posteriormente, estas fibras se entrecruzan entre sí, formando una red extensa (red tridimensional de coágulos de fibrina), y con el colágeno mediante enlaces covalentes. Por lo tanto, este sistema de fijación en frío tiene una gran ventaja si se utiliza en la carne de músculo que contiene más colágeno (Jira y Schwägele, 2017; DeAnglis y col., 2017; Horbett, 2018).

Fibrimex® (Sonac BV) es un producto comercial que se basa en la formación de coágulos de las proteínas plasmáticas fibrinógeno y trombina y que puede obtenerse a partir de la

sangre de bovinos y porcinos. Se puede usar espolvoreando directamente o en dilución con agua, formando una solución aglutinante que puede aplicarse a la superficie de los trozos de carne (Ofori y Hsieh, 2016; Toldrá y col., 2016; Mora y col., 2019). Romero de Ávila y col. (2014b) describieron que este producto puede utilizarse para reestructurar el pernil de cerdo deshuesado en fresco para elaborar jamón curado, ya que establece enlaces cruzados estables en las fases de salazón y secado en sistemas modelo de jamón curado. Sin embargo, para optimizar el proceso, se requirió tratar previamente la superficie de la carne mediante la inmersión en una solución salina con sales de curado y un envasado a vacío para favorecer el pegado de la pieza.

Plasma sanguíneo enriquecido con fibrinógeno

El plasma sanguíneo enriquecido con fibrinógeno (PP) es un producto que mantiene la funcionalidad de sus proteínas, incluidas las capacidades de gelificación y ligazón, y no produce cambios en el color y sabor de los productos cárnicos. El PP tiene como componente esencial el fibrinógeno y ejerce sus propiedades ligantes mediante el mecanismo de la cascada de coagulación sanguínea (Ofori y Hsieh, 2016; Romero de Ávila y col., 2014a).

El PP contiene una mezcla compleja de proteínas, como la albúmina sérica y la globulina, y una concentración superior de fibrinógeno que representaría al menos la mitad del contenido total de proteínas (Jira y Schwägele, 2017). El PP no contiene trombina ya que esta suele estar disponible en cantidades suficientes en la carne fresca como para producir aglutinación en contacto con fibrinógeno. El contenido típico de protrombina en la carne es de 0,1-0,9 mg/kg, procedente de la sangre residual, por lo que a partir de ella se pueden formar hasta 0,4 mg de trombina/kg tras el sacrificio (EFSA, 2015). Además, el fibrinógeno también puede interactuar con la albúmina, y esta a su vez con las globulinas (dos componentes mayoritarios del plasma) contribuyendo, mínimamente, al sistema de ligazón (Toldrá y col., 2019).

Se encuentran presentaciones comerciales de PP en polvo/deshidratado, como el Plasma Powder FG y FG+ (de Sonac BV). El secado por atomización es la técnica más empleada a escala industrial para la deshidratación de soluciones proteínicas y es el que se utiliza comúnmente para procesar el plasma a fin de obtener agentes aglutinantes. Esta técnica implica el tratamiento de las proteínas de la sangre con temperaturas de entre 140 y 210°C durante cortos períodos de tiempo (menos de 2-3 s). Aunque las altas temperaturas podrían modificar la estructura proteica, este método ha sido optimizado para evitar los efectos negativos en su funcionalidad (Toldrá, 2019).

Este producto es el agente de ligazón en frío que mejor ha resultado en la elaboración de jamón curado deshuesado (Romero del Ávila, 2013). El PP aplicado directamente en el pernil de cerdo deshuesado en fresco estableció interacciones suficientes para conformar la pieza y recuperar su forma original, pudiendo someterse satisfactoriamente al procesado de elaboración convencional de jamón curado (Romero de Ávila y col., 2014b).

1.2.3.- Legislación y etiquetado de los productos cárnicos reestructurados

El uso de los agentes de ligazón, además de las numerosas ventajas tecnológicas, también supone una indudable ventaja económica. Por ejemplo, la sustitución del 2% de carne magra por plasma sanguíneo puede aumentar el rendimiento en un 4-5% (Stader y col., 2019). Este uso podría ser considerado fraudulento si la incorporación de estos ligantes no cumple con las regulaciones de cada país. En la Unión Europea, por ejemplo, la mezcla de fibrinógeno y trombina no es un aditivo alimentario autorizado (Comisión Europea, 2008), mientras que en Estados Unidos su uso está permitido en una concentración máxima del 10% (USDA/FSIS, 2005). En general, todos los productos reestructurados deberían etiquetarse como tales, aunque su declaración en la lista de ingredientes dependerá de la legislación específica.

En Estados Unidos los productos reestructurados tienen que ser etiquetados como tales para distinguirlos de otros productos, y el agente aglutinante debe ser incluido en la declaración de ingredientes (CFR, 2012). De forma similar, en la Unión Europea, los productos reestructurados deben llevar la siguiente indicación: “elaborado a partir de piezas de carne” o “elaborado a partir de piezas de pescado” (Comisión Europea, 2011). Sin embargo, en la Unión Europea, los requisitos de la declaración de ingredientes en el etiquetado varían en función del tipo de agente de ligazón utilizado. Así, los geles de alginato deben regularse como aditivos alimentarios e incluirse en la lista de ingredientes, pero otros, como la transglutaminasa, se consideran componentes auxiliares de la elaboración y pueden omitirse en la lista de ingredientes (Comisión Europea, 2008).

1.3.- *Listeria monocytogenes*

1.3.1.- Antecedentes históricos

El género *Listeria* recibe este nombre en honor al médico cirujano británico Joseph Lister (1827-1912), debido a sus grandes contribuciones a la microbiología. Tras 12 años de la muerte de Lister, un grupo de microbiólogos de la Universidad de Cambridge, Murray,

Webb y Swann, descubrieron una bacteria que ocasionaba muerte súbita en conejos y la bautizaron como *Bacterium monocytogenes*. En 1927, James Pirie, bacteriólogo y geólogo escocés, identificó la misma bacteria en un roedor en Kenia y lo llamó *Listerella hepatolytica* en homenaje a Lister. Murray y Pirie se dieron cuenta de que ambos grupos estaban tratando con la misma especie y combinaron los nombres para llamarla *Listerella monocytogenes*. En 1940, por razones taxonómicas, Pirie propuso el nombre *Listeria monocytogenes* (Hof, 2003; Rocourt y Buchrieser, 2007; Wagner y McLauchlin, 2008).

El primer diagnóstico confirmado de listeriosis en un humano fue realizado en París, en un soldado que sufría de meningitis a causa de un "difteroides" aislado del líquido cefalorraquídeo al final de la Primera Guerra Mundial pero la identificación retrospectiva de este agente como *L. monocytogenes* no fue publicada hasta 1942. En 1929, en Dinamarca, Nyfeldt aisló *L. monocytogenes* de hemocultivos de pacientes con mononucleosis y, en 1936, Burn, en Estados Unidos, estableció la listeriosis como causa de la sepsis y la meningitis en los recién nacidos y adultos, respectivamente (Wagner y McLauchlin, 2008; Ryser y Buchanan, 2013).

Con el desarrollo de potentes medicamentos inmunosupresores, como los corticoides y la quimioterapia, entre 1950 y 1960, la listeriosis se asoció a pacientes con sistemas inmunológicos comprometidos. En 1967, Blendin y Szatalowicz informaron de que se habían documentado 731 casos de listeriosis humana entre 1933 y 1966 e indicaron que productos vegetales como la lechuga u otras verduras frescas contaminadas con *L. monocytogenes* podrían ser responsables de algunos de estos casos. Sin embargo, el primer caso de listeriosis transmitida por los alimentos no se notificó hasta 1953, cuando se vinculó el nacimiento de gemelos muertos con el consumo por parte de la madre de leche cruda de una vaca con mastitis listerial (FAO/WHO, 2004). El primer brote documentado asociado a este microorganismo ocurrió en 1979, mientras que el primer brote confirmado asociado con el consumo de alimentos, data de 1981 (Ryser y Buchanan, 2013; Hadjilouka y col., 2014).

Actualmente, *L. monocytogenes* es una de las bacterias patógenas más documentadas y la listeriosis una de las enfermedades infecciosas mejor estudiadas, al menos en modelos animales. En 1987 se identificaron los primeros genes de virulencia de *L. monocytogenes* y en el 2001 se obtuvo la secuencia completa de su genoma. Así, en los últimos 33 años, *L. monocytogenes* ha surgido como un sistema modelo bacteriano excepcional en la biología de la infección. La investigación sobre esta bacteria ha permitido comprender el mecanismo por el que las bacterias se habitúan a los huéspedes mamíferos, invaden las células eucariotas, se movilizan intracelularmente, interfieren con las funciones celulares del

huésped y se propagan a las células vecinas. También ha contribuido a desvelar características de las vías normales de las células huéspedes y funciones insospechadas de proteínas celulares previamente conocidas (Rolhion y Cossart, 2017).

No obstante, *L. monocytogenes* sigue ocasionando problemas serios en la salud animal y humana y es probablemente el patógeno que causa mayor preocupación a la industria de los alimentos, a las autoridades sanitarias y a los consumidores ya que está ampliamente distribuida en los entornos de la industria agroalimentaria y su principal vía de transmisión a los seres humanos es precisamente a través de los alimentos, especialmente los alimentos listos para el consumo llamados también RTE (del inglés, *ready to eat*) (Ferreira y col., 2014).

1.3.2.- Características generales

Listeria monocytogenes es un patógeno intracelular facultativo que pertenece a la familia *Listeriaceae*. Se trata de un bacilo con forma de varilla, pequeño (0,5-2 μm x 0,5 μm , diámetro x longitud), que no presenta cápsula ni produce esporas. Posee de 1 a 5 flagelos peritricos que le confiere un movimiento de rotación que es óptimo entre 20 y 28°C, pero es inmóvil a 37°C (Gründling y col., 2004; Montville y col., 2012; Batt, 2014; Erkmen y Bozoglu, 2016)

Con respecto a su metabolismo, *Listeria* es Gram (+), catalasa (+), oxidasa (-), anaerobio facultativo, no produce sulfuro de hidrógeno, fermenta la glucosa y la ramnosa produciendo ácido láctico sin gas, pero no puede fermentar la xilosa; además presenta reacción positiva al rojo de metilo y a la prueba de Voges-Proskauer. Crecen muy bien en agar sangre, donde producen una β -hemólisis incompleta, y suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas (Lorber, 2007; Batt, 2014; Erkmen y Bozoglu, 2016; Orsi y Wiedmann, 2016).

A este género pertenecen diecisiete especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. aquatica*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. grandensis*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. marthii*, *L. newyorkensis*, *L. riparia*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis*, y *L. welshimeri*. Sin embargo, solo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son consideradas patógenos de humanos y animales, respectivamente (Orsi y Wiedmann, 2016).

L. monocytogenes es responsable de una toxiinfección alimentaria denominada listeriosis, de la que se hablará más adelante (apartado 1.3.5). Esta especie puede tipificarse molecularmente mediante diferentes técnicas como la electroforesis en gel de campo

pulsado, pero el serotipado es el método principal utilizado para tipificar *L. monocytogenes* y además permite clasificar esta especie en linajes filogenéticos (Jordan y col., 2015)

El serotipado de *L. monocytogenes* permite identificar las variaciones de sus proteínas de superficie: los antígenos somáticos (O) y los flagelares (H). Basándose en la detección de estos antígenos, mediante reacciones de aglutinación usando antisueros polivalentes y monovalentes, se han reconocido 13 serotipos de *L. monocytogenes* que se identifican alfanuméricamente: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7 (Ryser y Buchanan, 2013; Meloni, 2015; Burall y col., 2017).

Los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b son los predominantes en las infecciones en humanos, causando más del 90% de los casos, siendo el 4b el responsable de la mayoría de ellos (Orsi y col., 2011; Ryser y Buchanan, 2013). Los serotipos 1/2a, 1/2b y 1/2c son los más frecuentemente aislados en los alimentos o en el entorno de producción de estos (Meloni, 2015). Los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b han sido identificados con mayor frecuencia en mataderos y las plantas procesadoras del cerdo Ibérico (Ortiz y col., 2010), plantas de elaboración (D'Arrigo y col., 2020) y posprocesamiento (Alía y col., 2020) de jamón curado español.

Además, *L. monocytogenes* puede ser clasificado en tres linajes filogenéticos dependiendo de su serotipo: El linaje I contiene los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e y 7; el linaje II incluye los serotipos 1/2a, 1/2c, 3a y 3c; el linaje III incluye a los serotipos 4a, 4c y 4b, aunque algunas cepas de estos tres serotipos también han sido incluidas en el denominado linaje IV (Ragon y col., 2008; Ward y col., 2008; Velge y Roche, 2010; Orsi y col., 2011; Burall y col., 2017).

1.3.3.- Crecimiento y supervivencia

En relación a su susceptibilidad a agentes físicos y químicos, en general es un microorganismo que se adapta muy bien a condiciones adversas. Es psicrotrofo, siendo capaz de crecer lentamente por debajo de 5°C, y de sobrevivir durante el almacenamiento en congelación. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37°C, pero puede crecer en el intervalo 0-45°C, y muere por encima de 50°C. *L. monocytogenes* puede crecer en un intervalo de pH de 4,4-9,6, siendo el pH 7 el de óptimo crecimiento. A valores inferiores a 4,3, las listerias pueden sobrevivir, pero no se multiplican (Van der Veen y col., 2008; Montville y col., 2012; Lianou y col., 2017).

Respecto a la a_w , su óptimo de crecimiento ocurre a valores $\geq 0,97$. Para la mayoría de las cepas, la a_w mínima para el crecimiento es de 0,92, aunque esta bacteria puede sobrevivir

durante largos períodos a valores de a_w tan bajos como 0,83. Asimismo, puede tolerar altas concentraciones de sal, siendo capaz de crecer en un 10-12% de NaCl, y sobrevivir por largos periodos en concentraciones de hasta 18-20% (O’Byrne y Karatzas, 2008; Montville y col., 2012; Ryser y Buchanan, 2013; Erkmén y Bozoglu, 2016).

1.3.4.- Factores de virulencia y resistencia al estrés de *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es una bacteria capaz de adaptarse y desarrollarse en ambientes muy variados y adversos y esto lo logra a través de una compleja regulación de la expresión de sus genes de respuesta al estrés (Gandhi y Chikindas, 2007; Miner y col., 2007; Bucur y col., 2018). Así, mediante la expresión de sus genes de respuesta al estrés, *L. monocytogenes* consigue tolerar condiciones como la escasez de nutrientes del suelo, algunos tratamientos aplicados durante el procesado y conservación de los alimentos o el bajo pH del estómago (Freitag y col., 2009; Strawn y col., 2013). Por su parte, requiere de la expresión de sus genes de virulencia para superar cada paso del sofisticado ciclo celular infeccioso. En la Tabla 2, elaborada a partir de lo descrito por Olesen y col. (2009), Vera y col. (2013), Pizarro-Cerdá y Cossart (2019) y Pombinho y col. (2020), se recogen los factores de virulencia más importantes que participan en este ciclo intracelular, así como los genes que los codifican.

Tabla 2. Principales genes que codifican factores de virulencia y su rol más importante durante el ciclo infeccioso de *Listeria monocytogenes*.

Gen	Producto del gen	Rol en el ciclo infeccioso
<i>actA</i>	Factor de polimerización de la actina (ActA)	Participa en la adhesión celular y en la movilidad intra e intercelular
<i>ami</i>	Amidasa autocatalítica (Ami)	Participa en adhesión e invasión celular
<i>hly</i>	Listeriolisina (LLO)	Lisis del fagosoma
<i>hpt</i>	Proteína transportadora de hexosa fosfato (Hpt)	Requerido para el crecimiento intracelular
<i>iap</i>	La proteína asociada a la invasión celular (P60)	Invasión y motilidad intracelular basada en el ensamblaje de actina
<i>inlA</i>	Internalina A (InlA)	Participa en la adhesión e invasión celular
<i>inlB</i>	Internalina B (InlB)	Participa en la adhesión e invasión celular
<i>inlC</i>	Internalina C (InlC)	Formación de protrusiones
<i>plcA</i>	Fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC)	Contribuye a la lisis y escape del fagosoma (primario)
<i>plcB</i>	Fosfatidilcolina fosfolipasa C (PC-PLC)	Contribuye a la lisis y escape del fagosoma (secundario)
<i>mpl</i>	Precursor zinc metaloproteasa (Mpl)	Procesa al precursor PC-PLC a su forma madura
<i>prfA</i>	Factor regulador positivo A (PrfA)	Requerida para la expresión de los genes de virulencia

En la Figura 3, elaborada usando información de diversas fuentes (Pucciarelli y col., 2007, Freitag y col., 2009, de las Heras y col., 2011, Pizarro-Cerdá y col., 2012, y Radoshevich y Cossart, 2018), se muestra las etapas de este ciclo intracelular.

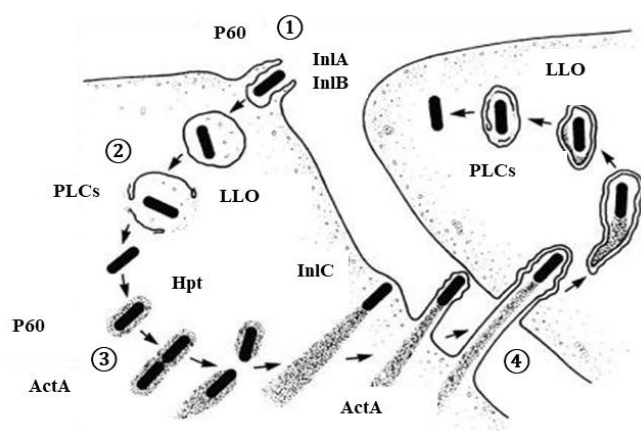


Figura 3. Etapas del ciclo de vida intracelular de *Listeria monocytogenes*. Entre paréntesis se muestran los principales factores de virulencia que participan en estas fases: 1: Adhesión e invasión celular (InlA, InlB y P60), 2: Escape del fagosoma (LLO y PLCs), 3: Desarrollo y movimiento intracelular (ActA, P60 y Hpt), 4: Propagación intercelular (InlC y ActA).

Genes de virulencia de *Listeria monocytogenes*

La expresión de la mayoría de los genes de virulencia esenciales para el ciclo intracelular de *L. monocytogenes* están regulados por la proteína PrfA. Fuera de una célula huésped, PrfA se encuentra siempre en un estado de baja actividad. Dentro del huésped, la PrfA se activa e induce la expresión de genes de virulencia, marcando así su transición de saprófito ambiental a parásito citosólico (de las Heras y col., 2011; Gaballa y col., 2019).

El primer paso de la infección por *L. monocytogenes* es su adhesión e invasión celular. En esta fase tienen una participación primordial las internalinas InlA y InlB que, tras unirse con sus respectivos receptores, conducen a la internalización bacteriana induciendo la fagocitosis (Bierne y col., 2007; Chen y col., 2011; Pizarro-Cerdá y col., 2012). Asimismo, el factor P60 es esencial en la capacidad de *L. monocytogenes* de adherirse e invadir a cualquier tipo de célula (Pucciarelli y col., 2007; Camejo y col. 2011). Además, P60 es el único factor de virulencia mencionado en este apartado que es independiente de la regulación de PrfA (Vázquez-Boland y col., 2001). Otros factores como LLO, Ami y ActA pueden cumplir funciones de soporte en esta etapa (Rolhion y Cossart, 2017; Radoshevich y Cossart, 2018; Pizarro-Cerdá y Cossart, 2019)

El siguiente paso es crucial y consiste en formar poros la membrana del fagosoma y permitir el escape de *Listeria* al citoplasma celular. Para ello intervienen LLO, Mpl y las fosfolipasas PLCs (PI-PLC y PC-PLC) (Goldfine y Marquis, 2007; Pushkareva y

Ermolaeva, 2010; Maury y col., 2017). Dentro del citoplasma, *L. monocytogenes* se multiplica rápidamente nutrido por los metabolitos derivados de las células huésped, con ayuda del sistema de captación de azúcar Hpt y la InlC, entre otros (Freitag y col., 2009; de las Heras y col., 2011; Pizarro-Cerdá y Cossart, 2019). También se conoce que la acción conjunta de ActA e InlC induce daños en el ADN y retrasa el ciclo de la célula huésped en beneficio propio (Costa y col., 2020).

La motilidad citoplasmática de *L. monocytogenes* ocurre por medio de la polimerización de la actina gracias a la acción de ActA y P60. La propagación intercelular de *L. monocytogenes* requiere de este mecanismo, pero también de la acción de InlC ya que reduce la tensión cortical de la membrana plasmática, favoreciendo la capacidad de las bacterias móviles para deformar la membrana plasmática y formar protuberancias como pseudópodos (listerópodos) que invaden las células vecinas (Pilgrim y col., 2003; Freitag y col., 2009; Rajabian y col., 2009; de las Heras y col., 2011). En la nueva célula, la vacuola de doble membrana es lisada por LLO y PLCs, repitiendo así el ciclo (Figura 3).

Genes de resistencia al estrés de *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes posee estrategias para sobrevivir a condiciones desfavorables como los entornos hostiles. Un mecanismo importante que actúa a nivel de la regulación transcripcional y que permite la expresión de un conjunto específico de genes de respuesta al estrés, está mediado por sus factores de transcripción sigma alternativos (σ^A , σ^B , σ^C , σ^H y σ^L). El más importante es el σ^B (SigB), codificado por el gen *sigB*, que regula directamente la expresión de genes implicados en la respuesta ante condiciones ambientales adversas (Chaturongakul y col., 2008; Toledo-Arana y col., 2009; NicAogain y O'Byrne, 2016) y del tracto digestivo (Gahan y Hill, 2005; Kazmierczak y col., 2006), la formación de biofilms (Dorey y col., 2019), la virulencia y homeostasis de *L. monocytogenes* (Liu y col., 2017).

Fuera del huésped y en ausencia de estrés, el σ^B se encuentra inactivo, pero frente a condiciones ambientales adversas, desencadena el denominado mecanismo de respuesta general al estrés con el cual puede expresar un gran conjunto de genes en forma simultánea. El σ^B contribuye en gran medida a la supervivencia y colonización bacteriana en las duras condiciones que se dan en el tracto gastrointestinal. Su intervención es menos esencial durante la invasión celular, aunque su contribución no está aún bien definida y es posible que pueda estar involucrado en respuestas al estrés inducido por el huésped (O'Byrne y Karatzas, 2008; Bucur y col., 2018; Gaballa y col., 2019). Además, σ^B activa directamente la transcripción de los genes *inlA*, *inlB* y *prfA* y es a través de este último que puede activar

indirectamente muchos otros genes de virulencia (Chaturongakul y col., 2008; Kazmierczak y col., 2003, 2006; Ollinger y col., 2009; Liu y col., 2017).

1.3.5.- Listeriosis

L. monocytogenes causa en los seres humanos la enfermedad llamada listeriosis, una toxiinfección alimentaria poco frecuente en la población general en quienes normalmente suele presentarse de forma imperceptible o en su forma clínica más habitual que es la listeriosis gastrointestinal no invasiva. Sin embargo, puede causar una enfermedad con síntomas graves (listeriosis invasiva) en algunos grupos poblacionales de alto riesgo como son los individuos inmunocomprometidos debido a algunas patologías subyacentes o a una terapia inmunosupresora, fetos en desarrollo, recién nacidos, lactantes, mujeres embarazadas y ancianos. En estos individuos susceptibles, *L. monocytogenes* puede provocar algunas afecciones clínicas como materno-neonatal (infección intrauterina, aborto espontáneo, muerte fetal intrauterino) y gastroenteritis febril, y en casos graves puede provocar una infección del sistema nervioso central (meningitis, encefalitis, meningoencefalitis), septicemia e incluso la muerte (Lecuit, 2007; Painter y Slutsker, 2007; Lamont y col., 2011). En la Unión Europea, las septicemias fueron las formas clínicas más comunes de infecciones invasivas por *L. monocytogenes* (71,8%), seguidas de las infecciones del sistema nervioso, específicamente meningitis (19,4%) (Ricci y col., 2018).

Los alimentos contaminados con *L. monocytogenes* constituyen el principal vehículo de transmisión de la listeriosis humana, en especial los alimentos RTE. De hecho, se calcula que el 99% de los casos de listeriosis humana son transmitidos por alimentos (Scallan y col., 2011). Se estima que la dosis aproximada de *L. monocytogenes* causante de enfermedad en el 10 y 90% de la población es de 10^7 y 10^9 UFC, respectivamente, en huéspedes sanos y de sólo 10^5 y 10^7 UFC, respectivamente, en individuos con alto riesgo de infección (FAO/OMS, 2004; Bortolussi, 2008; Ryser y Buchanan, 2013). Sin embargo, esta dosis infectiva depende de otros factores además del estado inmunológico del huésped, por ejemplo, el tipo de alimento consumido, la frecuencia de su consumo, la cantidad ingerida de microorganismos y el grado de virulencia de la cepa en particular.

Más del 90% de los casos de listeriosis invasiva son atribuibles a dosis superiores a 10^5 UFC por ración. Esto correspondería a una concentración media de *L. monocytogenes* en estos alimentos superior a 2000 UFC/g en el momento del consumo, asumiendo que el tamaño medio de la porción sea de 50 g. En cambio, si consideramos la ingestión de 100 g de un producto contaminado con 100 UFC/g (10^4 UFC de *L. monocytogenes*), se puede

estimar que ocurriría un caso de listeriosis tras 20 y 200 millones de exposiciones en la población susceptible y no susceptible, respectivamente, basado en lo descrito por la FAO/OMS (2004). Asimismo, un tercio de los casos ocurrirían debido a que la bacteria encontraría las condiciones necesarias para multiplicarse durante la fase de consumo, además favorecido por una mala conservación o manipulación de estos alimentos. En general se considera que los casos epidémicos de listeriosis suelen transmitirse por alimentos que contienen más de 100 UFC/g (Ryser y Buchanan, 2013; Ricci y col., 2018).

No obstante, una pequeña proporción de casos podría estar asociada a niveles más bajos de este patógeno, específicamente en alimentos RTE de mayor frecuencia de consumo y que tienen una mayor prevalencia de *L. monocytogenes* pero menor concentración. Así, en Estados Unidos, se produjo un brote de listeriosis con casos en personas susceptibles por consumo de helados con un nivel de contaminación muy bajo, del orden de 8 UFC/g (Buchanan y col., 2017). Asimismo, se observó que las salchichas Frankfurters implicadas en un brote de listeriosis en el año 1998, en Estados Unidos, contenían 0,3 UFC/g de *L. monocytogenes*. Sin embargo, en estos casos no puede descartarse la posibilidad de que hayan sido resultado de una exposición a dosis mayores, teniendo en cuenta otros factores como, por ejemplo, una contaminación adicional durante la preparación ulterior (Montville y col., 2012; Pouillot y col., 2016; Ricci y col., 2018).

1.3.5.1.- Incidencia y mortalidad

La listeriosis supone una proporción muy pequeña de todas las enfermedades debidas a patógenos transmitidos por los alimentos (Figura 4). Se trata de una enfermedad relativamente rara, con 0,1 a 10 casos por cada millón de personas al año, según los países y regiones del mundo (WHO, 2018a). Según los últimos informes, en el 2018 la incidencia en Europa fue de 0,47 casos por cada 10^5 habitantes, mientras que en Estados Unidos fue de 0,3 por cada 10^5 habitantes durante el 2019 (EFSA/ECDC, 2019; Tack y col., 2020).

Sin embargo, basándonos en criterios clínicos, la listeriosis es la más grave de las enfermedades transmitidas por alimentos ya que más del 90% de los casos resultan en hospitalizaciones y se asocia con una alta tasa de mortalidad, a diferencia de otras enfermedades de transmisión alimentaria, como la salmonelosis, que rara vez ocasionan la muerte de la persona afectada. En general, la mortalidad estimada ocurre en el 20-30% de los casos de listeriosis y más del 90% de éstos se da en la población vulnerable (Goulet y col., 2012; Hunt y col., 2018).

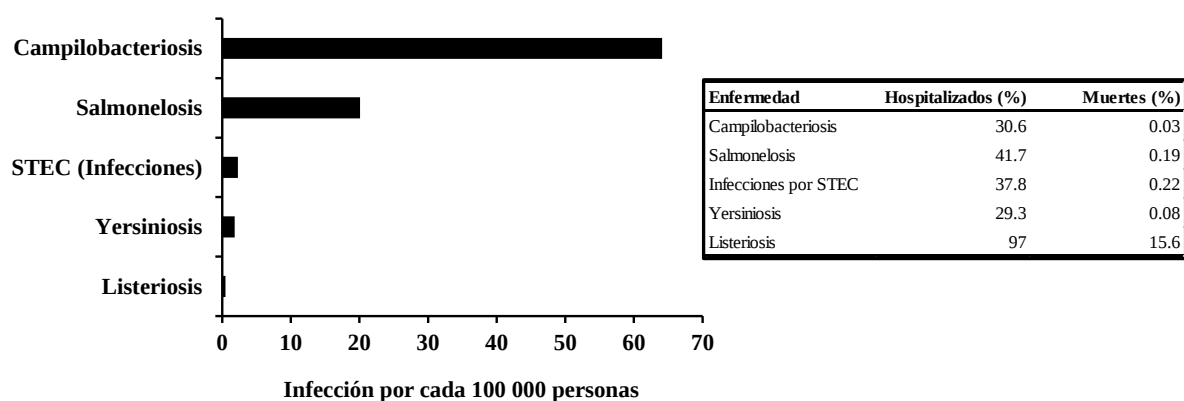


Figura 4. Incidencia, tasas de hospitalización y fatalidad de las principales enfermedades transmitidas por alimentos durante el 2018 en la Unión Europea (EFSA/ECDC, 2019).

En Estados Unidos hubo 134 casos durante el 2019, de los cuales el 98% resultaron en hospitalización y el 16% en fallecimientos; estas cifras se han manteniendo desde el 2006 (Crim y col., 2014; Tack y col., 2020). En la Unión Europea, en cambio, se ha observado una tendencia, estadísticamente significativa, al incremento de los casos confirmados de listeriosis durante el período 2009-2018. Concretamente, en 2018 se reportaron 2549 casos de listeriosis humana invasiva, presentando una tasa de letalidad del 15,6% y se notificaron con mayor frecuencia en el grupo de edad superior a 64 años y, con mayor incidencia, en el grupo de más de 84 años. En general, los casos de listeriosis en la Unión Europea han presentado tasas anuales de letalidad que oscilan entre el 12,7 y el 20,5% (Ricci y col., 2018; EFSA/ECDC, 2019).

En España, los casos de listeriosis han mostrado una tendencia estadísticamente significativa al incremento desde el 2009. En el 2018 se reportaron 370 casos confirmados de listeriosis humana en todo el país, que correspondían a 0,89 casos por cada 10^5 habitantes, erigiéndose como el segundo (superado por Alemania) y tercer (superado por Estonia y Finlandia) país de la Unión Europea con mayor número de casos e incidencia, respectivamente (EFSA/ECDC, 2019).

Se estima que las pérdidas económicas por listeriosis relacionadas con el coste médico anual, la muerte prematura y la pérdida de productividad, es de aproximadamente 2300 millones de dólares al año solo en Estados Unidos (Ivanek y col., 2005). En un brote ocurrido en Sudáfrica en 2018 (WHO, 2018b), se estimó una pérdida económica de 260 y 10,4 millones de dólares por costes asociados a la muerte de las personas y gastos de hospitalización, respectivamente (Olanya y col., 2019). En Canadá, en el brote ocurrido en

2008 por consumo de productos cárnicos, con 57 casos y 24 muertes, se estimó una pérdida económica de casi 242 millones de dólares canadienses (Thomas y col., 2015).

1.3.5.2.- Contaminación de los alimentos con *Listeria monocytogenes*

Por su carácter ubicuo, *L. monocytogenes* está ampliamente distribuida en el medio ambiente, principalmente en el agua y suelo, y desde allí puede contaminar vegetales, piensos, animales y la cadena alimentaria en general. Por ello, la materia prima procedente de la producción primaria agroalimentaria suele estar contaminada y su grado de contaminación está relacionado directamente con el potencial de contaminación en el entorno de la industria (Nightingale y col., 2004; Linke y col., 2014; Ricci y col., 2018).

La presencia de *L. monocytogenes* en la carne en el matadero suele atribuirse a la contaminación con materia fecal durante el sacrificio, lo que ocurre con frecuencia debido que un gran número de animales sanos son portadores de *L. monocytogenes*, habiéndose aislado de materia fecal de entre el 11 y el 52% de los animales. Asimismo, se ha descrito que hasta un 45% de los cerdos pueden albergar este patógeno en sus amígdalas. Las instalaciones del matadero también pueden estar contaminadas, tanto en zonas sucias como limpias; también pueden pasar a los alimentos a partir de las manos de los trabajadores y agua reciclada del proceso, demostrando la importancia de la contaminación cruzada. La prevalencia de canales de cerdo contaminadas con este patógeno es del 9-22% (Ryser y Buchanan, 2013; Barrientos y col., 2015; Morales-Partera y col., 2018; Demaître y col., 2020).

Por tanto, cada vez que ingrese nueva materia prima o ingredientes en las instalaciones de procesamiento de alimentos, existe la posibilidad de estar introduciendo este patógeno. Esto explica la relativa frecuencia con que se identifica *L. monocytogenes* en los entornos de las industrias alimentarias, ya que las fuentes de contaminación son numerosas, incluyendo las superficies de contacto con los alimentos, la maquinaria de elaboración y los trabajadores. Ello se debe a la capacidad de *L. monocytogenes* de formar biofilms (véase el apartado siguiente) altamente resistentes a los desinfectantes (Ricci y col., 2018).

La contaminación cruzada también puede producirse en la venta al por menor y a nivel de restauración colectiva (Lakicevic y Nastasijevic, 2017). En general, existe una mayor probabilidad de contaminación en alimentos de venta al por menor que en los productos preenvasados, relacionada a la manipulación (Gombas y col., 2003; Pradhan y col., 2011).

Finalmente, los alimentos también pueden contaminarse en el hogar. De hecho, se ha aislado *L. monocytogenes* de diferentes partes de la cocina. Los casos de listeriosis a nivel

doméstico implican alimentos RTE cuyos envases han sido abiertos y que a menudo se almacenan durante largos períodos en el refrigerador antes de ser consumidos sin someterlos a tratamiento alguno (Evans y Redmond, 2016).

1.3.5.3.- Biofilms de *Listeria monocytogenes* en entornos agroalimentarios

La capacidad de *L. monocytogenes* de formar biofilms es una de las principales causas de la contaminación cruzada de los alimentos en entornos industriales (Schmid y col. 2009; Takahashi y col. 2011; Hoelzer y col., 2015; Malley y col., 2015). En estos entornos, los biofilms de *L. monocytogenes* permiten la aparición de cepas persistentes, es decir cepas que se aíslan repetidamente de una misma instalación durante periodos de tiempos prolongados (meses o hasta años) incluso bajo condiciones sanitarias estándares (Lunden y col., 2002; Carpentier y Cerf, 2011).

Los biofilms son ecosistemas celulares bacterianos altamente organizados que se forman mediante la adherencia de células a diversas superficies a través de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (SEPs) que ellas mismas producen. Esta matriz está compuesta principalmente de polisacáridos (exopolisacáridos), proteínas, glucolípidos y ADN extracelular bacteriano. Esta matriz actúa como barrera y además crea un microambiente que limita la difusión y eficacia de los agentes antimicrobianos. Además, los mecanismos de resistencia codificados genéticamente pueden transferirse entre las células del biofilm, por ejemplo, a través de plásmidos (Donlan y Costerton, 2002; Molin y Tolker-Nielsen, 2003; Flemming y col., 2007; Flemming y Wingender, 2010).

Los biofilms se forman en superficies de las instalaciones como suelos y paredes, codos de tuberías, juntas de goma, superficies de manipulación de alimentos, cintas transportadoras, equipos industriales de acero inoxidable mal desinfectados, etc. (Simoes y col. 2010; Xu y col., 2011). En particular, *L. monocytogenes* tiene la capacidad de adherirse a diversas superficies abióticas comúnmente usadas en la industria alimentaria (acero inoxidable, vidrio, polipropileno, plástico, caucho, etc.), llegando a recuperarse con mayor frecuencia de zonas húmedas como desagües, agua condensada en las superficies, tuberías del sistema de agua, aguas residuales, agua estancada, suelos y residuos en el equipo de procesamiento (Ryser y Buchanan, 2013).

1.3.5.4.- Alimentos principalmente implicados en brotes de listeriosis

Los alimentos que pueden contaminarse con *L. monocytogenes* son numerosos y muy diversos. Sin embargo, los casos de listeriosis están vinculados casi exclusivamente a alimentos RTE. Algunos de los alimentos implicados en los brotes de listeriosis más

importantes de los últimos años, así como algunas de sus repercusiones económicas para la industria, se mencionan a continuación.

Los brotes de listeriosis en Estados Unidos del 2010-2015, se han asociados a alimentos que rara vez habían sido implicados en estos problemas, como helados (2010-2015), que causó 10 casos y 3 muertes, melón (2011), que provocó 147 casos y 33 muertes además de un aborto espontáneo, germinados de soja (2014), que produjo 5 casos y 2 muertes, manzanas caramelizadas (2014-2015), que ocasionó 35 casos y 3 muertes además de una pérdida fetal, entre otros (Buchanan y col., 2017). Más recientemente se han descrito brotes en ensaladas envasadas (19 casos y 1 muerte) (CDC, 2016), queso (8 casos y 2 muertes) (CDC, 2017), jamón cocido (4 casos y 1 muerte) (CDC, 2018), rollitos de carne de cerdo (4 casos) (CDC, 2019), huevos cocidos (8 casos y 1 muerte) (CDC, 2020a) y setas (36 casos y 4 muertes) (CDC, 2020b). Se estima que las pérdidas económicas debido a los decomisos de estos productos implicados son de entre 1200 y 2400 millones de dólares al año (Ivanek y col., 2005). Así, el brote del 2016 asociado a ensaladas envasadas (CDC, 2016), ocasionó una pérdida para la compañía implicada estimada en 25 millones de dólares (Forsythe, 2020).

El brote más importante en cuanto a número de casos detectado en el mundo hasta la fecha fue el ocurrido en Sudáfrica, entre el 2017 y 2018, con 978 personas infectadas y 183 (27%) fallecidos. En este brote, el 42% de los casos fueron neonatos que se infectaron durante el embarazo o el parto. El vehículo fue un producto cárnico RTE similar a una salchicha, popular en este país, llamado "Polony" (WHO, 2018b). Algunas de las repercusiones económicas para la industria fueron las pérdidas a causa de la retirada del mercado del producto (unas 4000 Tm) y de la suspensión temporal de la importación de carne elaborada en África, estimadas en 53 y 11 millones de dólares, respectivamente (Olanya y col., 2019).

En la Unión Europea, entre los años 2008 y 2018, se ha notificado presencia de *L. monocytogenes* con mayor frecuencia en plantas de elaboración de productos RTE derivados de la pesca, de origen cárnico (excluyendo los embutidos fermentados) y queso. Además, se ha determinado que, en este periodo, la prevalencia de *L. monocytogenes* en establecimientos de venta al por menor fue de menos del 1%. En cuanto a los alimentos más frecuentemente asociados a los brotes de listeriosis, entre 2010 y 2017, fueron en primer lugar los alimentos mixtos (compuestos por más de un tipo de alimentos), seguido de pescado y derivados, verduras y zumos, así como crustáceos, mariscos, moluscos y derivados. En concreto, en el 2018, las verduras y los zumos, así como otros productos derivados, fueron el vehículo

alimentario responsable de casi el 30%, de los 158 brotes de listeriosis declarados (Ricci y col., 2018; EFSA/ECDC, 2019).

En Europa, se han producido brotes en los que estuvieron implicados diferentes productos como el queso curado, en Austria y Alemania (2010), que resultó en 14 casos y 7 muertes, productos cárnicos tradicionales (rullepølse, “salchicha enrollada”) de Dinamarca (2013-2014), ocasionando 41 casos y 17 muertes (41%) (Kvistholm Jensen y col., 2016; Voysey y Betts, 2017) o verduras congeladas, que ocasionó un brote multinacional que abarcó Finlandia, Reino Unido y Dinamarca (2015-2018), donde una cepa de *L. monocytogenes* ST6 (serotipo 4b) causó 53 casos y 10 muertes (EFSA, 2020), entre otros.

En España, los casos de listeriosis humana no se relacionaron con ningún brote en 2018. Sin embargo, en el año 2019, se produjo el mayor brote de listeriosis reportado en España, con 222 casos, 3 muertes y 6 abortos. Este brote se asoció al consumo de un producto español de carne de cerdo asada y refrigerada (carne mechada). Si bien la mayoría de casos ocurrieron en la comunidad autónoma de Andalucía (214 casos), estuvieron implicadas otras cuatro comunidades (WHO, 2019).

En general, los alimentos frecuentemente implicados tanto en casos esporádicos como en brotes de listeriosis humana son productos RTE de diferentes categorías: carne y productos cárnicos, pescado y derivados, leche y productos lácteos, en especial el queso fresco, y alimentos de origen vegetal frescos o incluso congelados. Los productos cárnicos que suelen estar implicados son el paté, salchichas Frankfurt y los fiambres que se sirven fríos y en lonchas (“deli meats”), como embutidos, salchichas, pasteles de carne, etc. (FAO/OMS, 2004; Farber y col., 2007; Ricci y col., 2018).

Según el Reglamento (CE) No 2073/2005, los RTE son “alimentos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos” (Comisión Europea, 2005). Es decir, son productos con presentaciones atractivas que ahorran tiempo y esfuerzo en el hogar, ya que son consumidos directamente sin cocinarlos. Por ello, durante su procesamiento se suelen realizar operaciones que reducen o, incluso, eliminan los microorganismos, desde lavados hasta tratamientos térmicos. Sin embargo, las etapas finales de la elaboración de estos productos RTE, particularmente durante la reducción de tamaño (lonchas, trozos, etc.) y envasado, implican una manipulación adicional que podría conducir a contaminación cruzada. Luego, *L. monocytogenes* puede multiplicarse hasta niveles inseguros durante el almacenamiento de

estos productos tanto en el expendio y distribución, como en el hogar (Swaminathan y Gerner-Smidt, 2007; Ricci y col., 2018).

Por tanto, existen normas estrictas para el control de *Listeria* en estos alimentos. En Estados Unidos rige la política de “tolerancia cero” (ausencia en 25 g) para todo tipo de alimentos. En la Unión Europea, el Reglamento (CE) No 1441/2007 establece un límite diferente, < 100 UFC/g de *L. monocytogenes*, solo para alimentos que no favorecen el crecimiento de este microorganismo o en los que se puede demostrar que no se superará este valor durante su vida útil (Comisión Europea, 2007). Es el caso del jamón curado, cuya baja a_w ($\leq 0,92$) no favorece el crecimiento de este patógeno. Sin embargo, de ocurrir la contaminación, la sola presencia de una célula de *L. monocytogenes* en este producto ocasionaría su decomiso en países como Estados Unidos. Por tanto, es necesario aplicar tratamientos alternativos para su higienización, algunos de los cuales se describen de forma muy resumida en el siguiente apartado.

1.4.- Tratamientos higienizantes del jamón curado

La aplicación de calor es actualmente la tecnología más usada en la industria para obtener productos con una mayor vida útil y seguros desde un punto de vista microbiológico (Li y Farid, 2016). Sin embargo, no todos los alimentos pueden tratarse térmicamente debido a que pueden sufrir pérdidas sensoriales y nutricionales. En la industria preocupan especialmente tanto los productos frescos como los mínimamente procesados y los RTE (Tahergorabi y col., 2014). Algunos de ellos, como el jamón curado, son sometidos a etapas posproceso de reducción de tamaño (loncheado, deshuesado, cortado) que implican una manipulación adicional que aumenta el riesgo de contaminación del producto (Hoz y col., 2008; Morganti y col., 2016).

Con el fin de superar estas limitaciones, los estudios recientes se han centrado en la aplicación de tecnologías no térmicas, como bioconservantes, altas presiones hidrostáticas (APH), luz ultravioleta (UV), pulsos de luz, ultrasonido, campo eléctrico pulsado, plasma frío o irradiación (Li y Farid, 2016).

Respecto a las APH, la aplicación a lonchas de jamones curados de 600 MPa durante 6 minutos a 31°C consiguió una reducción en la carga de *L. monocytogenes* de 2,7 ciclos logarítmicos (Hugas y col., 2002) y en la microbiota aerobia de 1,8 (Garriga y col., 2004). Este mismo tratamiento aplicado a lonchas de jamón curado ahumado disminuyó en 20 y 40 UFC de *L. monocytogenes* y *Salmonella entérica* por gramo de producto, respectivamente

(Stollewerk y col., 2012). Morales y col. (2006), observaron una reducción de 3,6 unidades logarítmicas en el número de células de *L. monocytogenes* en jamón ibérico mediante la aplicación de 450 MPa durante 10 minutos a 12°C.

Bover-Cid y col. (2011) contaminaron lonchas de jamón curado de forma intencionada con *L. monocytogenes* y aplicaron APH en diferentes condiciones (347-852 MPa; 2.3-15,75 min; 7,6-24,4°C), concluyendo que cuanto mayor era la presión aplicada, mayores eran las reducciones obtenidas.

Hereu y col., (2012) estudiaron en este producto el efecto de las APH, de la nisina y de la aplicación simultánea de ambos. Mediante las APH se redujo el número de células de *Listeria* entre 1,82 y 3,85 unidades logarítmicas, dependiendo de la a_w del jamón curado. La nisina causó una disminución ligeramente inferior en jamones con alta a_w (0,80 logs $\pm$ 0,45) frente a la conseguida en jamones con una a_w inferior (1,24 logs $\pm$ 0,26). Sin embargo, la aplicación combinada de APH y nisina mostró un efecto sinérgico, consiguiéndose 3,5 reducciones decimales.

Fernández y col. (2020) estudiaron el efecto de los pulsos de luz a dosis de 2,1, 4,2 y 8,4 J/cm² en la inactivación de *Listeria* en lonchas de jamón Serrano e Ibérico, consiguiendo reducciones de hasta 1 y 2 UFC/cm², respectivamente. Este tratamiento dio lugar a la formación de una elevada concentración de sustancias volátiles que impartían ligeras notas de azufre y metálicas que, no obstante, desaparecieron durante el almacenamiento. De forma similar, Tomašević (2015) estudió el efecto de los pulsos de luz en la calidad sensorial del jamón de Parma, concluyendo que la aplicación de 17 J/cm² modificó significativamente propiedades como el olor, sabor, textura y jugosidad.

Wambura y Verghese (2011) investigaron los efectos del tratamiento con radiaciones UV aplicadas durante 60, 90 y 120 s sobre la calidad de lonchas de jamón curado observando cómo el color y la textura, se ven afectadas de forma inversa al tiempo de tratamiento y a la distancia entre la muestra y la lámpara.

En cuanto a la irradiación de alimentos, tratamiento empleado en esta tesis para conseguir la higienización de jamón curado con respecto a *L. monocytogenes*, se hablará a continuación.

1.5.- Irradiación de alimentos

1.5.1.- Antecedentes históricos

La irradiación de alimentos se remonta al descubrimiento de los rayos X por Roentgen (físico alemán) en 1895, y de las sustancias radiactivas por Becquerel (premio nobel de física) en 1896. Sin embargo, no fue hasta 1905 cuando Appleby y Banks usaron isótopos radiactivos para irradiar alimentos y obtuvieron una patente británica del proceso. Unos años más tarde, en 1918, Gillett obtuvo una patente en Estados Unidos de la aplicación de rayos X en la preservación de alimentos y en 1921 Schwartz usaba esta tecnología para inactivar triquina en la carne de cerdo. En 1930, Wüst, ingeniero alemán, obtuvo una patente francesa por el uso de los rayos X para inactivar bacterias en alimentos envasados (Farkas y Mohácsi-Farkas, 2011; Ehlermann, 2016).

En la década de los 50s en Estados Unidos se desarrolló el programa “Atoms for Peace” en el cual se promovió el uso no militar de la tecnología atómica a escala internacional, lo que incluía la investigación en el área de irradiación de alimentos (Zachmann, 2011). Esta iniciativa impulsó que muchos gobiernos establecieran programas similares. Así, a mediados y finales de esa década, estaban en marcha programas nacionales de investigación sobre la irradiación de alimentos en Bélgica, Canadá, Francia, la República Federal de Alemania, los Países Bajos, Polonia, la Unión Soviética y el Reino Unido. La irradiación de alimentos seguía siendo un tema limitado al ámbito académico hasta que en 1958 se realizó la primera irradiación comercial de especias mediante electrones acelerados en Alemania (Farkas y Mohácsi-Farkas, 2011; Ehlermann, 2016; Premi y Khan, 2018; Ravindran y Jaiswal, 2019).

El constante desarrollo de esta tecnología generó una preocupación sobre la seguridad de los alimentos irradiados. Para abordar este problema, entre 1970 y 1982 se desarrollaron numerosos programas y proyectos de investigación internacionales apoyados por organismos especializados como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). La más amplia de esas cooperaciones internacionales fue el Proyecto Internacional en el ámbito de la Irradiación de Alimentos (IFIP) denominado “proyecto Karlsruhe”, en el que participaron hasta 24 países. El IFIP abordó estudios de alimentación animal, pruebas de detección y cambios químicos en los alimentos irradiados con una dosis de hasta 10 kGy. Los resultados obtenidos de estos estudios fueron evaluados periódicamente (1964, 1969, 1976 y 1980) por el Comité Mixto de FAO/OIEA/OMS de expertos en sanidad de los alimentos irradiados (JECFI). En la

reunión de 1980, JECFI comunicó sus principales conclusiones las cuales incluían que la irradiación de cualquier producto alimenticio a una dosis de hasta 10 kGy no presenta ningún peligro toxicológico, y no presenta ningún problema nutricional o microbiológico específico (Diehl, 2002; Farkas y Mohácsi-Farkas, 2011; Ravindran y Jaiswal, 2019).

En la década de los 90, en la Unión Europea se publican las Directivas 1999/2/CE y 1999/3/CE, que recogían las conclusiones de JECFI de 1980 y que cubren los aspectos generales, técnicos y de etiquetado de los alimentos irradiados además de establecer una lista comunitaria de alimentos e ingredientes alimentarios autorizados para el tratamiento con radiaciones ionizantes. Más tarde, en 1997, un Grupo de Estudio FAO/OIEA/OMS sobre la irradiación de alimentos examinó los resultados de estudios de seguridad realizados en alimentos irradiados con dosis superiores a 10 kGy. Estos estudios utilizaron alimentos irradiados a dosis tan altas como 70 kGy y demostraron que el tratamiento no producía efectos adversos para la salud relacionados con su consumo. Por tanto, concluyeron que los alimentos irradiados con cualquier dosis apropiada para lograr el objetivo tecnológico previsto, son seguros para su consumo y nutricionalmente adecuados (Diehl, 2002; Premi y Khan, 2018; Huang y col., 2019; Nishihira, 2020). En el 2003, el Codex Alimentarius (CAC, 2003) adopta esta recomendación y permite superar el límite de 10 kGy como dosis máxima en la irradiación de alimentos, siempre que sea necesario para conseguir un propósito tecnológico legítimo.

Han transcurrido 115 años desde la primera vez que se documentó la irradiación de alimentos con una larga historia de investigación científica, siendo a la fecha una de las tecnologías de procesamiento de alimentos más investigadas y que está aprobada como un método seguro y eficaz de conservación de los alimentos por la FAO, OMS, OIEA, la agencia de Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA), el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Codex Alimentarius (Sommers y col., 2013; Ahn y col., 2017; Ravindran y Jaiswal, 2019; Castell-Pérez y Moreira, 2020; Nishihira, 2020).

Hoy en día, la irradiación de alimentos está permitida para tratar una variedad de alimentos en más de 60 países. Anualmente, se irradian aproximadamente 500 mil Tm de alimentos en todo el mundo. La descontaminación de las especias, hierbas y condimentos sigue siendo una de las principales aplicaciones de la irradiación. Sin embargo, en los últimos años, el mercado de la carne fresca y procesada irradiada se ha establecido firmemente en varios países, entre ellos China y Estados Unidos (Breidbach y Ulberth, 2016; Roberts, 2016; Carreño, 2018; Premi y Khan, 2018).

1.5.2.- Fundamentos de la radiación ionizante

La radiación electromagnética puede definirse como un proceso de emitir energía en forma de ondas electromagnéticas o partículas. Esta energía se puede medir en electronvoltios (eV) y sus propiedades se definen por su longitud de onda (distancia en metros entre las crestas de dos ondas consecutivas) que a su vez guarda una relación inversa con su frecuencia (número de veces que oscila una onda en un segundo expresado en Hz). Es decir, cuanto mayor es la frecuencia de una onda electromagnética mayor es su energía asociada y más corta su longitud de onda (IAEA, 2002, 2015).

La radiación no ionizante se refiere a la radiación electromagnética con una energía fotónica inferior a 10 eV, y corresponde a frecuencias inferiores a 3×10^{15} Hz y a longitudes de onda superiores a 100 nm ($>10^{-7}$ m) (Tahergorabi y col., 2014; ICNIRP, 2020).

Las radiaciones ionizantes en cambio son ondas electromagnéticas de muy alta frecuencia (10^{15} - 10^{20} Hz); se producen en el extremo de onda corta del espectro (10^{-8} - 10^{-12} m) y presentan gran energía (10^1 - 10^6 eV). Estas se denominan ionizantes porque cuando interaccionan con la materia tienen suficiente energía (cinética o cuántica) para producir la ionización de sus átomos y/o moléculas, es decir que es capaz de remover electrones de átomos y moléculas, transformándolos en iones (Tahergorabi y col., 2014). Son ejemplos de radiación ionizante las partículas cargadas de alta energía como los electrones o los fotones de alta energía como los rayos X y gamma. La gama de frecuencias de energía y sus respectivas longitudes de onda se identifican en el espectro electromagnético en la Figura 5.

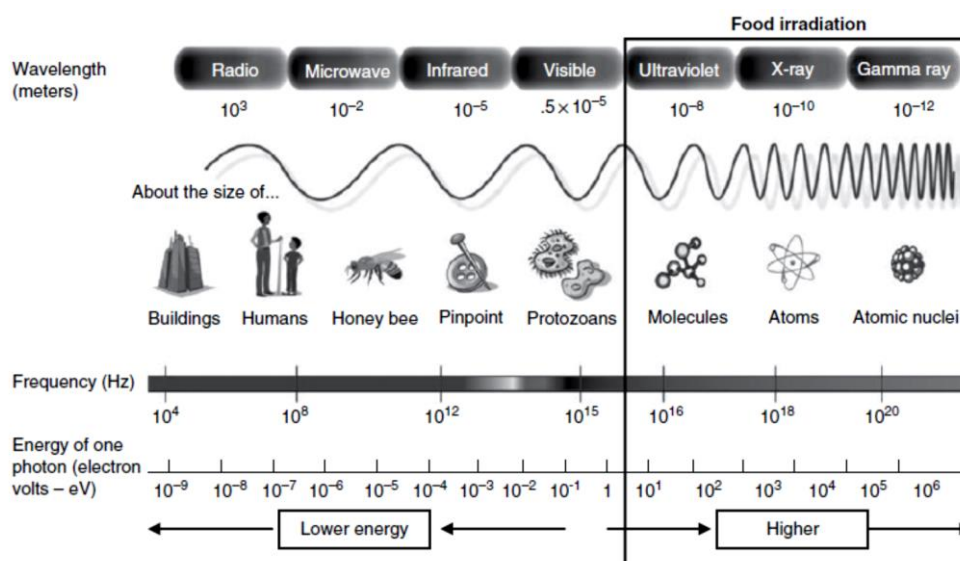


Figura 5. El espectro electromagnético y la irradiación de alimentos (Tahergorabi y col., 2014).

La irradiación de alimentos consiste precisamente en exponer los productos alimenticios (envasados o a granel) a una cantidad controlada de radiación ionizante (rayos X, gamma o electrones acelerados) durante un tiempo predeterminado a fin de lograr un determinado efecto. Estos tratamientos se aplican en el interior de instalaciones propias para este fin (plantas de irradiación), las cuales cumplen con una serie de regulaciones y están diseñadas de forma que eviten el escape de radiaciones. Este tratamiento no térmico no produce radioactividad inducida en los alimentos a los niveles de energía permitidos (EFSA, 2011).

La cantidad de radiación ionizante a la que ha estado expuesto un alimento se puede determinar a través de la dosis absorbida. La dosis absorbida es una magnitud que se define como la cantidad de energía de radiación ionizante depositada por unidad de masa en un material tratado. La unidad es el gray (Gy), donde 1 Gy equivale a la absorción de 1 J/kg (IAEA, 2015).

Para conocer la dosis absorbida en un alimento, se utilizan dosímetros. Un dosímetro es un dispositivo pequeño, típicamente muy delgado, de un material que se ve afectado por la irradiación de una manera consistente y medible por lo que su respuesta a la irradiación es reproducible bien definida y establecida, medible mediante espectrofotómetros (Mehta y O'Hara, 2006; IAEA, 2015).

Efecto Compton

Cuando se irradia un producto, se producen múltiples interacciones que dan lugar a partículas secundarias. Estas interacciones producen electrones secundarios o fotones de menor energía los cuales producen a su vez más interacciones, fenómeno conocido como efecto Compton o fenómeno de retrodispersión. En el caso de los electrones acelerados, cuando inciden sobre cualquier átomo son expulsados electrones secundarios que se absorben más eficientemente que los primarios debido a su menor energía, causando excitación y posterior ionización de los componentes de los alimentos. Así, el efecto Compton explicaría el incremento de la dosis absorbida hasta aproximadamente 2 cm de profundidad bajo la superficie de un alimento irradiado con electrones acelerados (IAEA, 2002; Jaczynski y Park, 2003; Kim y col., 2007; Tahergorabi y col., 2012, 2014).

1.5.3.-Fuentes de irradiación permitidas para su uso en alimentos

La norma general del Codex Alimentarius para alimentos irradiados identifica tres tipos principales de fuentes de radiación (CAC, 2003):

- Los rayos gamma emitidos por radioisótopos ^{60}Co , a unos niveles de energía de 1,17 y 1,33 MeV, y ^{137}Cs , a energía máxima de 0,66 MeV.
- Los rayos X, generados al hacer incidir un haz de electrones a un nivel de energía igual o inferior a 5 MeV sobre una placa metálica (de wolframio, oro o tungsteno).
- Los electrones acelerados, generados en un acelerador con una energía máxima de 10 MeV.

Con los niveles de energía indicados para estas tres fuentes no se induce radioactividad y se consiguen efectos letales sobre los microorganismos (EFSA, 2011).

Los electrones acelerados y rayos X se generan por un dispositivo eléctrico capaz de aumentar la energía cinética de los electrones y generar un haz de electrones acelerados. Por tanto, el equipo se puede apagar cuando no se está utilizando. La radiación gamma utiliza radioisótopos, no puede desconectarse y su funcionamiento es ininterrumpido, además se debe tener un cuidado extremo para contener y eliminar los desechos nucleares (Satin, 2002; IAEA, 2015; Pillai y Shayanfar, 2017).

En cuanto al rendimiento del proceso, los electrones acelerados son la fuente energéticamente más eficiente, ya que el haz de electrones producido se dirige de forma controlada para su aplicación directa a los productos. En cambio, los rayos X se generan cuando un haz de electrones impacta un objeto metálico generando fotones que también se pueden dirigir hacia los alimentos. Este proceso tiene un escaso rendimiento, ya que el nivel de energía resultante es de aproximadamente el 10% de la potencia del rayo electrónico incidente, y debido al elevado costo de este proceso, su utilización actualmente no resulta rentable. Por otro lado, la fuente de radioisótopos emite los rayos gamma en todas las direcciones y solo una porción de ellos incidirá sobre los productos, desaprovechando la mayor parte de los fotones. Además, para poder aprovechar los radioisótopos de forma plena, deben reemplazarse cuando han alcanzado entre el 6-12% de su nivel inicial de energía, en aproximadamente 5,3 (^{60}Co) y 31 (^{137}Cs) años (Riganakos, 2010; EFSA, 2011; Tahergorabi y col., 2014).

En cuanto a la profundidad de penetración de la irradiación, los electrones acelerados presentan una escasa penetración, generalmente no superior a 5 cm, siendo esta su mayor limitación. Para superar este inconveniente, los productos pueden irradiarse dispuestos en finas capas o realizando un tratamiento bilateral mediante volteo. En el caso de los rayos X y los rayos gamma, presentan una capacidad de penetración hasta 10 veces superior a los electrones acelerados, por tanto, la distribución de la dosis es más uniforme dentro del producto tratado (Farkas, 2006; Corlis y col., 2008; Tahergorabi y col., 2014; IAEA, 2015).

Electrones acelerados

El tratamiento con electrones acelerados es conocido como “pasteurización electrónica” o “pasteurización en frío”. Se considera como una tecnología no térmica ampliamente investigada y documentada que permite garantizar los estándares de seguridad alimentaria sin alterar significativamente las propiedades y características físicas y sensoriales de los alimentos (Roberts, 2014; Clemmons y col., 2015; Li y Farid, 2016; Pillai y Shayanfar, 2017).

Los electrones acelerados se generan en un acelerador de electrones a partir de electricidad comercial. Existen tres tipos de aceleradores de electrones comerciales: los aceleradores de corriente continua (como el DynamitronTM), los aceleradores de radiofrecuencia (como el Rhodotron) y los aceleradores lineales (como el LINAC). Hoy en día, el Rhodotron es uno de los dispositivos más utilizados pues es un acelerador de recirculación, operado en onda continua, de alta potencia, simple, compacto (3 m x 2,4 m de diámetro x alto, respectivamente) y fiable (Cleland, 2013; Brown, 2015, Clemmons y col., 2015; Pillai y Shayanfar, 2017). La figura 6 muestra un Rhodotron y un esquema del proceso de aceleración de electrones en este equipo.

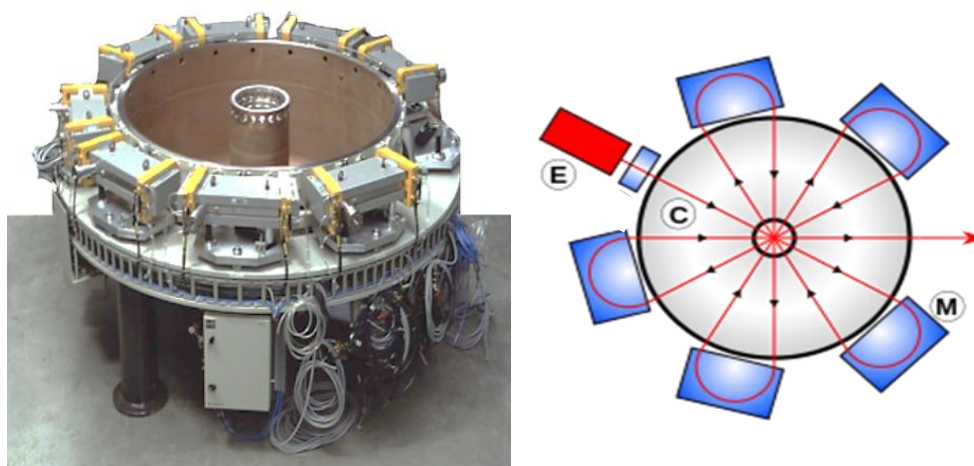


Figura 6. Acelerador de electrones de tipo Rhodotron de 10-MeV (Imagen transversal) (izquierda) y esquema del proceso de aceleración de electrones (derecha). Cañón de electrones (E); Cámara de vacío (C); Electroimanes deflectores (M). La flecha señala la trayectoria que siguen los electrones tras ser producidos por el cañón y hasta salir de la cámara (Cleland, 2013).

La parte interna del Rhodotron (Figura 6) presenta una cámara coaxial aceleradora, circular, en cuyo centro se encuentra el núcleo que genera un campo electromagnético (C). Los electrones son generados desde el cañón de electrones (E) y lanzados al interior de la cámara del acelerador, donde se acoplan con el campo electromagnético. Al ser atraídos por el núcleo, el haz de electrones atraviesa la cámara dirigiéndose a un electroimán deflector (M) cuyo propósito es desviar la trayectoria de este haz al punto diametralmente opuesto pasando, de nuevo, por el centro de la cámara, repitiéndose el ciclo a través de todos los 9 electroimanes deflectores ubicados alrededor de la cavidad. Así, los electrones recorrerán una trayectoria en forma de una flor de margarita, y a la que debe su nombre “Rhodos” en griego que significa flor. Cada vez que los electrones pasen por el centro de la cámara son acelerados y ganan 1 MeV de energía, por lo que tras 10 cruzamientos sucesivos los electrones alcanzan una aceleración cercana a la velocidad de la luz y poseen una energía de 10 MeV. Finalmente, los electrones salen de la cámara y pasan a un último electroimán que desvía su trayectoria 90°, son dispersados en un cono de barrido para crear un haz de electrones que directamente incide en el producto a tratar (Cleland, 2006; Clemmons y col., 2015; Brown, 2015; Miller, 2018). Por su parte, estos alimentos son transportados hacia el haz mediante unas cintas o bandas transportadoras. Un esquema de la planta de irradiación se observa en la Figura 7.

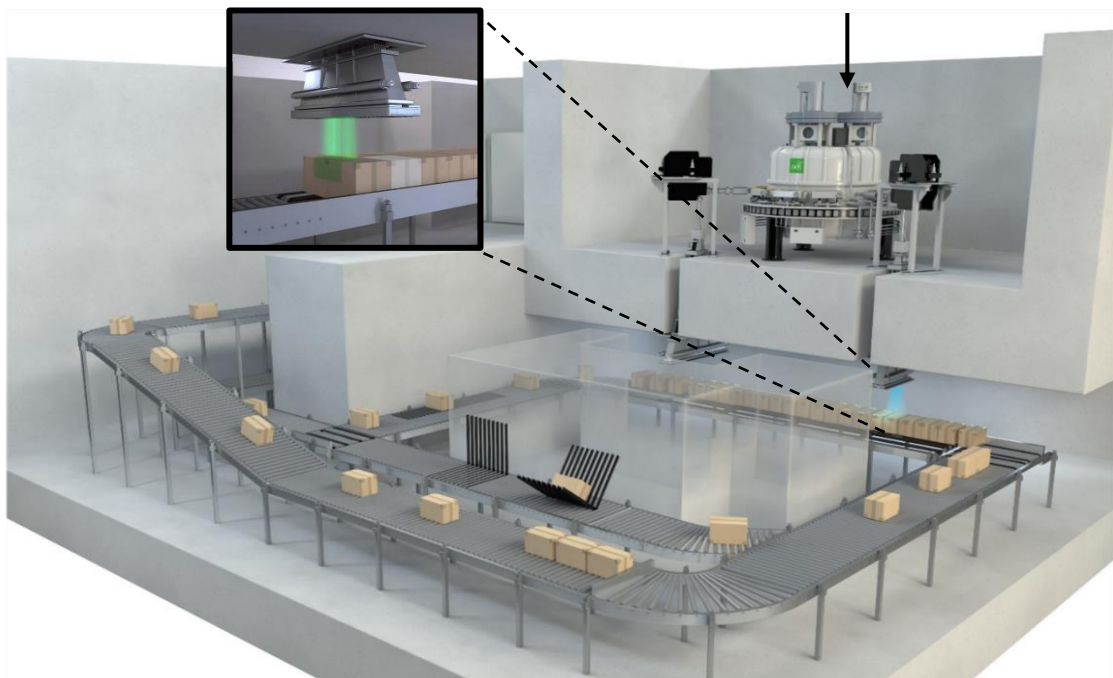


Figura 7. Planta de irradiación con electrones acelerados. La flecha indica un acelerador de tipo Rhodotron. A la izquierda se muestra ampliada la imagen de los productos transportados automáticamente hacia el haz de electrones para ser irradiados (<https://www.iba-industrial.com>).

La eficacia de los electrones acelerados para la disminución o eliminación de microorganismos patógenos y alterantes ha sido ampliamente demostrada en numerosos alimentos como lonchas de pavo ahumado, mortadela, salchichas, carne de cerdo cocida y jamón de pavo (Foong et al, 2004; Kudra et al, 2012), lomo de cerdo y vacuno (García-Márquez y col., 2012ab; Yim y col., 2016), carne de pato (An, y col., 2018; An y col., 2017), embutidos fermentados (Cabeza y col., 2009) y lonchas de jamón cocido y curado (Benedito y col., 2011; Cabeza y col., 2007; Cabeza y col., 2010; Cambero y col., 2012; Hoz y col., 2008), entre otros.

1.5.4.- Efecto de las radiaciones ionizantes en los microorganismos

La radiación ionizante inhibe el crecimiento microbiano a través del daño directo o indirecto de sus estructuras (descomposición de la membrana, cambios en la conformación del ADN, agregación de proteínas, etc.) o de los mecanismos fisiológicos (fugas en la membrana, pérdida de enzimas clave, etc.) (Pillai y Shayanfar, 2015, 2017).

El efecto directo se debe a la interacción de la energía con macromoléculas vitales como el ADN y el ARN, resultando en la destrucción de enlaces químicos y moleculares, y desnaturalización de enzimas y proteínas de membrana. Esto hace que las células no puedan realizar actividades fisiológicas normales y pierdan la función de replicación cromosómica, por la ruptura de la doble hélice del material genético, lo que deriva en muerte celular. Estos efectos serán más pronunciados conforme aumente la dosis de irradiación (Tahergorabi y col., 2014; Pillai y Shayanfar, 2017). En una célula, la única actividad biológica que persiste tras la radiación se atribuye a proteínas que escaparon a este daño directo (Kempner, 2001).

Los efectos indirectos se deben a la interacción con una molécula adyacente, generalmente el agua, liberándose radicales que también actúan a nivel del material genético. Estos radicales son extremadamente reactivos y se estabilizan mediante la combinación con otros compuestos. Si estos agentes se generan en el citoplasma de una célula microbiana, ocasionarán daños en diversas estructuras y sistemas enzimáticos y, finalmente, en el ADN (EFSA, 2011; Tahergorabi y col., 2014).

1.5.4.1.- Sensibilidad de microorganismos a las radiaciones ionizantes

Los microorganismos poseen una resistencia a la irradiación que depende de varios factores y que se refleja en sus respectivos valores *D*. El valor *D* es la dosis necesaria para lograr una reducción del 90% en la población microbiana, es decir, una disminución de 1 unidad logarítmica.

La radioresistencia depende, en primer lugar, del tipo de microorganismo en cuestión. En general, se puede decir que las formas de vida más complejas tienen mayor sensibilidad a la irradiación. Así, los virus son más resistentes que las bacterias esporuladas y éstas, a su vez, presentan mayor resistencia que las bacterias vegetativas, las levaduras y los mohos, siendo éstos últimos los más sensibles (EFSA, 2011; Ahn y col., 2018).

Se han aislado bacterias extremadamente resistentes a la radiación, principalmente *Deinococcus* spp. Estos microorganismos no son patógenos, son sensibles al calor y no alteran los alimentos. La supervivencia de estas bacterias está determinada por su capacidad única de reparar daños importantes del ADN y su habilidad para eliminar las especies reactivas de oxígeno (EFSA, 2011; Slade y Radman, 2011).

En cuanto al estado fisiológico de las bacterias, las células en fase exponencial son más sensibles a la irradiación que las células en fase de latencia o en fase estacionaria. Más importante aún, las bacterias que han sido sometidas a algún tipo de estrés ambiental (como osmótico, ácido o inanición) muestran una mayor resistencia. Así, *L. monocytogenes* muestra valores *D* de 0,35, 0,42 y 0,66 kGy en carne de cerdo, dependiendo de si se encuentra en fase exponencial, estacionaria y si ha sido sometida a deficiencia nutricional, respectivamente (Mendonca y col., 2004).

La sensibilidad también depende del número de microorganismos presentes en el alimento a tratar; a mayor concentración microbiana, menor eficacia del tratamiento (EFSA, 2011; Ahn y col., 2018).

Asimismo, la eficacia del tratamiento puede variar en función de la cantidad de agua del producto, ya que repercute directamente en la formación de radicales libres. También influye la cantidad de proteínas, antioxidantes y vitamina E en la matriz del producto, ya que estos componentes se unen a los radicales libres disminuyendo la eficacia del tratamiento. Otro factor es el estado físico del alimento, es decir si está fresco, refrigerado o congelado, ya que el valor *D* aumenta conforme disminuye la temperatura. La eficacia del tratamiento también será mayor cuando el producto este envasado a vacío (Tahergorabi y col., 2014; Clemmons y col., 2015; Pillai y Shayanfar, 2015; Ahn y col., 2018).

1.5.5.- Efecto de las radiaciones ionizantes en los alimentos

El efecto de las radiaciones ionizantes en los componentes de los alimentos depende de la dosis aplicada y se debe, al igual que ocurre en los microorganismos, por una parte a una acción directa sobre los componentes que implica una ionización primaria aleatoria que da lugar, en última instancia, a la ruptura de sus enlaces químicos. Por otra parte, la radiación

interacciona con el agua (efecto indirecto), formándose radicales libres, que son los que desencadenan numerosos cambios bioquímicos en los componentes (Kempner, 2001; Fan, 2013; Baccaro y col., 2018). Por ello, el contenido de agua del alimento determinará el grado de modificación producido por la irradiación.

Efecto de la irradiación sobre los carbohidratos

La irradiación podría ocasionar una ligera degradación de carbohidratos complejos en azúcares más simples, mientras que los monosacáridos pueden sufrir procesos de oxidación. Sin embargo, es especialmente susceptible el material fibroso de la pared celular de algunos vegetales, especialmente frutas, constituido por polisacáridos, en particular celulosa, almidón y pectina, lo que provoca un deterioro de las propiedades estructurales afectando la textura y viscosidad, limitando la dosis de irradiación que pueden tolerar (Miller, 2005; Fan, 2013).

Efecto de la irradiación sobre los lípidos

Los lípidos son los componentes de los alimentos más sensibles a la irradiación. En ausencia de oxígeno, la irradiación puede degradar los ácidos grasos en CO_2 , H_2 , CO , hidrocarburos (alcanos y alquenos) y aldehídos. Sin embargo, en presencia de oxígeno, la irradiación puede inducir la oxidación de los ácidos grasos con formación de hidroperóxidos, especialmente a dosis >10 kGy. Aunque no son perjudiciales, estas sustancias suelen tener olores y sabores indeseables (rancidez), lo que provoca una pérdida de la calidad del producto (Fan, 2013).

Efecto de la irradiación sobre las proteínas

Desde el punto de vista nutricional, las proteínas son resistentes a la irradiación, con poco efecto sobre la digestibilidad y la composición de los aminoácidos, por lo que la carne y productos cárnicos son buenos candidatos para la irradiación. Los aminoácidos por sí mismos (aminoácidos libres) son relativamente sensibles al ataque de los radicales libres. Las dosis < 10 kGy causan principalmente una pequeña ruptura de las proteínas en fragmentos de bajo peso molecular y aminoácidos. En menor medida, puede tener lugar la desaminación, descarboxilación, reducción de la unión de disulfuro, oxidación de los grupos sulfhidrilos y agregación de la cadena peptídica. Sin embargo, en dosis elevadas, la irradiación puede dar lugar a la desnaturalización de la proteína. Los compuestos que contienen azufre como los aminoácidos libres (metionina y cisteína), péptidos (glutación y cistina), proteínas u otros (tiamina, coenzima A), son más sensibles a la irradiación,

generando compuestos volátiles sulfurados. Estos compuestos volátiles están relacionados al mal olor o sabor en los alimentos irradiados (Miller, 2005; Fan, 2013; Prakash, 2020).

Efecto de la irradiación sobre vitaminas y antioxidantes

Los radicales libres radioinducidos pueden afectar los antioxidantes naturales y algunas vitaminas de los alimentos, en especial a altas dosis (Park y col., 2012; Yun y col., 2012; Feliciano y col., 2014). La tiamina (B1) es motivo de preocupación debido a su sensibilidad relativamente alta a los efectos de la radiación. La irradiación puede convertir parte del ácido ascórbico en ácido dehidroascórbico; Sin embargo, el deshidroascórbico también posee actividad de vitamina C, aunque carece de propiedades antioxidantes. En cambio, niacina, piridoxina, riboflavina, ácido fólico y cobalamina son relativamente resistentes a estos efectos (Miller, 2005). Entre las vitaminas liposolubles, sólo las vitaminas A y E evidencian sensibilidad a la radiación. Además, los radicales libres generados por la irradiación pueden agotar los antioxidantes naturales presentes en algunos alimentos, como carnosina y carotenoides (Galan y col., 2011; Woodside, 2015).

1.5.6.- Objetivos tecnológicos de la irradiación de alimentos

Los beneficios de esta tecnología dependerán de la dosis utilizada, la cual está estrechamente relacionada con el efecto que se pretende conseguir. Algunos ejemplos se muestran en la Tabla 3, elaborada a partir de lo descrito por Roberts (2014) e IAEA (2015). Las aplicaciones de hasta 1 kGy, entre 1 y 10 kGy, y superiores a 10 kGy se conocen como irradiación a dosis bajas, dosis medias y dosis altas, respectivamente (EFSA, 2011).

Tabla 3. Efectos de la irradiación diferentes dosis (kGy).

Dosis	Objetivo tecnológico	Ejemplos de alimentos
0,1-1	Inhibir la germinación	Patatas, ajos, cebollas
	Retrasar la maduración.	Bananas, papayas
	Control de insectos.	Alimentos frescos y deshidratados
	Inactivación de parásitos.	Vegetales (protozoos), Cerdo (<i>Trichinella</i>)
>1-10	Prolongación de la vida útil.	Fresas, champiñones, pescados deshidratados
	Eliminación de patógenos no esporulados.	Mariscos, carnes frescas y especias
>10	Reducir los patógenos al punto de esterilidad.	Especias, dietas especiales

1.5.7.- Ventajas e inconvenientes de la irradiación de alimentos

Ventajas

La irradiación de alimentos presenta una serie de ventajas frente a otras tecnologías empleadas para la conservación de alimentos los cuales han sido recogidos por numerosos autores (Miller, 2005; Fan, 2013; Lee y col., 2013; Sommers y col., 2013; Roberts, 2014; Pillai y Shayanfar, 2017; Prakash, 2020), las principales se muestran a continuación:

- Altamente eficiente: inactiva un amplio espectro de plagas y microorganismos (en las dosis permitidas reduce prácticamente todos los patógenos comunes transmitidos por los alimentos).
- Es seguro: está demostrado que no produce problemas de salud en el consumidor.
- Es un proceso en frío: lo que resulta ventajoso para cualquier alimento, pero especialmente para los alimentos que se comercializan crudos y RTE.
- El tratamiento de los productos en su envase final: evitando la posibilidad de volver a contaminarse además de poderse distribuir inmediatamente tras el tratamiento.
- Conserva la calidad nutricional: a dosis < 10 kGy las pérdidas parciales de nutrientes son menores o al menos iguales a las producidas por otros métodos de conservación que se aplican de forma habitual como el cocinado, pasteurización, etc.
- No desarrolla compuestos tóxicos: como compuestos aromáticos y heterocíclicos. Tampoco induce la formación de grasas trans incluso a dosis de hasta 100 kGy.
- Puede reducir o eliminar algunos componentes tóxicos: como micotoxinas, furanos, acrilamidas, compuestos antinutricionales, nitrosaminas, aminas biogénicas, ácido fítico, entre otros; aunque muchos de estos efectos se han conseguido tras la aplicación de dosis altas (> 5 kGy).
- Es amigable con el medio ambiente: no afecta la capa de ozono, no genera residuos químicos, su huella de carbono es similar a la de otras tecnologías de higienización de alimentos, es una alternativa física al uso de químicos con fines de conservación e higienización de alimentos, previene decomisos y destrucción masiva de alimentos contaminados lo que además facilita el comercio.

Inconvenientes

- Efecto sobre las propiedades sensoriales: es uno de los mayores problemas que acarrea la irradiación de los alimentos, ya que puede inducir cambios del color característico de los alimentos tratados, generar compuestos volátiles de olor desagradable o alterar

negativamente otras características sensoriales (Ahn y col., 2018; Ravindran y Jaiswal, 2019).

- Generación de compuestos tras la irradiación: una preocupación de los consumidores es la presencia en ciertos alimentos de algunos compuestos radioinducidos como las 2-alquilciclobutanonas (2-ACB), procedente de ácidos grasos, formaldehído y acetaldehído, procedente de azúcares, y los procedentes de aminoácidos como el benceno y tolueno. Sin embargo, ninguno de estos compuestos ha mostrado estar inducido por este tratamiento en cantidades suficientes como para afectar la salud del consumidor (Sommers y col., 2013; Song y col., 2014; Barbezán y col., 2017; Ahn y col., 2018).
- La reglamentación: puede ser una gran limitante de su uso, ya que cada nuevo producto que se requiera irradiar necesita de una aprobación específica en cada país.
- Algunas desventajas logísticas para los productores: como las pocas plantas de irradiación autorizadas, la necesidad de tratar un volumen adecuado del producto minimizar el costo unitario del tratamiento, además su aplicación conlleva a un costo adicional relacionada al manejo y transporte, entre otros (Ravindran y Jaiswal, 2019; Prakash, 2020).
- La desinformación del consumidor sobre esta tecnología: una de las grandes desventajas es la falta de comprensión y la connotación negativa del término "radiación" y asociado con "radiactividad" por parte de los consumidores. Esto a su vez ocasiona un temor por parte de los productores y distribuidores. Además, el requisito de etiquetado se percibe como una advertencia más que como simple información. No obstante, este rechazo cambia favorablemente cuando se brinda información adecuada acerca del tratamiento (Fox y col., 2002; Farkas y Mohácsi-Farkas, 2011).

1.5.8.- Regulación de la irradiación de alimentos

La Norma General del Codex para alimentos irradiados del 2003 (CAC, 2003) define las fuentes de radiación que puede ser utilizadas y elabora prácticas generales de higiene, control de procesos y requisitos tecnológicos para este tratamiento. En esta norma se establece que la dosis mínima absorbida debe ser suficiente para alcanzar el objetivo tecnológico que se pretenda y las máximas no deben superar a aquella que ponga en peligro la seguridad del consumidor y del medio ambiente o que afecten negativamente la integridad estructural y sensorial de los alimentos. Además, señala que la dosis máxima absorbida por los alimentos puede exceder los 10 kGy cuando sea necesario para conseguir un objetivo tecnológico.

El marco regulador de la Unión Europea relativo a la irradiación de los alimentos consta de la Directiva 1999/2/CE (Directiva marco) y la Directiva 1999/3/CE (Directiva de

ejecución) (Unión Europea, 1999ab). La directiva marco establece las legislaciones, disposiciones específicas para la elaboración, comercialización e importación de alimentos e ingredientes alimentarios tratados. Además, señala que “La irradiación de alimentos sólo podrá autorizarse si existe una necesidad tecnológica razonable, si no presenta ningún peligro para la salud y se lleva a cabo en las condiciones propuestas, si redunda en beneficio del consumidor y si no se utiliza como sustituto de las prácticas higiénicas y sanitarias o de las buenas prácticas de fabricación o agrícolas”.

La directiva de ejecución establece una lista comunitaria de alimentos que pueden ser tratados con radiaciones ionizantes (EFSA, 2011). Esta lista consta, hasta ahora, de una única categoría de alimentos: hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales (Carreño, 2018; Comisión Europea, 2019). Por tanto, bajo esta directiva, en España pueden irradiarse todos los productos de esta categoría. Sin embargo, cada país miembro puede autorizar la irradiación de otros alimentos y siempre que cuenten con la opinión favorable del Comité Científico de la Alimentación Humana. Solo seis países han autorizado otros alimentos (Tabla 4) para ser irradiados a nivel nacional (Comisión Europea, 2019).

Tabla 4. Lista de los alimentos o ingredientes alimentarios con autorizaciones nacionales para su irradiación: País y dosis máxima de tratamiento (kGy).

Productos	Dosis total máxima autorizada de radiación absorbida (kGy)					
	Bélgica	Chequia	Francia	Italia	Países Bajos	Polonia
Hierbas aromáticas congeladas	10	10	10			
Patata	0,15	0,2		0,15		0,1
Ñame		0,2				0,2
Cebolla	0,15	0,2	0,075	0,15		0,06
Ajo	0,15	0,2	0,075	0,15		0,15
Chalote	0,15	0,2	0,075			0,2
Hortalizas, incluidas las legumbres	1	1				1
Legumbres		1			1	
Frutas (incluye hongos, tomate y ruibarbo)	2	2				2
Fresas	2	2				
Hortalizas secas y frutas pasas	1	1	1		1	
Cereales	1	1				1
Frutas pasas		1				
Copos y gérmenes de cereales para productos lácteos	10	10	10			
Copos de cereales		1			1	
Harina de arroz	4	4	4			
Goma arábica	3	3	3		3	
Carne de pollo		7			7	
Aves de corral	5	5	5			
Volatería (aves domésticas, gansos, patos, pintadas, palomas, codornices y pavos)	7	7				7
Carne de aves de corral recuperada mecánicamente	5	5	5			
Menudillos de aves de corral	5	5	5			
Ancas de rana congeladas	5	5	5		5	
Sangre, plasma y coagulados deshidratados	10	10	10			
Pescados y mariscos (incluidos anguilas, crustáceos y moluscos)	3	3				3
Gambas congeladas (peladas o decapitadas)	5	5	5			
Gambas					3	
Clara de huevo	3	3	3		3	
Caseína y caseinatos	6	6	6			

Fuente: Unión Europea (2009)

Actualmente en la Unión Europea solo puede aplicarse el tratamiento de irradiación en alguna de las 24 instalaciones autorizadas ubicadas en 14 Estados miembros, incluido España (Comisión Europea, 2019). Los principales alimentos irradiados son las ancas de rana (57%) y las hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales (21%). En Tabla 5 se da una relación de los productos alimenticios y las cantidades irradiadas en diferentes países de la Unión Europea en los últimos años.

Tabla 5. Productos alimenticios tratados con radiaciones ionizantes durante el periodo 2016-2017 en la UE: Estado miembro, cantidad tratada (Tm) y dosis absorbida (kGy).

País	Cantidad (Tm)	Productos alimenticios	Dosis absorbida (kGy)
Bélgica	6 949,30	Sangre, plasma y coagulados deshidratados	5,03-6,6
		Ancas de rana congeladas	4,5-5,4
		Aves de corral	3,7-4,1
Países Bajos	1 333,10	Hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales	2-15
		Hortalizas y frutas secas	2-15
España	746,60	Hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales	8,4-9,6
Francia	724,10	Ancas de rana congeladas	1-10
		Hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales	5-10
		Hortalizas y frutas secas	1-10
		Goma arábica	1-10
Hungría	155,50	Hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales	2-10
Estonia	86,60	Hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales	10
Alemania	76,20	Hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales	4-9,31
Polonia	62,27	Hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales	5-10
Chequia	44,00	Hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales	4-9,3
Croacia	33,80	Hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales	10
Noruega	15,23	Hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales	10

Fuente: Comisión Europea (2019)

A nivel internacional, pocos países tienen un reglamento que permita la irradiación de cualquier alimento sujeto únicamente al cumplimiento de la norma del Codex, como, por

ejemplo, Brasil y Singapur. La mayoría de los países siguen optando por aprobar caso por caso la irradiación de un alimento o un tipo de alimentos específicos; es el caso de Estados Unidos, Canadá, Australia, etc. (Roberts 2016).

En Estados Unidos, se pueden irradiar a dosis inferiores a 10 kGy frutas y verduras frescas, semillas para germinar, carne (vaca, oveja, cerdo, cabra y aves), huevos, mariscos y harina de trigo, además de vegetales deshidratados, hierbas y especias (30 kGy) y carne para los programas de vuelos espaciales de la NASA (44 kGy) (Pillai y Shayanfar, 2017; USDA-FDA, 2018). China irradia el mayor volumen de alimentos a nivel mundial; las patas de pollos constituyen el principal producto irradiado, estando permitido el tratamiento de una gran variedad de alimentos, al igual que en la India; mientras que en Japón solo se permite aplicar este tratamiento a la patata. Incluso Vietnam, Singapur, Bangladesh y Tailandia gozan de los beneficios de esta tecnología, albergando un creciente mercado de productos irradiados, muchos de ellos destinados a la exportación (Prakash, 2016; Pillai y Shayanfar, 2017; Ravindran y Jaiswal, 2019; Nishihira, 2020).

Etiquetado de los alimentos irradiados

En el marco de sus reglamentos, la mayoría de los países adoptan la Norma General del Codex sobre el Etiquetado de los Alimentos Preenvasados (CAC, 2010). En esta norma se recomienda el alimento irradiado debe llevar una declaración por escrito en estrecha proximidad a la del nombre del producto indicando dicho tratamiento. El uso del símbolo internacional de irradiación de alimentos, la Radura (Figura 8), es opcional, pero cuando se use debe estar cerca del nombre del producto. Sin embargo, la interpretación y aplicación de las disposiciones de etiquetado es variable dependiendo del país.



Figura 8. Símbolo de Radura que indica que un producto alimenticio ha sido irradiado

La Unión Europea (Comisión Europea, 2011), Singapur (República de Singapur, 2020), Australia y Nueva Zelanda (ANZFSC, 2016), basándose en el derecho del consumidor de tener toda la información disponible disponen que cuando un alimento recibe tratamiento de

irradiación en su totalidad, se debe indicar en el etiquetado, al igual que si este constituye un ingrediente de otro alimento, la misma indicación debe acompañar a su mención en la lista de ingredientes. En la Unión Europea se debe hacer mención en el etiquetado de producto “irradiado” o “tratado con radiación ionizante” (Comisión Europea, 2011). Sin embargo, en la práctica, esto aparentemente no se cumple; en la Unión Europea se irradian anualmente miles de Tm de especias, sin embargo, en el etiquetado de los productos en expendio rara vez figura algún ingrediente como irradiado (Roberts, 2016).

En Estados Unidos, en el caso de los alimentos enteros, debe figurar en la etiqueta la frase "tratado con radiación" o "tratado por irradiación" y, además, el símbolo de Radura. Sin embargo, si un alimento irradiado se convierte en un ingrediente de un alimento no irradiado, no se requiere un etiquetado especial en los envases de venta al por menor (USDA-FDA, 2018). En Malasia (MOHM, 2011) y Canadá (CFIA, 2019) no se requiere el etiquetado si el ingrediente irradiado se encuentra en un porcentaje inferior al 5% y 10% en peso del alimento entero, respectivamente. En la India, el reglamento del etiquetado de los alimentos irradiados (FSSAI, 2011) indica que estos deben llevar el logotipo (en verde) acompañado de información sobre la identificación del producto, el propósito de la irradiación, la instalación donde se realizó y la fecha del tratamiento.

1.5.9.- Identificación de alimentos irradiados

Actualmente, existen diez métodos europeos aprobados por Comité Europeo de Normalización que permiten conocer si un alimento se ha irradiado, constituyendo una herramienta esencial en el control del cumplimiento de la norma de etiquetado de alimentos irradiados. Estos métodos han sido validados, aceptados y estandarizados a nivel mundial; incluso la Comisión del Codex Alimentarius las ha recogido en su Norma General para Alimentos Irradiados. Sólo seis de ellos se consideran métodos de referencia para determinar si un alimento ha sido irradiado. Los otros cuatro son métodos screening y presentan limitaciones por lo que cualquier resultado positivo obtenido debe ser confirmado utilizando un método de referencia. La elección del método más adecuado dependerá del tipo de producto, de la composición química y del estado físico en el que se encuentre en el momento de la irradiación. Debido a la inmensa variabilidad y complejidad de los productos alimenticios, ninguno de los métodos de detección conocidos es adecuado para su aplicación en todo tipo de alimentos (Gryczka y col., 2018; Barreira y col., 2018; Zanardi y col., 2018). Estos métodos se pueden agrupar en tres categorías (físicos, químicos o biológicos) los cuales se presentan a continuación.

Métodos físicos

Se basan en la identificación de radicales estabilizados que han quedado atrapados en los constituyentes de los alimentos irradiados mediante espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (RPE) y métodos que miden la luminiscencia. La metodología RPE se aplica con éxito para el control de alimentos irradiados que contengan tejidos mineralizados como huesos, conchas, cutículas, o cáscaras de huevo (EN 1786: 2000). También puede aplicarse en alimentos que contienen celulosa (EN 1787: 2001) y azúcares cristalizados (EN 13708: 2001).

Por otro lado, la luminiscencia es un método útil para el control en varios tipos de alimentos secos, ya que algunos minerales presentes en estos productos (silicatos) absorben parte de la energía del tratamiento. Sin embargo, para liberar esta energía en forma de luminiscencia se requiere aplicar calor durante el análisis, termoluminiscencia (EN 1788:2001) o luz infrarroja, luminiscencia fotoestimulada (EN 13751: 2009), siendo este último el único método físico de screening (Gryczka y col., 2018; Zanardi y col., 2018).

Métodos químicos

Se basan en la identificación de los productos resultantes de la radiólisis de lípidos, los cuales además pueden deteriorar el sabor de los alimentos irradiados. Actualmente, existen dos métodos de detección química ampliamente aceptados y que son de referencia: el análisis de hidrocarburos (EN 1784: 1996) y la detección de compuestos 2-alkilciclobutanona (2-ACB) (EN 1785: 2003). En general, se recomienda la aplicación de estos métodos cuando el contenido de triglicéridos de los productos tratados (con dosis $\geq 0,5$ kGy) es superior al 1% (Bhattacharjee y col., 2003; Barreira y col., 2018).

En productos cárnicos irradiados, se han descrito numerosos hidrocarburos en como posibles marcadores del tratamiento como n-heptadecano, dimetil disulfuro, 1,7-hexadecadieno, 6,9-heptadecadieno, 1-tetradeceno, n-pentadecano, 1-hexadeceno, 8-heptadeceno, etc. (Barba y col., 2012; Feng y Ahn, 2016; Barreira y col., 2018). Asimismo, los 2-ACB se consideran compuestos químicos formados específicamente por la irradiación, aunque aún existe controversia por un trabajo que lo detectó en anacardos no irradiados. Estos compuestos se han identificado en una gran variedad de alimentos irradiados (carne, quesos, huevos, frutas, etc.), mostrando que sus concentraciones se incrementan conforme incrementa la dosis de irradiación e incluso tras varios meses de almacenamiento (Tsutsumi y col., 2011; Crews y col., 2012; Barbezán y col., 2017; Campaniello y col., 2020).

Métodos biológicos

Se consideran como métodos de screening. La prueba de cometa del ADN (EN 13784: 2001) se basa en identificar los cambios significativos que ocurren en el ADN de las células irradiadas, principalmente la generación de fragmentos en el ADN, que se observan como un patrón de migración de electroforesis específico (Rodrigues y Venancio, 2018).

Asimismo, la cantidad final de células viables en los alimentos irradiados es significativamente inferior a la de los alimentos no irradiados, lo cual puede servir de indicativo de este tratamiento. Una de las metodologías usa la filtración por fluorescencia directa (DEFT, recuento total de microorganismos, viables y no viables) y el recuento de recuento de microorganismos mesófilos aeróbicos (APC, recuento solo de microorganismos viables) (EN 13783: 2001). Otra se basa en los recuentos de bacterias Gram (-) viables (BGN) y el ensayo en que se usa el reactivo de lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL) (EN 14569:2004). LAL es un extracto de amebocitos (células sanguíneas) procedente del cangrejo *Limulus polyphemus*, que se usa para la detección y cuantificación de endotoxinas bacterianas gramnegativas ya que al contacto con LAL lo enturbia y lo transforma en un coagulo de gel sólido. En ambas pruebas, si el recuento de los microorganismos viables, APC o GNB, es considerablemente menor que el recuento total (viables y no viables) obtenido por DEFT o LAL, respectivamente, es indicativo de un alto número de células muertas y, por tanto, de posible irradiación (Rodrigues y Venancio, 2018).

Otras alternativas tecnológicas

Existen métodos biológicos alternativos que, aunque no son métodos estándares, han mostrado cierta eficacia en la identificación del tratamiento de irradiación: la cuantificación de ADN dañado mediante PCR tiempo real, la medición del daño del ADN mitocondrial mediante electroforesis, la citometría de flujo para identificar cambios en el ADN, entre otros. También existen otras técnicas que podrían ser aplicadas en esta vigilancia como la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) además del uso de la nariz electrónica y los biosensores. Estos se perfilan como tecnologías prometedoras debido a su rapidez y, como en el caso de NIR, la utilidad práctica en las operaciones rutinarias a gran escala. Sin embargo, aún se requiere de sistemas de procesamiento de datos y algoritmos que permitan el manejo automatizado. Otros impedimentos son el coste y la necesidad de operadores cualificados, especialmente para el uso del RMN (Rodrigues y Venancio, 2018; Zanardi y col., 2018).

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la última década, la producción y exportación del jamón curado español ha crecido sostenidamente, exportándose miles de toneladas anuales a más de 100 países. Así, en 2018, España exportó 52 mil toneladas de jamón curado, lo que supone un 20% de la producción total y la mayoría de ellos (el 77%) fueron comercializados como jamones deshuesados (Rodríguez, 2018; Cruz, 2019; Mercasa, 2019).

El jamón deshuesado presenta muchas ventajas comerciales; es un jamón curado que tiene un menor tiempo de procesado, brinda una presentación muy atractiva para los consumidores, especialmente para aquellos que no están acostumbrados a la presentación tradicional (con hueso y pezuña), se comercializa envasado a vacío y permite la obtención de otros formatos como el “centro”, “medios centros”, “bloques”, “trozos” y sobre todo, facilita la obtención de lonchas, que es un formato altamente demandado por el consumidor (Cilla y col., 2006; Zhang y col., 2019; Estévez y col., 2015; Rodríguez, 2018). Sin embargo, las condiciones higiénicas en las que se realiza el deshuesado requieren una atención especial ya que esta operación unitaria conlleva indefectiblemente una manipulación adicional, indispensable para la eliminación del hueso, lo que incrementa el riesgo de contaminación con microorganismos patógenos entre los que se encuentra *Listeria monocytogenes*.

Es un hecho conocido que las condiciones físico-químicas, principalmente la baja actividad de agua ($\leq 0,92$) imperantes en un jamón curado convencional, restringen de forma notable el desarrollo de este microorganismo y que incluso el mismo procesamiento puede ocasionar su destrucción (Reynolds y col., 2001; Portocarrero y col., 2002; Stollewerk y col., 2014; Montiel y col., 2020; Serra-Castelló y col., 2020).

Sin embargo, durante el deshuesado, el jamón entra en contacto con máquinas deshuesadoras o cuchillos especiales utilizados a tal fin, así como con superficies potencialmente contaminadas o incluso con operarios, a partir de los cuales se puede contaminar el producto con este patógeno (Martín y col., 2014; Morganti y col., 2016; Alía y col., 2020, D’Arrigo y col., 2020). De hecho, en diferentes trabajos sobre incidencia de *L. monocytogenes* en jamón curado, se ha detectado en 2,3% de productos portugueses loncheados (Mena y col., 2004), 2,7% de productos españoles loncheados (Gómez y col. 2015) y entre 2 y 4,1% de jamones de Parma y San Daniele (Giovannini y col., 2007; Prencipe y col., 2012), aunque los recuentos fueron siempre inferiores a 100 UFC/g de *L. monocytogenes*.

Listeria monocytogenes es una bacteria ubicua que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y, por tanto, siempre está presente en la industria alimentaria, llegando a

formar biofilms, en zonas recónditas de equipos e instalaciones industriales, de muy difícil eliminación, por lo que es frecuente la contaminación de un alimento con este microorganismo durante su preparación. Además, las listerias pueden pasar de unos alimentos a otros mediante contaminación cruzada, lo que alcanza gran importancia en aquellos productos que no requieren tratamiento previo a su consumo. De hecho, se ha descrito por muchos autores que el microorganismo de mayor importancia en los productos RTE es *L. monocytogenes* por su condición psicrotrofa.

El consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* representa un peligro para la salud, ya que es el agente causal de la listeriosis, una enfermedad que afecta principalmente a grupos poblacionales vulnerables (inmunodeprimidos, ancianos, mujeres embarazadas, neonatos y lactantes). Aunque causa un número relativamente bajo de casos, de 0,1 a 10 por cada millón de habitantes al año (WHO, 2018a), clínicamente se consideran graves, ya que más del 90% de ellos resultan en hospitalizaciones con una tasa de letalidad del 20 al 30% (Goulet y col., 2012; Hunt y col., 2018). A modo de ejemplo, en España hubo recientemente un brote durante los meses de verano del año 2019, que se registraron 222 casos, con 6 abortos y 3 fallecidos (WHO, 2019).

Por todo ello, las pérdidas económicas anuales en el sector cárnico son considerables, alcanzando cifras de hasta miles de millones de dólares al año, dependiendo del país (Ivanek y col., 2005; Thomas y col., 2015; Olanya y col., 2019).

Los organismos internacionales encargados de velar por la Salud Pública han establecido normas estrictas para el control de *Listeria* en los alimentos. Así, para los estados miembros de la Unión Europea, el Reglamento (CE) No 1441/2007 establece un máximo de 100 UFC/g de *L. monocytogenes* en el momento del consumo de alimentos como el jamón curado ($a_w \leq 0,92$), que en la práctica equivale a un Objetivo de Seguridad Alimentaria (Food Safety Objective, FSO) < 100 UFC/g ($2 \log$ UFC). En cambio, en Estados Unidos (FSIS, 2015) se aplica la política de “tolerancia cero” (ausencia en 25 g) para todo tipo de alimentos, incluidos aquellos que no favorecen el crecimiento de dicho microorganismo, lo que resulta en un FSO < 4 UFC/100 g ($-1.39 \log$ UFC). En consecuencia, la presencia de tan solo una célula de listeria en el jamón curado, representa un obstáculo para su exportación a países en los que el criterio microbiológico establecido es de ausencia en 25 g, ya que supondría la retirada inmediata del producto. Así, en 2011 se decomisaron en Estados Unidos más de 2,5 toneladas de jamón curado deshuesado de origen español (USDA/FSIS, 2011) debido a la posible presencia de este microorganismo.

Las circunstancias expuestas anteriormente de forma muy resumida permiten deducir la necesidad de higienizar el jamón curado deshuesado, siendo el objetivo prioritario la eliminación de *L. monocytogenes*. Debido a las características del producto, no se puede aplicar un tratamiento térmico por el riesgo de pérdida de la calidad sensorial. Entre las posibles alternativas no térmicas, cabe mencionar las altas presiones hidrostáticas o la irradiación, cuya eficacia en el control de este microorganismo en numerosos productos alimenticios, sin cambios sustanciales en sus propiedades sensoriales, ha sido ampliamente demostrada.

En este trabajo se propone la irradiación con electrones acelerados como una buena estrategia para la higienización del jamón curado deshuesado manteniendo, a su vez, las propiedades originales del producto.

De las diferentes fuentes de irradiación permitidas para su uso en alimentos, los electrones acelerados posiblemente constituyen la forma de irradiación más adecuada, debido a que presenta ciertas ventajas. Para su obtención no se emplean isótopos radioactivos, se generan únicamente con electricidad y se pueden activar y detener a voluntad, por lo que son energéticamente muy eficientes. Sin embargo, presentan como inconveniente una muy limitada capacidad penetración en los alimentos, que varía en función de diversos factores, como el grosor y composición de la matriz alimentaria (Riganakos, 2010; EFSA, 2011; Tahergorabi y col., 2014). Este problema se solventa tratando el producto distribuido en envases con un espesor máximo de 3-4 cm.

Por lo anteriormente descrito, se deduce el interés científico y tecnológico de establecer las condiciones más adecuadas de un tratamiento de irradiación con electrones acelerados para el control de *Listeria monocytogenes* en el jamón curado deshuesado, teniendo en cuenta la limitación que supone su grosor y el indudable interés que tiene el mantenimiento de sus propiedades sensoriales. Además, se ha realizado un estudio de los compuestos volátiles generados durante el tratamiento en un intento de detectar posibles marcadores del tratamiento.

Este trabajo se ha hecho extensivo al estudio de la higienización de jamón curado reestructurado, sin duda con un gran futuro como alternativa al jamón curado deshuesado. La reestructuración de perniles deshuesados en fresco presenta grandes ventajas frente al deshuesado convencional del jamón ya que se evitan las pérdidas que conlleva el deshuesado del producto al final del procesado, brinda una conformación de pieza entera que no requiere modificaciones relevantes, implica un menor tiempo de procesamiento, se mejora por tanto

el rendimiento y se minimizan las pérdidas económicas. El uso de agentes de ligazón aplicados directamente en el pernil fresco ha demostrado ser un método muy útil para la obtención de estos productos reestructurados ya que sus proteínas establecen fuertes interacciones con las proteínas cárnicas y permiten conformar una pieza estable y firme sin que se observen diferencias significativas respecto al jamón deshuesado convencional. Esto permite manipularlo y procesarlo de forma satisfactoria (Romero de Ávila, 2013; Romero de Ávila y col., 2014b).

Sin embargo, la reestructuración también implica una manipulación adicional que aumenta el riesgo de contaminación con *Listeria*. Es, por lo tanto, importante investigar el efecto del tratamiento con electrones acelerados en el control microbiológico de *L. monocytogenes* en jamones reestructurados. Asimismo, es necesario conocer el efecto de la irradiación sobre diferentes aspectos del agente empleado, como su capacidad de pegado, la estabilidad de las interacciones que tienen lugar y la capacidad de penetración de los electrones a su través.

Además de los aspectos tecnológicos abordados, se ha realizado un estudio de los posibles cambios en la expresión génica de las células de *Listeria* que hayan sobrevivido a un tratamiento subletal con electrones acelerados. La atención se ha centrado concretamente en los genes de virulencia y de respuesta al estrés. *Listeria* dispone de un complejo sistema de regulación para la expresión de genes que le confiere capacidad de adaptación y resistencia que le permite sobrevivir en situaciones adversas como deficiencia de nutrientes, presencia de antimicrobianos, bajas temperaturas, así como en situaciones de estrés osmótico, ácido y oxidativo (Gandhi y Chikindas, 2007; Freitag y col., 2009; NicAogáin y O'Byrne, 2016; Bucur y col., 2018; Dorey y col., 2019). Aunque un tratamiento con electrones acelerados bien diseñado sería suficiente para ocasionar la destrucción de este microorganismo, en la actualidad se desconoce su efecto sobre la expresión de los genes en las listerias supervivientes, lo cual resulta de gran interés ya que cabe la posibilidad de que el estrés provocado por el tratamiento induzca su sobreexpresión y las células supervivientes muestren una mayor virulencia lo que supone un mayor peligro para la salud del consumidor (Bae y col., 2012; Wałęcka-Zacharska y col., 2013; Mataragas y col., 2015). Además, el conocimiento de este comportamiento, brindaría sin duda una información clave a tener en cuenta si se pretende reducir la dosis de irradiación en el caso, por ejemplo, de su aplicación en combinación con otras tecnologías.

En consecuencia, el **objetivo final** de este trabajo ha sido establecer las condiciones de un tratamiento con electrones acelerados que permitan alcanzar en el jamón curado deshuesado el objetivo de seguridad alimentaria respecto a *Listeria monocytogenes* manteniendo, a su vez, la calidad sensorial del producto. Además, se pretende conocer el efecto de este tratamiento sobre la expresión de los genes de virulencia y de respuesta al estrés de las células que han sobrevivido a la irradiación.

Para ello se han abordado los siguientes **objetivos parciales**:

- Determinar la dosis de electrones acelerados necesaria para alcanzar el FSO de *Listeria monocytogenes* en el jamón curado deshuesado.
- Determinar la capacidad de penetración de los electrones acelerados en jamón curado deshuesado y su eficacia para eliminar *Listeria monocytogenes*.
- Optimizar el tratamiento con electrones acelerados en función del grosor y de la composición de los jamones curados deshuesados.
- Evaluar el efecto del tratamiento higienizante con electrones acelerados sobre las propiedades sensoriales del jamón curado deshuesado.
- Identificar los compuestos volátiles del jamón curado deshuesado irradiado como potenciales marcadores del tratamiento.
- Determinar el efecto del tratamiento con electrones acelerados sobre la capacidad de unión del plasma en polvo utilizado como agente de ligazón en frío en la fabricación de jamones curados reestructurados.
- Conocer el efecto del tratamiento subletal con electrones acelerados en la expresión de los principales genes de virulencia y de respuesta al estrés de *Listeria monocytogenes* en el jamón curado.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1- Material

3.1.1- Material general de laboratorio

Todo el material de vidrio empleado en el trabajo experimental (vasos de precipitados, pipetas de vidrio, probetas, matraces Erlenmeyer, tubos de centrífuga, desecadores, etc.) fue de la marca Pyrex®.

Las espátulas, cucharas, pinzas y tijeras utilizadas fueron siempre de acero inoxidable.

Las pipetas automáticas monocanales fueron Eppendorf Research® plus (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) modelos 20, 200 y 1000 que dispensan volúmenes de 2-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl, respectivamente, y Discovery Comfort autoclavable (HTL Lab solutions, Varsovia, Polonia) de 1-5 ml.

El agua destilada se obtuvo de un destilador Elix Essential 3 (Merck Millipore, Massachusetts, Estados Unidos) que rinde agua con una resistividad del orden de 15 MΩ.

El hielo triturado se obtuvo en un equipo Hima modelo IMS-85 (Changshu, China) y Scotsman modelo AF-100 (Illinois, Estados Unidos).

Las pesadas ordinarias se realizaron en balanzas monoplato Kern modelos 440-35N y 440-33 (Stuttgart, Alemania) y las de precisión en balanzas analíticas A&D modelo HR-120 (Toshima-Ku, Japón) y Cobos modelo CB complet (Barcelona, España).

Las muestras se almacenaron en refrigeradores Kelvinator (Charlotte, Estados Unidos) y Fagor (Guipúzcoa, España) y en congelación en arcones congeladores Liebherr (Bulle, Suiza) y BIO Memory Friolabo (Meyzieu, Francia).

Los agitadores magnéticos dotados de calefacción fueron Bunsen MC8 (Madrid, España) y Agimatic N (Selecta®, Barcelona, España).

El baño maría usado fue de Bunsen modelo TFB (Madrid, España).

La centrifugación se llevó a cabo en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B (DuPont instruments, Newtown, Estados Unidos) con rotor GSA (diámetro 31 cm) con una capacidad máxima de 6 tubos de 500 ml y de 13000 rpm (27485 g) de velocidad máxima.

Los tubos de centrífuga fueron de polipropileno de 450 ml, de Nalgene centrifuge ware (Thermo Scientific, Estados Unidos).

Las medidas de pH se realizaron en un pH-metro Crison Digital 501 modelo 2001 equipado con un electrodo de vidrio. El calibrado se llevó a cabo con soluciones de pH 7 y 4, todo de Crison Instruments Ltd. (Barcelona, España).

La determinación de la a_w se llevó a cabo en un higrómetro de punto de rocío AQUALAB 4T calibrado con soluciones salinas de verificación de a_w conocida (0,984, 0,920 y 0,760), todo de Decagon Devices Inc. (Washington, Estados Unidos).

Las cápsulas de porcelana utilizadas para la determinación de la humedad y cenizas fueron suministradas por Vidrio Industrial Pobel S.A. (Madrid, España).

La deshidratación de las muestras se realizó en una estufa Heraeus modelo T6200 (Hanau, Alemania).

Las cenizas se obtuvieron en un horno mufla de la marca Heraeus modelo. MR-170 (Hanau, Alemania).

Los desecadores a vacío fueron de vidrio Pyrex® con gel de sílice activado.

El calibre utilizado para la medición de las muestras fue un pie de rey digital Tesa modelo Shop-Cal (Renens, Suiza).

Los reactivos químicos utilizados fueron suministrados por las firmas Merck (Darmstadt, Alemania), Panreac (Barcelona, España), Acros Organics™ (Geel, Bélgica), Scharlab (Madrid, España) y Sigma-Aldrich (Oregón, Estados Unidos).

3.1.2.- Material empleado para ensayos microbiológicos

La homogenización de las muestras se realizó en un Stomacher 400 Mix 2 (AES Laboratoire, Combourg, Francia). Se utilizaron bolsas de plástico estéril con filtro de Sterilin Limited (Birmingham, Reino Unido).

Para las diluciones decimales se usaron microtubos Eppendorf de 1,5 ml con cierre de seguridad PCR-015-500 (Labbox, Mataró, España).

Los medios de cultivo generales usados fueron Caldo Trypticase de Soja (TSB) y Agar Trypticaseína Soja (TSA), de Pronadisa (Condalab) (Torrejón de Ardoz, España).

Para el cultivo de *Listeria* spp. se utilizó el medio selectivo Agar Palcam (CM0877), con suplemento de antibiótico específico para *Listeria* (polymyxina B, acriflavina-HCl y ceftazidima; SR0150E) y la emulsión de yema de huevo (SR0047). Todos fueron de Oxoid (Hampshire, Inglaterra).

Para la esterilización, se utilizaron autoclaves modelos Autester 43-G y Presoclave II de Selecta® (Barcelona, España) y AES-75 R (R.Espinar S.L., Tarrasa, España).

Se utilizaron placas Petri estériles de polietileno de 8,5 cm de diámetro de Fisherbrand™ (Loughborough, Inglaterra).

La incubación de los cultivos se efectuó en estufas programables Heraeus modelo B-6200 (Hanau, Alemania) y Selecta® modelo Incudigit (Barcelona, España).

Los recuentos microbiológicos se realizaron con un contador de colonias Selecta®, modelo Digital S (Barcelona, España).

La agitación de los microtubos en los ensayos microbiológicos y moleculares se realizó en un agitador Reax Top (Schwabach, Alemania) y Bunsen modelo AGT-9 (Madrid, España), respectivamente.

3.1.3.- Material de la Planta Piloto

La Planta Piloto donde se realizó la preparación de las muestras en la mayoría de los experimentos se ubica en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y está gestionada por la Sección Departamental de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria.

Los cuchillos empleados para el corte de las porciones de carne y de jamón fueron de categoría profesional, de acero inoxidable de 21 cm de hoja, de la marca Victorinox modelo Fibrox (Ibach-Schwyz, Suiza).

Los guantes de protección de malla metálica acerada utilizados para cortar o lonchear las piezas cárnicas fueron de la marca Stahlnetz (Handeloh, Alemania).

Las tablas de corte eran de polietileno, homologadas y aptas para uso alimentario y de diferentes tamaños. Las mesas de trabajo eran de acero inoxidable.

La envasadora a vacío fue de Vapta modelo Euvac [750/400] (Humanes de Madrid) y permitió realizar en el interior de las bolsas un vacío de 20 kPa.

Para el envasado al vacío se usaron bolsas laminadas de baja permeabilidad a los gases (35 cm³/24 h m² bares para el oxígeno y 150 cm³/24 h m² bares para el dióxido de carbono) suministradas por Plastiñi (La Rioja, España).

El loncheado de los jamones o trozos de jamón se llevó a cabo en una loncheadora Beckers modelo SP 300 CE DOM (Treviglio, Italia).

3.1.4.- Material biológico

Jamón curado deshuesado

Los jamones curados deshuesados utilizados en esta tesis fueron adquiridos siempre al mismo productor español y estaban estandarizados. Todos ellos procedían de cerdos hembras de raza blanca criados y alimentados bajo las mismas condiciones, madurados durante 11 meses y con un peso estándar de 7-7,5 kg y un valor final de a_w de 0,88-0,89. Se comercializaban siempre envasados al vacío

Microorganismos

Las cepas de *Listeria monocytogenes* usadas en los ensayos fueron cedidas por la Dra. Margarita Medina del Departamento de Tecnología de los Alimentos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria de Madrid. Todas ellas habían sido previamente aisladas de diferentes industrias cárnicas: *L. monocytogenes* S2 (serotipo 1/2a), *L. monocytogenes* S4-2 (serotipo 1/2b), *L. monocytogenes* S12-1 (serotipo 1/2c) y *L. monocytogenes* S7-2 (serotipo 4b).

La cepa de *Listeria innocua* NCTC 11288 (serotipo 6a) fue suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

3.1.5.- Material empleado en el tratamiento de irradiación

La irradiación de las muestras se hizo en la planta de irradiación IONISOS Iberica (Tarancón, Cuenca). Dispone de un acelerador de electrones Rhodotron TT200 (IBA Industrial, Lovain-La-Neuve, Belgium) que puede operar en un rango de 2-10 MeV y a una energía de 40-100 kW, siendo 10 MeV y 80 kW las condiciones utilizadas.

La dosis de irradiación recibida por las muestras se determinó con dosímetros de triacetato de celulosa CTA-125 (Fuji, Japón).

3.1.6.- Material empleado para la preparación de muestras y el análisis de compuestos volátiles del jamón curado deshuesado

Las muestras fueron lonchas de jamón que se picaron con una picadora eléctrica Küken 1, 2, 3 modelo 32742 (Barcelona, España).

Las lonchas picadas se introdujeron en viales roscados de vidrio de 20 ml de capacidad (75,5 x 22,5 mm) con espacio de cabeza (La-Pha-Pack GmbH, Langerwehe, Alemania).

Para la microextracción en fase sólida (SPME) se utilizó una fibra de divinilbenceno/carboxeno/polydimethylsiloxano (DVB/CAR/PDMS) 50/30 mg, gris, de Stableflex, Supelco (Bellefonte, Estados Unidos).

Los compuestos volátiles se analizaron en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N acoplado a un espectrómetro de masas con un detector selectivo 5975, todo de Agilent Technology (Santa Clara, Estados Unidos) y utilizando una columna DB-1 (Agilent Technology, Santa Clara, Estados Unidos) (60 m x 0,25 mm de diámetro interno x 1 µm de espesor de la película) usando Helio (pureza > 99.999%) como gas portador.

La información se procesó mediante el software MassHunter Workstation versión B.07.00 (Agilent Technology, Santa Clara, Estados Unidos).

3.1.7.- Material empleado para el estudio con jamones curados reestructurados

Elaboración de modelos de jamones curados reestructurados

La materia prima utilizada fueron perniles de cerdo blanco deshuesados en fresco adquiridos siempre al mismo proveedor local.

Se utilizó, Plasma Powder FG Porcine (Sonac B.V., Loenen, Países Bajos) como agente de ligazón en frío. Este producto deshidratado se obtiene a partir del plasma sanguíneo del cerdo y contiene entre 70% y 80% de proteínas de las cuales al menos un 4% corresponden a fibrinógeno.

Para el secado/maduración de las piezas cárnicas reestructuradas se utilizó una cámara climática AIR-501 SC Air Frio (Almería, España), dotada con circulación forzada de aire y control de temperatura y humedad.

Material empleado en el ensayo de tracción uniaxial

Los ensayos se realizaron con un texturómetro TA.XT2i Stable Micro System Texture Analyzer controlado mediante el software Texture Expert versión 1.11 o Texture Exponent 32 versión 5.0.6.0. Para la realización de estos ensayos se utilizó una célula de carga de 5 kg. La calibración de fuerzas de esta célula de carga se realizó con una pesa de 2 kg. Todo de Stable Microsystems Ltd. (Surrey, Inglaterra).

Se utilizó una sonda constituida por unas pinzas o mordazas A/MTG de sujeción paralela (Aname, Madrid, España) que permiten hacer una tracción uniaxial en las muestras.

Material empleado para los análisis de microscopía electrónica de barrido

Las muestras se extrajeron de jamones curados con ayuda de un bisturí estéril.

La deshidratación de las muestras se realizó en un secadero por punto crítico Balzers modelo CDP-030 (Freienbach, Suiza).

Las muestras se evaporaron en un evaporador Balzers modelo SCD 004 (Freienbach, Suiza).

La cobertura con grafito se realizó en un equipo Mini Deposition System de Balzers modelo MED 010 (Freienbach, Suiza) y la metalización con oro con un recubridor Emitech modelo K550x Sputter Coater (Reino Unido) (25 mA, 4 min).

El microscopio electrónico de barrido fue un JEOL modelo JSM 6400 (Osaka, Japón).

Las imágenes fueron tomadas con el programa Inca Oxford Image Capture System (Oxford Instruments Analytical Ltd., High Wycombe, Inglaterra).

El glutaraldehído y el paraformaldehído utilizados para el buffer milling (2,5% y 4%, respectivamente) y la acetona para la deshidratación de las muestras mediante inmersión (soluciones de concentración creciente) fueron de Panreac (Barcelona, España).

3.1.8.- Material empleado en la expresión de los genes de virulencia y de respuesta al estrés de *Listeria monocytogenes*

Para los ensayos moleculares se utilizaron pipetas automáticas Finnpiptette (Thermo Fisher ScientificTM, Vantaa, Finlandia) de 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl y 1000-5000 µl.

El agua ultrapura fue obtenida con el sistema de purificación de agua Elix Technology Inside Milli-Q[®] Integral 5 (Merck Millipore, Massachusetts, Estados Unidos).

Los tubos eppendorf se centrifugaron en una centrifuga Eppendorf modelo 5430 R con un Rotor FA 45-30-11 (Hamburgo, Alemania), con una capacidad máxima de 30 tubos de 1,5-2 ml y de 14000 rpm (20817 g), con una carga máxima por diámetro de rotor de 3,75 g.

Los procedimientos para el desarrollo de las técnicas moleculares se realizaron en una cabina de flujo laminar Telstar[®] modelo Mini-V/PCR (Terrassa, España).

La lisis celular se realizó en un baño Heatblock modelo FB15101 (Thermo Fisher Scientific, Nueva Jersey, Estados Unidos) a 65°C.

La extracción de ARN se realizó con el kit comercial The MasterPure™ RNA Purification Kit (Epicentre, Wisconsin, Estados Unidos) que incluía los siguientes reactivos:

- Solución de lisis celular 1 (1 µl of 50 µg/µl Proteinase K en 300 µl de Tissue and Cell Lysis Solution, por cada muestra).
- Solución de lisis celular 2 (2X T y C Lysis Solution)
- Detergente de precipitación de proteínas (MPC Protein Precipitation Reagent).
- DNAsa (5 µl of RNase-Free DNase I en 200 µl de 1X DNase Buffer).
- TE buffer para suspender el ARN

Para la extracción de ARN también se utilizó cloroformo, etanol 70% e isopropanol 99,5% de Acros Organics™ (Geel, Belgica) y Scharlab (Madrid, España).

La crioconservación de las muestras de ARN se realizó en un congelador de -80°C ULT Freezer DW (Haier Biomedical, Uckfield, Inglaterra).

La cantidad de ARN de las muestras se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c (Thermo Fisher Scientific, Nueva Jersey, Estados Unidos) con la ayuda del software NanoDrop™ 2000/2000c versión 1.4.2 (Thermo Fisher Scientific, Nueva Jersey, Estados Unidos) y un ordenador Dell serie Latitude D505.

La síntesis del ADN complementario se realizó con el kit PrimeScrip™ Reagent Perfect Real Time (Takara Bio INC, Shiga, Japón) que contenía los siguientes reactivos: N1 (Buffer, dNTP), N2 (retrotranscriptasa), N3 (Oligo dT), N4 (Random dT) y N5 (agua).

El ADN complementario se obtuvo utilizando un termociclador de PCR convencional Eppendorf Mastercycler modelo AG 22331 (Hamburgo, Alemania).

La expresión génica se determinó con el equipo ViiA™ 7 Real Time PCR System de Applied Biosystems™ y el software ViiA™ 7 versión 1.2.4 de Thermo Fisher Scientific (Nueva Jersey, Estados Unidos) conectado a un ordenador Dell modelo Optiplex Xe.

Se usaron placas de reacción de 96 pocillos (0,1 ml) MicroAmp™ Fast Optical con películas adhesivas MicroAmp™ (Applied Biosystems, California, Estados Unidos).

Para la reacción se utilizó la premezcla Premix ExTaq™ (Takara Bio INC, Shiga, Japón) el cual contenía los nucleótidos, la ADN polimerasa, el buffer ARNasa resistente al calor y cofactores enzimáticos.

El colorante de referencia interno para la normalización de la señal fluorescente y la corrección de las variaciones ópticas de pocillo a pocillo durante el análisis de qPCR a tiempo real fue ROXTM Reference Dye (Takara Bio INC, Shiga, Japón).

3.2.- Métodos

3.2.1.- Revitalización de las cepas de *Listeria*

Las cepas de *Listeria* con las que se trabajó se recibieron liofilizadas en el laboratorio. Para revitalizarlas se tomó una pequeña cantidad de cada cultivo con un asa de platino y se inoculó en 9 ml de caldo TSB, procediendo a incubarlo a 32°C durante 24 h. A partir de este primer subcultivo, se prepararon dos subcultivos sucesivos transfiriendo en cada paso 0,1 ml de un cultivo de 24 h a 9 ml de TSB y se incubaron en las condiciones anteriores. El cultivo final se almacenó hasta su uso a -20°C en caldo TSB con un 10% de glicerol como agente criogénico.

En cada experimento siempre se utilizaron cultivos recientes, por lo que cada vez que se requirieron se procedió a la revitalización de los cultivos congelados a -20°C. Para ello, se procedió como se ha descrito anteriormente, repitiendo durante dos días consecutivos un subcultivo de 24 h en TSB. El último subcultivo fue el que se utilizó para la contaminación de muestras.

Con este proceder, el cultivo de 24 h final tenía una carga microbiana de 10^8 - 10^9 UFC/ml, tasa considerada como adecuada en nuestros experimentos para estudiar con facilidad el comportamiento de las cepas utilizadas en cada uno de los experimentos realizados.

Se confirmó la pureza de cada subcultivo realizando una siembra por estría en TSA e incubando las placas igualmente a 32°C durante 24 h.

3.2.2.- Recuentos microbiológicos

Los recuentos se realizaron siempre mediante diluciones decimales utilizando suero fisiológico [0,85% (p/v) de NaCl] estéril como diluyente.

Las muestras se pesaron primero y se homogeneizaron con una cantidad conocida de suero fisiológico estéril (usualmente 20 ml) en un Stomacher dentro de una bolsa con filtro y durante 2 min. A partir de este homogeneizado se tomaron 100 µl que se transfirieron a un microtubo Eppendorf que contenía 900 µl de suero fisiológico. A partir de esta dilución se prepararon las diluciones decimales requeridas en cada caso. La siembra de los cultivos se

hizo siempre en masa utilizando el agar selectivo Palcam con el suplemento antibiótico y la emulsión yema de huevo. Las placas se incubaron a 37°C durante 48 h.

Todos los recuentos se realizaron por duplicado y los resultados obtenidos se expresaron como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) o gramo de muestra (UFC/g).

3.2.3.- Tratamiento con electrones acelerados

El tratamiento de irradiación se llevó a cabo en la planta IONISOS IBÉRICA S.A. (Tarancón, Cuenca, España) en cuyas instalaciones disponen de un acelerador de electrones de tipo Rhodotron que operaba a 10 MeV.

Independientemente del tipo de muestra que se fuera a irradiar, siempre se transportaron a la planta de irradiación envasadas a vacío en bolsas impermeables a los gases y en condiciones de refrigeración (4°C), para lo que se utilizaron recipientes isotermos de polipropileno expandido.

Para realizar el tratamiento, las muestras se depositaron sobre una cinta transportadora que las transportaba hasta el cono donde se emitía el haz de electrones y las sacaba después hasta la zona de trabajo. La dosis aplicada fue variable en función del diseño de cada experimento y osciló entre 0,5 y 10 kGy.

La dosis absorbida por las muestras se determinó con dosímetros de triacetato de celulosa, que se trataron simultáneamente con las muestras (ASTM, 2013). Estos dosímetros son una cinta de una película que bajo la influencia de la radiación cambia sus propiedades ópticas. La lectura de los dosímetros se realizó en las mismas instalaciones de la planta de irradiación por espectrofotometría a una longitud de onda de 280 nm. Se consideró que el tratamiento era correcto cuando la diferencia entre la dosis emitida y la absorbida fue < 5%. Igualmente se controló la temperatura de las muestras durante el proceso y el aumento nunca fue superior a 2°C.

Tras el tratamiento, las muestras se transportaron hasta el laboratorio en condiciones de refrigeración (4°C) en los recipientes isotermos citados anteriormente. En todos los experimentos se dejaron una o varias muestras sin irradiar a las que se consideró como control (0 kGy) y fueron transportadas a la planta de tratamiento bajo las mismas condiciones que las muestras a tratar.

3.2.4.- Estudio de la cinética de destrucción de las cepas de *Listeria* ensayadas

Preparación de los cultivos

Los cultivos se prepararon inoculando 1 ml de cada cultivo revitalizado en 250 ml de TSB procediendo a su incubación a 32°C durante 24 h. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron en refrigeración (5°C) a 13500 *g* durante 30 min. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se diluyó con 50 ml de suero fisiológico estéril, consiguiéndose de este modo, una suspensión bacteriana que contenía del orden de 10^8 - 10^9 células/ml. Este procedimiento se aplicó en cada una de las 4 cepas de *L. monocytogenes* utilizadas y la de *L. innocua* NCTC 11288.

Inoculación e irradiación de las muestras

A partir de un jamón curado deshuesado se cortaron pequeñas lonchas de 10 g y se inocularon por inmersión durante 10 s en la suspensión bacteriana previamente obtenida conteniendo 10^8 - 10^9 células/ml. Tras ello, se introdujeron de forma individual en bolsas de plástico impermeables a los gases y se envasaron a vacío manteniéndolas a 4°C hasta su tratamiento con electrones acelerados. En este estudio se aplicaron dosis de 0, 0,5, 1, 2 y 3 kGy. Posteriormente, las muestras se llevaron al laboratorio a 4°C y se procedió a realizar el recuento de supervivientes en agar selectivo Palcam.

De forma paralela, se cortaron otras lonchas de jamón de 0,5 cm de espesor que fueron envasadas igualmente a vacío e irradiadas a dosis de 0 (control), 1, 2 y 3 kGy. Tras el tratamiento, estas lonchas se almacenaron en refrigeración (4°C) hasta 30 días y se fueron tomando muestras a lo largo del tiempo (0, 15 y 30 días). La finalidad era detectar los posibles cambios en la calidad sensorial que se pudieran producir con el tratamiento y el almacenamiento, realizando para ello un análisis sensorial mediante una prueba de ordenación cuyo procedimiento se explicará más adelante.

Determinación del valor *D*

A partir de los recuentos obtenidos, se elaboraron las curvas de supervivencia de cada cepa, representándose gráficamente como el número de supervivientes en escala logarítmica en función de la dosis aplicada. Las dosis de reducción decimal (valores *D*) se calcularon a partir de la ecuación de regresión lineal de las gráficas, como la inversa de la pendiente ($D = 1/tg \alpha$) y permitieron determinar, en consecuencia, la radiorresistencia de cada cepa. Los datos obtenidos fueron tratados según lo descrito en el apartado 3.2.13.1.

3.2.5.- Estudio de la capacidad de penetración de los electrones acelerados en jamones curados deshuesados

Este estudio se realizó con cinco jamones curados deshuesados. De cada uno de ellos se extrajeron con un cuchillo cinco bloques de 4 x 5 x 7-9 cm (ancho x largo x alto), aproximadamente (dependiendo del grosor del jamón) en diferentes lugares, obteniendo un total de 25 bloques. Cada uno de los bloques se cortó perpendicularmente en tres partes y se colocaron dos dosímetros en cada superficie de corte. Además, se colocaron dos dosímetros en las superficies superior e inferior de cada bloque (Figura 9). Se anotó la distancia exacta de cada dosímetro a las superficies superior e inferior de cada bloque y se colocaron de nuevo en el lugar que ocupaban inicialmente, recomponiéndose así el jamón original. Finalmente, los jamones se envasaron al vacío y se trasladaron bajo refrigeración a la planta de irradiación donde se aplicaron dosis de 2, 4 y 6 kGy por un lado (tratamiento unilateral). Una vez que las muestras recibieron este primer tratamiento, se extrajeron los bloques de los jamones para retirar uno de los dos dosímetros situados en cada superficie. Los bloques se volvieron a introducir en el lugar que ocupaba en el correspondiente jamón, se dio la vuelta a los jamones y se les aplicó el mismo tratamiento por el otro lado (tratamiento bilateral). Finalmente, se retiraron los dosímetros restantes y se determinó espectrofotométricamente la dosis absorbida por cada uno de ellos con el fin de conocer la dosis que se había recibido en ambas superficies y en cada punto del interior de cada bloque, lo que permitiría evaluar el grado de penetración de los electrones acelerados. Los datos obtenidos fueron tratados según lo descrito en el apartado 3.2.13.1.

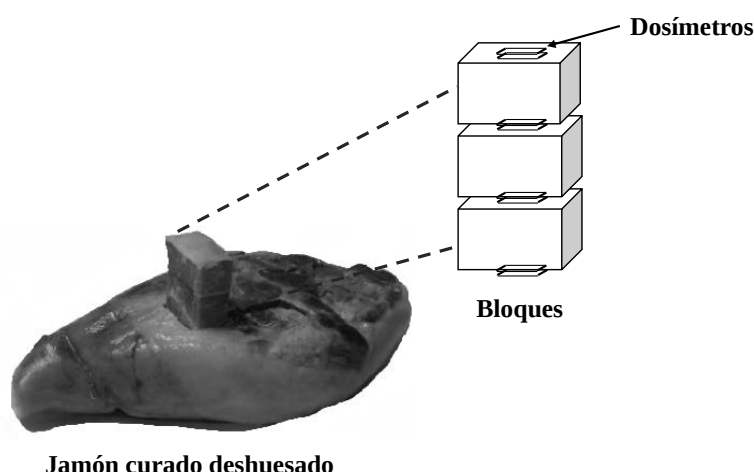


Figura 9. Esquema de las piezas de jamón curado deshuesado utilizadas para el estudio de la penetración de electrones acelerados. La imagen de la derecha muestra la posición de los dosímetros en los bloques de jamón.

3.2.6.- Evaluación del efecto listericida de los electrones acelerados en el jamón curado deshuesado

Este experimento se realizó con dos jamones curados deshuesados. Con un cuchillo de hoja grande se cortaron por la mitad en sentido horizontal intentando pasar por el centro del espacio que previamente había ocupado el hueso. El resultado fue la obtención de dos partes independientes: la parte superior se denominó P1 y la inferior, P2, siendo ésta la que contenía la grasa subcutánea.

De un tercer jamón, se cortaron pequeñas lonchas de 5 x 3 x 0,5 cm (largo x ancho x grosor). En el centro de estas lonchas se depositó directamente un inóculo constituido por 40 µl de un cultivo revitalizado de *L. innocua* NCTC 11288 (10^9 UFC/ml), que se correspondía aproximadamente a 10^7 células. Las lonchas se doblaron sobre sí a modo de pequeños paquetes que dejaban el inóculo en su interior y fueron envasadas mediante termosellado en bolsas de polietileno. Los paquetes se fueron colocando en la superficie de la parte P2 uno detrás de otro recorriendo el espacio donde originalmente se encontraba el hueso extraído. Se necesitaron 18 paquetes para cubrir esta zona en cada jamón. Los paquetes se fijaron con un alfiler sobre la parte inferior y se colocaron dosímetros lo más próximo posible a cada uno para poder comprobar la dosis absorbida. Se recompusieron los jamones colocando cuidadosamente la parte superior sobre la inferior y con la ayuda de un calibre se midió la altura de cada una de las dos partes en los puntos donde cada dosímetro y cada loncha se habían colocado; la altura total del jamón en cada punto fue la suma de las alturas de las dos partes del jamón (P1 + P2).

Finalmente, los jamones se introdujeron cuidadosamente en bolsas, se envasaron a vacío y se llevaron en refrigeración a la planta de irradiación donde se trataron con 2 kGy de forma bilateral. Después del tratamiento, se transportaron al laboratorio a 4°C donde se extrajeron las lonchas de cada bolsa en condiciones asépticas y se procedió a realizar el recuento de los microorganismos sobrevivientes como se describe en el apartado 3.2.2.

3.2.7.- Influencia del espesor del jamón curado deshuesado en el efecto higienizante de los electrones acelerados

Para realizar este estudio, se utilizaron ocho jamones curados deshuesados que se separaron en dos grupos en función de su grosor: el Grupo A estaba formado por los cuatro más pequeños cuyo espesor máximo era ≤ 7 cm y el Grupo B, de otros cuatro cuyo espesor era superior a 7 cm. El corte de los jamones y la preparación de los paquetes contaminados con *L. innocua*, se hizo como se ha descrito en el apartado anterior.

Sin embargo, la distribución de las muestras fue diferente. Cuatro de ellas fueron depositadas sobre la parte inferior de cada jamón, de las cuales, dos se colocaron superpuestas en una zona más cercana al codillo (muestras X) y las otras dos en el lado opuesto, también superpuestas, más cercanas al extremo contrario o punta del jamón (muestras Y), y junto a ellas un dosímetro de triacetato de celulosa, como se puede observar en el esquema de la Figura 10. Las muestras que estaban en contacto con P1 se denominaron X1 e Y1, y las que estaban en contacto con la parte inferior, X2 e Y2. Posteriormente, se recompusieron los jamones poniendo cuidadosamente la parte superior sobre la correspondiente parte inferior y se midió con un calibre el grosor de ambas partes en los puntos donde se habían colocado las muestras en cada jamón.

Los jamones se envasaron a vacío y se llevaron en refrigeración (4°C) hasta la planta de irradiación donde se trataron bilateralmente a diferentes dosis: los jamones del Grupo A se irradiaron con 1 kGy y los del Grupo B, con 2 kGy. Posteriormente, se trasladaron al laboratorio a 4°C para realizar los recuentos microbiológicos correspondientes.

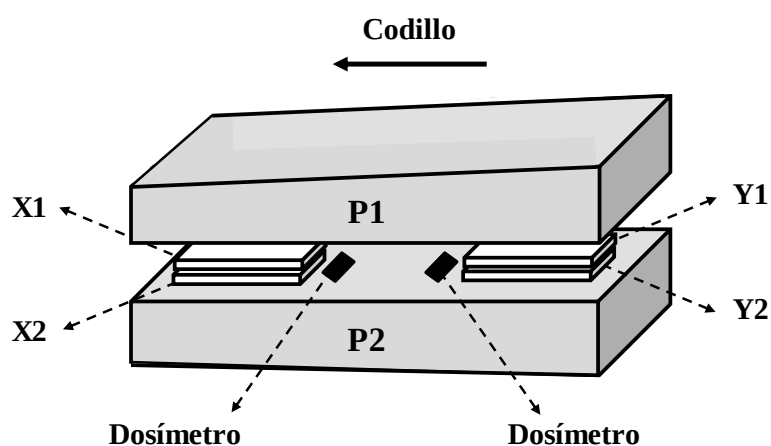


Figura 10. Esquema de la posición de las muestras contaminadas con *Listeria* y los dosímetros en las piezas de jamón utilizadas para el estudio del efecto del espesor del jamón curado deshuesado en electrones acelerados. P1 y P2 partes de un jamón curado deshuesado. X1/Y1 y X2/Y2 muestras contaminadas en contacto con P1 y P2, respectivamente.

3.2.8.- Modelización de la penetración de los electrones acelerados en jamones curados deshuesados

3.2.8.1.-Preparación de las muestras

Para este experimento, se utilizaron jamones curados deshuesados y bloques de tocino de 6-7 cm de espesor adquiridas en un comercio local. A partir de ellos, se cortaron lonchas que medían aproximadamente 10 cm x 8 cm (ancho x largo) y 0,8 mm de grosor, medido cuidadosamente con la ayuda de un calibre. En el caso del jamón, se obtuvieron lonchas solamente de la parte magra y el loncheado del tocino se hizo en frío para obtener cortes limpios. Las lonchas se superpusieron unas sobre otras formando bloques de tres tipos diferentes (Figura 11): unos bloques estaban conformados por 12 lonchas solo de jamón (BJ), otros por 12 lonchas solo de tocino (BT) y un tercer tipo de bloques se formaron con una mezcla de lonchas de ambos (BM) en diferentes proporciones; así, se formaron bloques BM en los que el número de lonchas de tocino fue de una, dos o tres, con el fin de simular una capa de grasa subcutánea con diferentes espesores. Finalmente, los bloques se complementaron con lonchas de jamón hasta alcanzar el número de 12. Todos los bloques se hicieron por triplicado.

Los dosímetros se distribuyeron uniformemente entre las lonchas: en el caso de BJ y BT se colocó un dosímetro entre cada dos lonchas y uno en la superficie inferior y otro en la superior. En el caso de los bloques BM, se colocaron dos dosímetros en las mismas superficies (Figura 11).

Una vez preparados, los bloques se introdujeron cuidadosamente en bolsas de polietileno de baja permeabilidad y se envasaron a vacío. Finalmente, se transfirieron a cajas de poliestireno aislante a 4°C y se transportaron hasta la planta de irradiación.

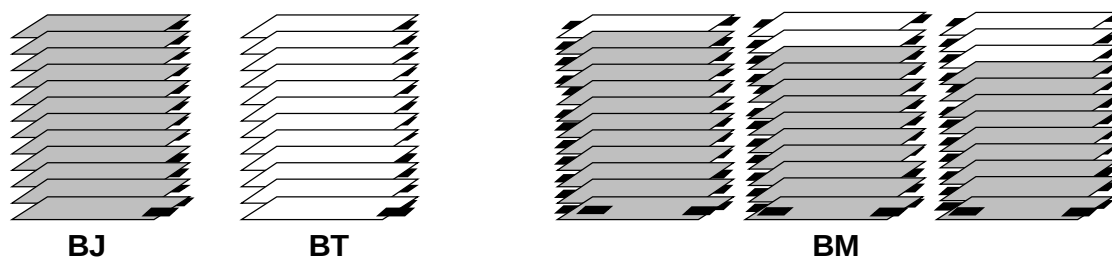


Figura 11. Esquema de los bloques constituidos por lonchas de jamón (color gris) y de tocino (color blanco). BJ: bloques constituidos solo por lonchas de jamón. BT: bloques constituidos solo por lonchas de tocino. BM: bloques mezcla constituidos por lonchas de jamón y una, dos o tres lonchas de tocino. Los dosímetros se muestran como pequeños cuadrados negros.

3.2.8.2.-Tratamiento de irradiación y mapeo de la dosis

Todos los bloques se trataron con una dosis de 2 kGy. Los bloques BJ y BT se trataron unilateralmente y los dosímetros se retiraron después del tratamiento.

Los bloques BM recibieron un tratamiento bilateral. En este caso, tras recibir el primer tratamiento, los bloques se sacaron de las bolsas y se retiró un dosímetro de cada superficie, se recompusieron otra vez y se giraron para recibir un segundo tratamiento por el lado contrario al que recibió el primer impacto. Finalmente, se retiraron los dosímetros restantes. Las dosis absorbidas por todos los dosímetros fueron determinadas por espectrofotometría.

Con los resultados obtenidos se creó un mapa de dosis en el que se relacionaban las dosis absorbidas por cada dosímetro con la distancia de cada uno respecto a la superficie de cada uno de los tres tipos de bloques.

A partir de los datos obtenidos, se determinaron algunos parámetros útiles para describir la distribución de dosis absorbida en función de la profundidad de penetración de los electrones acelerados a través de la matriz de un producto, que están recogidos el IAEA (2002) y se describen a continuación:

- $r_{\max}$: Profundidad en la que se absorbe la dosis máxima
- r_{opt} : Profundidad a la que la dosis es igual a la dosis de entrada
- r_{50} : Profundidad a la que la dosis es igual a la mitad de la dosis máxima
- r_{33} : Profundidad a la que la dosis es igual a un tercio de la dosis máxima

La penetración de los electrones acelerados fue determinada utilizando un modelo constituido por la suma de una función lineal de dos fases y del modelo de inactivación adaptado de la función de Gompertz. Normalmente, el modelo de Gompertz relaciona el factor de respuesta con la variable tiempo; sin embargo, en este trabajo, el tiempo fue sustituido por la profundidad de penetración de los electrones acelerados. El modelo se realizó en colaboración con el Prof. José Javier Benedito Fort y el Prof. Juan A. Cárcel del Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia.

3.2.9.- Análisis sensoriales

Los análisis sensoriales se llevaron a cabo en la Sala de Catas de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, construida de acuerdo con la Norma ISO, DP 6658 (2005). Consta de un área de preparación de muestras, una cocina totalmente equipada y 6 cabinas independientes comunicadas con la zona de preparación mediante un torno. Cada una de ellas está dotada de una mesa de trabajo, una pila, un grifo con agua corriente, iluminación blanca y roja y un ordenador con un software desarrollado específicamente para los análisis que se desean realizar.

El panel de catadores estaba constituido por 30 jueces semi-entrenados, seleccionados entre los miembros del Departamento de acuerdo a sus hábitos alimentarios, su familiaridad con los jamones curados y la reproducibilidad en sus evaluaciones. Los jueces eran mujeres y hombres con edades comprendidas entre 25 y 60 años.

En todos los casos, las muestras se presentaron a los catadores en una placa Petri codificadas con un número de tres dígitos elegidos al azar que impedía su identificación, además de galletas o pan sin sal y agua a temperatura ambiente para limpiar el paladar entre las muestras. Los análisis se realizaron después del desayuno, pero antes de la comida del mediodía.

3.2.9.1.-Prueba de ordenación

La prueba de ordenación se realizó para determinar los posibles cambios sensoriales en lonchas de jamón curado irradiadas con diferentes dosis de electrones acelerados (0, 1, 2 y 3 kGy) y almacenadas en refrigeración (4°C) durante 30 días. Las pruebas sensoriales se realizaron después del tratamiento (día 0) y en los días 15 y 30.

Antes de la realización de las pruebas, las lonchas de jamón se sacaron del envase y se mantuvieron en placas Petri a temperatura ambiente durante 20 min previos a cada cata.

Para el análisis, se ofrecieron a los catadores cuatro lonchas de jamón (una por cada dosis de tratamiento), ordenadas y codificadas con números al azar. Cada catador recibió una hoja con las instrucciones a seguir, en las que se le pedía que evaluara la apariencia, olor, sabor y aceptabilidad general. Con el fin de evitar la influencia del aspecto visual, se indicó a los catadores que debían utilizar luz roja para evaluar el olor y sabor y luz blanca para evaluar la apariencia. Así mismo se les indicó que debían ordenar las muestras según su preferencia para cada característica sensorial, sin posibilidad de omisión o repetición.

La cuantificación del análisis se hizo otorgando a la muestra mejor evaluada una puntuación de cuatro puntos por ser cuatro el número de lonchas sometidas al análisis. La muestra que ocupó el segundo lugar recibió tres puntos, la siguiente dos puntos y la situada en último lugar, 1 punto.

La puntuación final (FS) se calculó con la siguiente fórmula: $FS = (N1 \times 1) + (N2 \times 2) + (N3 \times 3) + (N4 \times 4)$, siendo N1, N2, N3 y N4 el número de panelistas que clasificaron la muestra en la posición 1 (preferencia mínima), 2, 3 o 4 (preferencia máxima) respectivamente (Joanes, 1985).

3.2.9.2.-Prueba de nivel de agrado

Una vez realizado el estudio de la capacidad de penetración de los electrones acelerados en el jamón deshuesado, se procedió a evaluar la calidad sensorial de jamones enteros irradiados no solo tras el tratamiento, sino durante su almacenamiento en refrigeración. El análisis sensorial se hizo mediante una prueba hedónica de nivel de agrado.

Para ello, se tomaron cuatro jamones curados deshuesados que tenían un espesor aproximado de 7 cm, se cortaron en cuatro trozos cada uno que se envasaron a vacío de forma independiente. La mitad de los trozos se irradiaron bilateralmente con 2 kGy y la otra mitad se dejó sin tratar (0 kGy). Después del tratamiento, se procedió a su almacenamiento a 4°C durante 30 días y se realizaron las pruebas sensoriales después del tratamiento (día 0) y en los días 7, 15 y 30.

Para realizar la prueba, las piezas irradiadas y no irradiadas se lonchearon transversalmente y las lonchas obtenidas se dispusieron igualmente en placas de Petri manteniéndolas durante 20 min a temperatura ambiente antes de cada cata.

A los catadores se les ofrecieron lonchas tanto de jamón tratado como sin tratar. Cada catador recibió una hoja con las instrucciones a seguir durante la prueba en las que se les indicaba que debían calificar el color, la textura, el olor, el sabor y la aceptabilidad general del producto sobre una escala hedónica no estructurada de 10 cm mediante una línea vertical según su valoración. En cada uno de los extremos de esta escala, había un marcador: 0 = muy desagradable y 10 = muy agradable, además de una línea central que indicaba la mitad de la escala y que ayudaba al juez a identificar el punto de indiferencia. Para interpretar los resultados, esta escala hedónica se convirtió en numérica transformando a centímetros la distancia entre los dos extremos y el punto de respuesta marcado por el juez para cada uno de los parámetros sensoriales analizados.

3.2.10.- Identificación de compuestos volátiles como posibles indicadores de tratamiento de irradiación con electrones acelerados en jamón curado

3.2.10.1.- Preparación y tratamiento de las muestras

Para este experimento se partió de tres jamones deshuesados comerciales. Se cortaron lonchas del *Biceps femoris* de 10 g aproximadamente, procurando que siempre tuvieran una parte magra y una parte de tocino. Se envasaron a vacío y unas muestras se dejaron sin tratar (0 kG) para usarlas como control y las restantes se sometieron a un tratamiento con electrones acelerados a dosis de 2 y 10 kGy, esta última como ejemplo de una dosis excesiva para el tratamiento de este producto. Al regreso al laboratorio, las lonchas se almacenaron a 4°C durante 30 días, tomando muestras los días 1 (el siguiente al tratamiento), 15 y 30. Las muestras se mantuvieron a -80°C hasta el momento del análisis.

3.2.10.2.- Análisis de compuestos volátiles

El análisis de los compuestos volátiles fue realizado mediante cromatografía de gases unida a espectrometría de masas (GC-MS) en el Servicio de Análisis e Innovación en Productos de Origen Animal (SIPA) de la Universidad de Extremadura.

Para proceder al análisis, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se retiró la parte de tocino de cada loncha y se picó la parte magra con la ayuda de una picadora eléctrica. Se colocaron $2 \pm 0,005$ g de este picado dentro de un vial de vidrio con espacio de cabeza evitando apelmazar la mezcla y se tapó con una tapa que presentaba un septo de goma. Los volátiles se extrajeron mediante una microextracción en fase sólida (SPME), usando una fibra de DVB/CAR/PDMS. Se hizo pasar la fibra a través de la goma de la tapa dejándola durante 30 min en contacto con el espacio de cabeza del vial que permaneció sumergido todo ese tiempo en un baño maría a 40°C.

Tras la extracción, la fibra del SPME fue transferida al inyector del cromatógrafo, donde permaneció 5 min a la temperatura del puerto de inyección, que se mantuvo a 250°C en modo “splitless”; aunque el tiempo total que permaneció la fibra en el inyector fue de 20 min, tiempo suficiente para permitir su limpieza antes de la siguiente extracción. Luego de la inyección al cromatógrafo, el análisis transcurrió de manera autónoma y bajo los parámetros señalados a continuación:

- Se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent Selective detector 6890) acoplado a un espectrómetro de masas (Mass Selective detector 5975) utilizando una columna DB-1 y helio como gas transportador a una presión de 19.4 psi con un flujo

constante de 1,2 ml/min y una velocidad media de 28 cm/seg. La temperatura inicial del horno se mantuvo a 40°C durante 5 min y fue incrementando a razón de 5°C/min hasta 230°C y luego 25°C/min hasta 250°C, temperatura final en la que permaneció durante 1 min.

- La temperatura de línea de transferencia del cromatógrafo al espectrómetro se mantuvo constante a 250°C. El espectrómetro de masas operó a una energía de 70 eV y a un voltaje múltiple de 1650 v. La temperatura de la fuente de iones y del cuadrupolo fue de 230°C y 150°C, respectivamente. El espectrómetro escaneó con una relación de m/z desde 35-350 y el escaneo duró 224,25 ms con una velocidad de escaneo de 4,5 scans/s.

La información recogida se procesó mediante el análisis de cada espectro de masa usando el software MassHunter Workstation (Agilent, v. B.07.00). Los espectros obtenidos se compararon con la biblioteca NIST (v. 2011). La identificación de los compuestos volátiles finalizó cuando el software mostraba un porcentaje de probabilidad del 98%. Los nombres de los compuestos identificados se acompañaron de su respectivo número de registro CAS para una mayor precisión, ya que es conocido que un mismo compuesto puede tener varios nombres o incluso dos compuestos podrían compartir nombres similares. El número CAS es una identificación única de un compuesto químico que ha sido asignada por la “Chemical Abstracts Service” de la sociedad Americana de Química.

3.2.11.- Efecto del tratamiento con electrones acelerados en la capacidad de unión del plasma en polvo utilizado para elaborar jamones curados reestructurados

Este estudio se realizó con sistemas modelo de jamones curados reestructurados (MJR) preparados a partir de trozos de carne fresca de cerdo y utilizando plasma en polvo (PP) de origen porcino como agente aglutinante en frío. Los sistemas modelo se procesaron de acuerdo con el diagrama de flujo que se muestra en la Figura 12.

El estudio se realizó con 32 modelos. La mitad de ellos (16) se contaminó con *L. innocua* (CL) y se utilizaron para el estudio microbiológico y la otra mitad no se contaminó (NC) siendo estos modelos los que se utilizaron para estudiar la evolución de los parámetros físico-químicos, la fuerza de pegado del agente de ligazón utilizado y la microestructura.

Todos los modelos, contaminados o no, fueron sometidos inicialmente a una fase de pegado, para conformar las piezas cárnicas reestructuradas, y luego se llevaron a las fases de salazón y post-salado. Posteriormente, la mitad de los modelos contaminados con *L. innocua* (8) se sometieron a un tratamiento con electrones acelerados (CL-T) y los ocho

restantes no se trataron, utilizándose en consecuencia como control (CL-NT). El mismo procedimiento se realizó con los 16 modelos que no se contaminaron con *Listeria*: 8 se trataron con electrones acelerados (NC-T) y los restantes, no (NC-NT). Finalmente, todos los modelos fueron sometidos al período de secado- maduración.

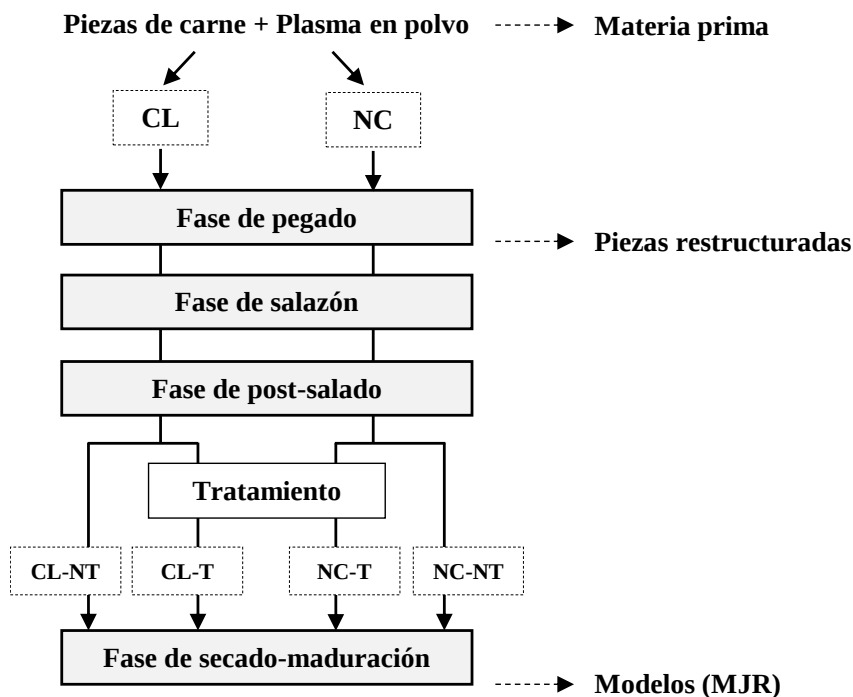


Figura 12. Diagrama de flujo del proceso. CL: Muestra contaminada con *Listeria*; NC: Muestra no contaminada; CL-NT: Muestra contaminada con *Listeria* y no tratada; CL-T: Muestra contaminada con *Listeria* y tratada con electrones acelerados; NC-NT: Muestra no contaminada y no tratada; NC-T: Muestra no contaminada y tratada con electrones acelerados; MJR: Modelo de jamón curado reestructurado.

3.2.11.1.- Elaboración de modelos de jamón curado reestructurado (MJR)

Para simplificar el ensayo y facilitar el manejo en el laboratorio, se desarrollaron unos modelos con los que se reprodujo a pequeña escala un jamón curado reestructurado.

Se partió de 7 pernils de cerdo frescos enteros deshuesados. Se perfilaron retirando los bordes externos y las porciones más distales de modo que se pudiesen obtener piezas con un contorno regular y homogéneo que permitiera un buen manejo de las piezas en fresco. La reestructuración de las piezas cárnicas se visualiza en la Figura 13.

De cada pernil perfilado se cortaron cinco piezas de 1 kg de peso, aproximadamente (Figura 13A) obteniéndose un total de 35 piezas, de las cuales 16 fueron seleccionadas aleatoriamente para su contaminación con *L. innocua* (ver siguiente apartado) y otras 16 se mantuvieron sin contaminar, descartándose las tres restantes. Luego, cada pieza se cortó por

la mitad horizontalmente quedando abierta "como un libro" (Figura 13B) y las dos superficies se espolvorearon con aproximadamente 20 g de PP distribuyéndolos de forma homogénea por toda la superficie expuesta (Figura 13C). Posteriormente se unieron las dos superficies espolvoreadas. Luego las piezas ya conformadas se envasaron a vacío y se mantuvieron a 4°C durante 24 h con el fin de favorecer su unión (Figura 13E) (fase de pegado). Después de este periodo, las piezas cárnicas ya reestructuradas fueron retiradas de las bolsas de plástico (Figura 13F) y se pasó a convertirlas en modelos de jamón curado reestructurado.

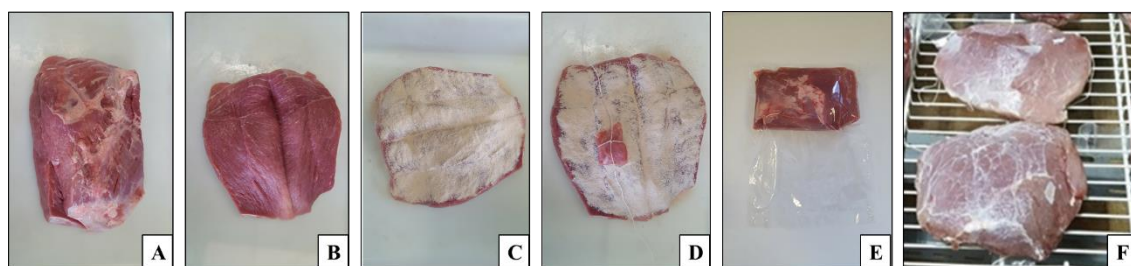


Figura 13. Proceso de elaboración de las piezas cárnicas reestructuradas: A. Piezas cárnicas originales (1 kg aprox); B. Corte horizontal de la pieza cárnica (abierto "como un libro"); C. Plasma en polvo espolvoreada sobre las superficies de corte; D. Colocación de la loncha de carne contaminada con *Listeria* sobre la superficie de corte espolvoreada con plasma en polvo; E. Reconstitución de la pieza cárnica y envasado a vacío para la fase de pegado; F. Vista de la pieza cárnica reestructurada para someterse al proceso adaptado de fabricación.

En estas piezas se realizaron los análisis físicos-químicos, la determinación de la fuerza de pegado y la microestructura de la zona de pegado a lo largo del procesado: fases de pegado, salado, post-salado, y a la mitad y al final del período de secado-maduración.

3.2.11.2.- Contaminación de las piezas cárnicas reestructuradas

Se prepararon lonchas de carne magra de cerdo (10 g de peso, aproximadamente), en cuyo centro se depositó un inóculo con aproximadamente 10^5 células de *L. innocua* NCTC 11288. Este microorganismo se revitalizó de acuerdo a lo descrito anteriormente (véase apartado 3.2.1).

Las lonchas contaminadas se doblaron sobre sí quedando el inóculo en el interior. Se formaron así pequeños paquetes que se ataron con un cordel largo, y que se dispusieron en el modelo sobre una de las superficies de corte ya espolvoreada con el PP (Figura 13D). Los extremos del cordel se dejaron por fuera para facilitar su posterior localización.

Finalmente, las piezas se envasaron a vacío para su pegado y siguieron el procesamiento descrito anteriormente hasta la obtención de MJR contaminados; la mitad de ellos fueron irradiados y la otra mitad no. En estas piezas se realizaron recuentos de *L. innocua* a lo largo

del procesado: fases de pegado, salado, post-salado, y al inicio, a la mitad y al final del período de secado-maduración.

3.2.11.3.- Establecimiento de las condiciones de procesado para los MJR

En primer lugar, se hicieron diferentes pruebas intentando establecer una equivalencia entre las condiciones de procesado de los jamones curados convencionales y las que serían necesarias para estos modelos. El estudio se realizó en cámaras a temperaturas y humedad relativa en torno a los valores utilizados en un jamón convencional (Asensio y Díaz, 2001; Ventanas y Cava, 2001; Toldrá y Aristoy, 2010; Estévez y col., 2015; Bosse y col., 2018) e intentando ajustar las condiciones de cada una de las etapas al peso de las piezas en cada fase. Se fueron determinando los parámetros físico-químicos (pH, a_w , humedad, cantidad de sal) de los modelos a lo largo del procesado y se realizaron cuantos ensayos fueron necesarios hasta comprobar que las condiciones establecidas permitían obtener unos jamones a pequeña escala, cuyas características fuesen lo más similares posible a las de un jamón convencional. Así, las condiciones más adecuadas para el tamaño de nuestros modelos fueron las siguientes:

Fase de salazón: Las piezas reestructuradas se cubrieron con una mezcla de sal gruesa y fina (1/1, p/p) adquiridas en un comercio local, y se mantuvieron a 4°C durante 18 h por kg de pieza con un 90% HR. Transcurrido este tiempo, se eliminó la sal pegada en la superficie mediante un cepillado.

Fase de post-salado: Se desarrolló durante 3 días a 4°C y 80-90% HR para favorecer la distribución de la sal por el interior de la pieza.

Una vez finalizada esta fase, los modelos se dividieron aleatoriamente en dos grupos: uno de ellos no recibió tratamiento y el otro fue sometido a tratamiento con electrones acelerados a una dosis de 2 kGy de forma bilateral y de acuerdo con lo descrito anteriormente.

Fase de secado/maduración: Todas las piezas, irradiadas o no, se llevaron a una cámara donde se mantuvieron a 15°C y 80% HR hasta el final del proceso. Este periodo duró aproximadamente 33 días.

3.2.11.4.- Análisis de los parámetros físico-químicos

A lo largo del procesado, se fueron tomando muestras para hacer un seguimiento de los parámetros físico-químicos. Las medidas de cada muestra se efectuaron por triplicado.

Actividad de agua (a_w)

Se llevó a cabo utilizando un higrómetro de punto de rocío. Las medidas se realizaron a una temperatura de 25°C introduciendo en la cubeta del higrómetro una cápsula con aproximadamente 2 g de muestra picada en trozos pequeños (< 5 mm). Tras 1 o 2 min aproximadamente, cuando se alcanza el punto de rocío, el aparato proporcionó la lectura.

pH

Para la determinación del pH se homogenizó 1 g de las muestras con 9 ml de agua destilada (1:10) (w/v) en un Stomacher y durante 1 min. El pH de la dilución resultante se midió a temperatura ambiente con un pH-metro.

Humedad, cenizas y contenido de sal

El contenido de humedad se determinó según el método descrito por la AOAC (2011) utilizando cápsulas de porcelana deshidratadas mediante calentamiento en una estufa a 110°C durante 2 h. Tras enfriamiento en un desecador, las cápsulas se pesaron vacías en una balanza de precisión. Posteriormente se pesaron en ellas 2 g de la muestra fresca. Se deshidrataron a 110°C hasta peso constante, se enfriaron en un desecador de vidrio durante 20 min y se pesaron de nuevo. El extracto seco, en porcentaje, se obtuvo de la relación entre el peso de la muestra seca y el de la muestra fresca multiplicado por 100. El porcentaje de humedad se obtuvo restando del 100% el extracto seco.

La determinación de cenizas se hizo en un horno mufla a 550°C hasta peso constante en aproximadamente 24 h. El contenido de cenizas se calculó mediante la relación entre el peso de las cenizas y el de la muestra fresca y se expresó por 100 g de producto.

El contenido de sal se estimó como la diferencia entre el contenido de cenizas de una muestra fresca y una procesada (Romero de Ávila y col., 2010).

3.2.11.5.- Análisis microbiológicos

Para extraer las muestras y proceder al análisis microbiológico, los MJR contaminados se abrieron con la ayuda de un cuchillo y se localizaron los paquetitos contaminados siguiendo el cordel. Con la ayuda de un bisturí se extrajo el paquetito, circunscrito por el mismo cordel, y aproximadamente 5 mm de material alrededor del mismo para asegurar su extracción total. El conjunto extraído se colocó en una bolsa de Stomacher y se homogenizó con 40 ml de suero fisiológico estéril durante 2 min en un Stomacher. Finalmente se realizaron diluciones decimales y recuentos microbiológicos, tal como se describe en el apartado 3.2.2.

3.2.11.6.- Determinación de la fuerza de pegado del plasma en polvo (PP)

Para determinar la fuerza de pegado (fuerza de unión o ligazón) del PP en los modelos de jamones curados reestructurados, se realizó un ensayo de tracción uniaxial según lo descrito por Romero del Ávila y col. (2014b), utilizando el texturometro TA.XT2i Stable Micro System Texture Analyser. Para ello se tomaron muestras de aproximadamente 0,4 cm de alto x 2 cm de ancho x 2 cm de largo utilizando un bisturí y asegurando que la línea de pegado estuviera siempre en el centro de la muestra. Las pinzas A/MTG fueron colocadas a una distancia de 15 mm entre sí. Una de las pinzas de tracción se fijó en la base del texturómetro, mientras que la otra se fijó a la célula de carga (Figura 14). Las muestras se sujetaron entre las dos pinzas y el ensayo se realizó aplicando una tracción constante de 0,5 mm/s hasta la ruptura. Se realizaron 10 pruebas por cada pieza en los días antes mencionados. La fuerza de ruptura se determinó como la altura máxima del pico de fuerza (N) necesaria para romper la muestra y a partir de ella se calculó la fuerza de unión según la siguiente expresión:

$$\text{Fuerza de pegado (N/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Fuerza de ruptura (N)}}{\text{Área de la muestra (grosor x ancho)}}$$



Figura 14. Texturómetro TA.XT2i Stable Micro System Texture Analyser utilizado en las determinaciones de la fuerza de pegado. A la derecha se observa la sonda A/MTG durante el ensayo.

3.2.11.7.- Determinación de la microestructura

La microestructura de la línea de pegado de los modelos reestructurados se visualizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). El estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Microscopía y Citometría de la Universidad Complutense de Madrid. El microscopio de barrido utiliza un haz de electrones que impacta sobre la superficie de la

muestra forzando la producción de electrones secundarios y electrones retrodispersados que, finalmente, son conducidos a un detector que permite la posterior representación gráfica en forma de imagen. Esta técnica requiere muestras que primero se hayan deshidratado para después hacerlas conductoras, con un metal pesado.

Con ayuda de un bisturí se cortaron pequeños cubos de aproximadamente 0,5 cm de lado, asegurando que la línea de pegado estuviera siempre en el centro. Las muestras se fijaron durante 5 h a 4°C en el buffer milling y posteriormente se realizaron dos lavados de 10 min cada uno con agua destilada. Luego se deshidrataron por inmersión en soluciones de acetona de concentraciones crecientes (30%, 50%, 70%, 80%, 90% y 100%) manteniéndose dos veces durante 15 min en cada una de ellas.

Finalmente, las muestras se secaron en dióxido de carbono en punto crítico líquido, se cubrieron con oro y grafito y se mantuvieron en un desecador hasta el momento de la visualización. Las micrografías de cada muestra se tomaron por el SEM con diferentes aumentos (x100, x1000 y x5000) en un mínimo de cinco fotografías representativas en cada aumento y se seleccionaron las más representativas. Las muestras se tomaron al final de la fase de post-salado y secado-maduración.

3.2.12.- Efecto de los electrones acelerados sobre la expresión de los genes de virulencia (*plcA*, *hly* e *iap*) y de respuesta al estrés (*sigB*) de *Listeria monocytogenes*.

El estudio de la expresión génica fue realizado en el Instituto Universitario de Investigación de la Carne y Productos Cárnicos (IProCar) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura.

3.2.12.1.- Preparación de las muestras

Para este ensayo, se prepararon 84 lonchas de jamón curado de 10 g y cada una de ellas fue contaminada por inmersión durante 10 s en una suspensión que contenía aproximadamente 9 log UFC/ml de *L. monocytogenes* S4-2 (serotype 1/2b). Posteriormente, todas las lonchas fueron envasadas a vacío y transportadas para su tratamiento con electrones acelerados. Unas muestras se dejaron sin tratar (grupo control), y a las muestras restantes se aplicaron dosis de 1, 2 y 3 kGy. Posteriormente, se almacenaron durante 30 días a temperaturas de 7 y 15°C. Ambas consideradas como abuso de temperatura durante el almacenamiento de alimentos a nivel de operadores de empresas alimentarias, minoristas y consumidores (CRL/AFSSA, 2008). Los análisis se realizaron por triplicado a los 0, 7, 15 y 30 días de almacenamiento.

En el día del análisis, cada loncha se homogenizó con suero fisiológico estéril en una bolsa de Stomacher con filtro y se realizó un recuento microbiológico (apartado 3.2.2) para determinar el efecto listericida del tratamiento. El homogeneizado restante se utilizó para los ensayos posteriores.

3.2.12.2.- Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó el kit comercial de extracción The MasterPure™ RNA Purification Kit y se procedió siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

Se tomó 1 ml del homogenizado obtenido en el paso anterior, se colocó en microtubos Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 10000 rpm a 4°C durante 10 min, que son las condiciones que se usaron en todos los procesos de centrifugación en este apartado. Se retiró el sobrenadante con una pipeta y el sedimento se resuspendió en 300 µl de la solución de lisis celular 1. La mezcla se incubó a 65°C por 15 min, agitándose cada 5 min y, una vez finalizado este paso, se introdujo en hielo durante 5 min para detener la reacción. Luego se añadieron 300 µl de cloroformo y se centrifugó con el fin de descartar la grasa presente. Se transfirieron 200 µl del sobrenadante a un nuevo microtubo de 1,5 ml y se añadieron 175 µl del detergente de precipitación de proteínas homogeneizando con un agitador durante 10 s antes de centrifugarlo en las condiciones antes descritas.

El sobrenadante obtenido, que contenía el material genético, se transfirió a un nuevo microtubo al que se añadieron 500 µl de isopropanol; la mezcla se llevó a -20°C durante 20-30 min y luego se centrifugó. Se retiró el sobrenadante que contenía el isopropanol procurando mantener intacto el sedimento con el material genético. Este sedimento se suspendió en 200 µl de la solución de DNAsa y se incubó a 37°C por 15 min. Posteriormente, se agregaron 200 µl de solución de lisis celular 2 y 200 µl del detergente de precipitación proteica. La nueva mezcla, ahora de apariencia blanquecina, se colocó en hielo 5 min antes de centrifugarlo. El sobrenadante, que contenía el ARN, se transfirió a otro microtubo de 1,5 ml al que se agregaron 500 µl de isopropanol y se volvió a centrifugar. El sedimento resultante, se lavó con 200 µl de etanol 70% y se volvió a centrifugar. Se retiró el sobrenadante conteniendo el etanol, y el sedimento con el ARN se resuspendió en 35 µl del buffer TE. Finalmente, se determinaron la concentración y pureza del ARN presente en cada suspensión midiendo la absorbancia, a 260 y 280 nm, en el espectrofotómetro NanoDrop. También se evaluó 1 µl del buffer TE a modo de blanco. Finalmente, la muestra se congeló a -80°C hasta su análisis posterior.

La concentración de ácidos nucleicos en la muestra se calculó teniendo en cuenta que una densidad óptica de 1, leída a 260 nm, corresponde aproximadamente a 40µg/ml de ARN. La relación de las absorbancias a 260 y 280 nm ($A_{260/280}$) proporciona una estimación de la pureza del ácido nucleico, siendo valores adecuados los comprendidos entre 1,8 y 2.

3.2.12.3.- Síntesis del ADN complementario

La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó mediante la técnica denominada retrotranscripción (transcripción inversa), el cual sintetiza una cadena de ADN a partir de ARN gracias a una polimerasa dependiente de ARN conocida como retrotranscriptasa o transcriptasa inversa; por ende, para obtener el ADNc se usó el ARN extraído previamente y mantenido en congelación. La concentración de ARN se normalizó con agua Milli-Q a 25-50 ng/µl, y posteriormente se sintetizó el ADNc mediante el kit PrimeScrip™ Reagent. Para ello, se colocaron 5 µl de la mezcla de reactivos del kit (Tabla 6) y 5 µl del ARN previamente normalizado (mezcla denominada “master mix”) en microtubos de 0,1 ml, y la mezcla se llevó a un termociclador en las siguientes condiciones: un primer ciclo a 37°C por 15 min (para la transcripción inversa) seguido de un ciclo a 85°C por 5 s (para la inactivación de la enzima) y una etapa final de enfriamiento a 4°C. En cada ensayo se incluyó un blanco en el cual se reemplazó el ARN por 5 µl de agua desionizada estéril. El ADNc resultante se almacenó a -20°C para su análisis posterior.

Tabla 6. Mezcla de reactivos para la reacción de transcripción inversa

Reactivo	µl (x1)
N1 (Buffer, dNTP)	2,0 µl
N2 (retrotranscriptasa)	0,5 µl
N3 (Oligo dT)	0,5 µl
N4 (Random dT)	0,5 µl
N5 (agua de PCR)	1,5 µl

3.2.12.4.- Evaluación de los genes de virulencia *plcA*, *hly*, *iap* y de respuesta al estrés *sigB*

En este ensayo se procedió a la amplificación de genes de respuesta al estrés *sigB*, los genes de virulencia *plcA*, *hly* e *iap* y un el gen constitutivo IGS (Intergenic región spacer, rRNA 16S y 23S). Este gen constitutivo se amplificó simultáneamente junto con los genes diana como control de los procesos, es decir, como un control de amplificación interna

(Hoorfar y col., 2003), de forma similar a lo descrito en estudios previos (Rantsiou y col., 2012; Alía y col., 2019), a fin de asegurar la idoneidad de la extracción del RNA, de síntesis del ADNc y, en general, evitar la presencia de falsos negativos. Los cebadores y sondas usadas se muestran en la Tabla 7. La amplificación de estos genes se realizó en un equipo de qPCR (ViiA™ 7 Real Time PCR System) y la expresión de los genes diana (*plcA*, *iap*, *hly* y *sigB*) se cuantificó con la ayuda del software del equipo (Viia 7 V.1.2.2).

Para la amplificación de ADNc se usaron las proporciones de reactivos y condiciones descritas por Alía y col. (2019). Para el ensayo, 5 µl del ADNc previamente sintetizado se diluyeron en 45 µl de agua de PCR (1:10). En todas las reacciones de qPCR se usaron protocolos de la metodología TagMan. Se llevaron a cabo en un volumen final de 12,5 µl, que contenía 2,5 µl del ADNc, 7µl de Premezcla Premix ExTaq™, 0,125µl del colorante de referencia 50x ROX™, diferentes concentraciones de los cebadores y sondas correspondientes a cada gen evaluado (Tabla 7) y se completaba con agua de PCR. En todas las reacciones se incluyeron tres muestras control con agua desionizada estéril en lugar de ADNc. Cada una de las muestras de ADNc se amplificó por triplicado.

El número de copias de genes se determinó interpolando el valor del ciclo de cuantificación (o ciclo de la qPCR en que se detecta el primer incremento de fluorescencia) de la muestra de ADNc analizada en las curvas estándar determinadas previamente para cada uno de los genes estudiados de acuerdo con la metodología descrita por (Alía,2019). El resultado obtenido fue la expresión génica absoluta.

A continuación, se estableció una relación entre la expresión génica absoluta y el número de listerias supervivientes a cada uno de los tratamientos aplicados ($\text{Log} [\text{copias del gen}/(\text{UFC/g})]$).

Tabla 7. Secuencia de los cebadores y sondas TaqMan usadas y de las condiciones de temperatura de cada ciclo del ensayo de RT-PCR.

Genes	Cebadores	Secuencias (5'-3')	Tamaño del producto (pb)	Concentración (μM)	Condiciones	Referencias
<i>plcA</i>	<i>plcA_f</i>	CTAGAAAGCAGGAATACGGTACA		300		
	<i>plcA_r</i>	ATTGAGTAATCGTTTCTAAT	115	300	95°C-1 min 55°C-1 min	(Rantsiou et al., 2012)
	Sonda <i>plcA</i>	[HEX]-AATTATTAAATGCATCCTTTTCAGGT-[TAMRA]		200		
<i>hly</i>	<i>hlyQFa</i>	CATGGCACCAACGCACTCT		450		
	<i>hlyQRa</i>	ATCCGCGTGTTTCTTTTCGA	64	450	95°C-1 min 60°C-1 min	(Rodríguez-Lázaro et al., 2004)
	Sonda <i>hly</i>	[HEX]-CGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCA-[TAMRA]		100		
<i>iap</i>	<i>iapQFa</i>	AATCTGTAGCGCAACTTGGTTAA		300		
	<i>iapQRa</i>	CACCTTTGATGGACGTAATAATACTGTT	78	300	95°C-1 min 60°C-1 min	(Rodríguez-Lázaro et al., 2004)
	Sonda <i>iap</i>	[HEX]-CAACACCAACCGCCACTACGGACG-[TAMRA]		300		
<i>sigB</i>	<i>sigB_f</i>	CCAAGAAAATGGCGATCAAGAC		300		
	<i>sigB_r</i>	CGTTGCATCATATCTTCTAATAGCT	166	300	95°C-1 min 60°C-1 min	(Rantsiou et al., 2012)
	Sonda <i>sigB</i>	[HEX]-TGTTTCATTACAAAAACCTAGTAGAGTCCAT-[TAMRA]		300		
IGS	IGS1	GGCCTATAGCTCAGCTGGTTA		300		
	IGS2	GCTGAGCTAAGGCCCGTAAA	135	300	95°C-1 min 60°C-1 min	(Rantsiou et al., 2012)
	Sonda IGS	[FAM]-ATAAGAAATACAAATAATCATACCCCTTTTAC-[TMRA]		300		

3.2.13.- Análisis estadístico

3.2.13.1.- Microbiología y curvas de penetración

Las ecuaciones de regresión, los coeficientes de determinación (valores de R^2) de las curvas de supervivencia, los límites de confianza del 95% de los valores D y el test F , que compara los valores D , así como la determinación de las reducciones decimales obtenidas tras el tratamiento con electrones acelerados, se calcularon utilizando el programa Excel 2016 (v16.0) (Microsoft, Redmond, Washington, Estados Unidos).

Las curvas de penetración de los electrones acelerados se obtuvieron representando la dosis absorbida/el porcentaje de absorción de la dosis (dosis absorbida/dosis aplicada x 100) vs. la distancia desde la superficie del jamón, y sus correspondientes coeficientes de determinación R^2 también se estimaron utilizando Excel (Microsoft, Redmond, Washington, Estados Unidos).

3.2.13.2.- Análisis sensoriales

El nivel de significancia de los datos obtenidos en la prueba de ordenación fue determinado mediante la suma de puntuaciones de Friedman de acuerdo al modelo de Joanes (1985) y las tablas de valor crítico propuestas por Christensen y *col.* (2006).

Los datos obtenidos de la prueba de nivel de agrado se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) unifactorial con la ayuda del programa Statgraphics Centurion XVIII (Statistical Graphics Corp., Herdon, Estados Unidos). La significación estadística se estableció en $p \leq 0,05$.

3.2.13.3.- Parámetros físico-químicos y fuerza de pegado

Para establecer la significancia de los parámetros físico-químicos (a_w , pH, humedad, cenizas y extracto seco) y la fuerza de pegado entre MJR no irradiados e irradiados se utilizó la prueba T de Student.

Para determinar si la fuerza de pegado del PP presenta diferencias significativas durante las fases de procesamiento de las MJR no irradiadas, se utilizó un ANOVA unifactorial.

Las diferencias se consideraron significativas a valores $p \leq 0,05$.

Los datos se analizaron utilizando el software IBM SPSS Statistics v23.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, Estados Unidos).

3.2.13.4.- Expresión de genes de respuesta al estrés y de virulencia

Se comprobó la normalidad de los datos obtenidos en cada grupo con la prueba de Shapiro-Wilk. Se realizó un ANOVA unifactorial y una comparación múltiple mediante la prueba de Tukey para determinar la significancia en la expresión génica absoluta de cada gen (*plcA*, *iap*, *hly* y *sigB*) teniendo en cuenta el efecto de la dosis, la temperatura (7 y 15°C) y el tiempo (1, 7, 15 y 30 días) de almacenamiento. Este mismo análisis se realizó con los datos obtenidos de los recuentos microbiológicos y de la relación entre la expresión génica absoluta y el número de células supervivientes (Log [copias del gen/(UFC/g)]). Los análisis se realizaron utilizando el software IBM SPSS Statistics v23.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). La significación estadística se estableció en $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El jamón curado es uno de los productos cárnicos más representativos en países mediterráneos como España o Italia y posee unas propiedades sensoriales únicas que le han valido tener gran aceptación y reconocimiento en todo el mundo. Además, es un producto estable microbiológicamente, por tanto, de larga vida útil, por su baja actividad de agua ($\leq 0,92$) y elevada concentración de sal (Asensio y Díaz, 2001; Toldrá y Aristoy, 2010).

En la actualidad, el jamón curado en formato deshuesado tiene una aceptación cada vez mayor a nivel industrial y de consumidor. Es una pieza de jamón que, tras la eliminación del hueso, se envasa entero a vacío, lo que facilita su conservación, manejo posterior y le confiere un aspecto atractivo. El deshuesado es una operación cada vez más necesaria, para la exportación a países no familiarizados con el producto con hueso, ya que facilita el corte del producto en otras presentaciones comerciales (lonchas, bloques, centros, trozos, etc.) cada vez más demandadas. Baste decir que en el 2018, el 77% de las exportaciones españolas de jamón curado fueron en este formato (Rodríguez, 2018; Mercasa, 2019).

Sin embargo, el deshuesado supone una manipulación adicional que incrementa el riesgo de contaminación con microorganismos del entorno industrial, algunos de ellos patógenos, como *Listeria monocytogenes*. Por ello, diferentes organizaciones internacionales (ICMSF, 2002; FAO/WHO, 2004; Comisión Europea, 2007) han establecido como criterio microbiológico de seguridad un máximo de 100 UFC/g para alimentos que no favorecen el crecimiento de *Listeria*, como el jamón curado. Sin embargo, desde el punto de vista comercial, la presencia de una célula de *L. monocytogenes*, constituye un problema para su exportación a países en los que rige un criterio de “tolerancia cero” (ausencia en 25 g) (Ivanek y col., 2005; FSIS, 2014, 2015; Neri y col., 2019), ya que supondría la retirada del producto.

Resulta imprescindible, por lo tanto, la aplicación de tratamientos adicionales, fundamentalmente no térmicos, capaces de eliminar *Listeria* manteniendo a la vez las características sensoriales propias que le hacen ser uno de los productos cárnicos más preciados y valorados. Uno de estos tratamientos es la irradiación mediante la aplicación de electrones acelerados, que ha demostrado su versatilidad para garantizar el cumplimiento de los estándares de inocuidad de diferentes alimentos sin que se produzcan pérdidas significativas en su calidad (Roberts, 2014; Li y Farid, 2016; Pillai y Shayanfar, 2017). De hecho, varios autores han descrito su eficacia para reducir la carga de *L. monocytogenes* hasta niveles seguros en diversos productos cárnicos (Foong y col., 2004; Cabeza y col., 2007, 2009, 2010; Hoz y col., 2008; Benedito y col., 2011; Cambero y col., 2012; García-Márquez y col., 2012ab; Kudra y col., 2012; Yim y col., 2016; An y col., 2017, 2018).

Sin embargo, uno de los inconvenientes de esta fuente de irradiación es su limitada capacidad de penetración, ya que varía en función de las dimensiones y la densidad de la matriz del alimento (Mehta y O'Hara, 2006; Tahergorabi y col. 2012, 2014), lo que compromete su efectividad en productos voluminosos y heterogéneos en composición y densidad (Farkas, 2006; Corlis y col., 2008; IAEA, 2015). El jamón curado tiene mayoritaria carne magra pero también una capa de grasa subcutánea o incluso grasa infiltrada cuya respuesta al tratamiento puede ser diferente. Por lo tanto, resultaría de gran interés estudiar la efectividad de los electrones acelerados en el control de *Listeria* en jamones curados deshuesados en función de estos parámetros.

Por todo lo anteriormente expuesto, el planteamiento del trabajo ha sido establecer las condiciones de tratamiento con electrones acelerados más adecuadas para eliminar *Listeria monocytogenes* del jamón curado deshuesado y alcanzar así el objetivo de seguridad alimentaria para este patógeno sin provocar cambios significativos en sus propiedades sensoriales.

Para ello, se ha estudiado en primer lugar la cinética de inactivación de diferentes cepas de *L. monocytogenes*, previamente seleccionadas, frente al tratamiento con electrones acelerados. Posteriormente, se ha determinado la capacidad de penetración de los electrones acelerados en jamones curados deshuesados, así como el efecto del grosor y de la composición del jamón. En el primer caso, se prepararon lotes de jamones clasificados en función de su grosor, aplicando una dosis diferente en cada lote y se comprobó el efecto listericida de los tratamientos. Además, se ha desarrollado un modelo matemático que permite estimar la penetración de los electrones acelerados en este producto teniendo en cuenta el grosor de la capa de grasa subcutánea. Esta parte del trabajo se ha complementado con un estudio del efecto de los electrones acelerados en la calidad sensorial del producto y en la formación de compuestos volátiles, proponiéndose algunos de ellos como marcadores del tratamiento. Con los datos recabados se establecieron las condiciones de tratamiento más adecuadas para alcanzar el objetivo de seguridad alimentaria propuesto.

Posteriormente, y debido a que los jamones curados reestructurados constituyen una buena alternativa, además de económica, al producto tanto convencional como deshuesado, se ha procedido a estudiar el efecto del tratamiento propuesto en la higienización del producto reestructurado y las propiedades del agente de ligazón en frío utilizado para su elaboración.

Por último, se ha analizado el efecto de los electrones acelerados sobre la expresión de los genes de respuesta al estrés (*sigB*) y de virulencia (*plcA*, *hly* e *iap*) de las células de *Listeria monocytogenes* que han sobrevivido al tratamiento, así como su posible repercusión en la seguridad microbiológica del jamón curado. Ni el autor ni los directores de esta Tesis tienen conocimiento alguno de estudios realizados sobre la materia hasta la fecha, lo que le confiere un carácter novedoso.

4.1.- Evaluación del riesgo microbiológico y estimación de los parámetros relacionados

Para evaluar el riesgo microbiológico y estimar los parámetros relacionados con el fin de establecer el tratamiento adecuado para la higienización del jamón curado respecto a *L. monocytogenes*, se considerará, en primer lugar, el objetivo de seguridad alimentaria (FSO), ya que las regulaciones del criterio microbiológico en relación a este microorganismo para los productos alimenticios están en función de este parámetro y difieren entre las normativas establecidas. El FSO se define como el máximo nivel de un peligro, en este caso microbiológico, de un alimento en el momento de su consumo que proporciona un nivel adecuado de protección al consumidor (Gorris, 2005).

De acuerdo con el Reglamento (CE) N° 1441/2007 de la Comisión Europea sobre los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Tabla 8), se ha establecido un FSO < 100 UFC/g (2 log de UFC) para *L. monocytogenes* en productos que no favorecen su crecimiento, como el jamón curado. El mismo reglamento considera que los productos con un $\text{pH} \leq 4,4$ o $a_w \leq 0,92$, o productos con $\text{pH} \leq 5,0$ y $a_w \leq 0,94$, se consideran automáticamente pertenecientes a la categoría de alimentos RTE que no favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes*. El mismo criterio microbiológico se aplica en Canadá (Health Canada, 2011), Australia y Nueva Zelanda (Australian Government, 2017). Sin embargo, en Estados Unidos se establece un criterio de “tolerancia cero” (ausencia en 25 gramos) para todos los alimentos, lo que corresponde a un FSO < 4 UFC/100 g (-1,39 log UFC). Por tanto, la presencia de este microorganismo, desde un punto de vista comercial, puede ser un problema para la exportación de alimentos a países en los que rige un criterio de tolerancia cero (Ivanek y col., 2005; USDA/FSIS, 2011; Neri y col., 2019).

Tabla 8. Límites máximos permitidos en la Unión Europea para *L. monocytogenes* en productos RTE

Categoría de alimentos	Límite
Alimentos RTE destinados a los lactantes y usos médicos especiales	Ausencia en 25 g
Alimentos RTE que favorecen el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> • Si el fabricante puede demostrar que el producto no superará este valor durante su vida útil • Si no se puede demostrar que no superará el valor durante su vida útil	100 UFC/g Ausencia en 25 g
Alimentos RTE que no favorecen el crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	100 UFC/g

Fuente: Comisión Europea (2007)

Para la higienización del producto mediante la aplicación de un tratamiento con electrones acelerados es necesario determinar, en primer lugar, el criterio del rendimiento (CR) que se define como el efecto necesario en una etapa o conjunto de etapas que contribuye a asegurar que se cumple el FSO, es decir, qué disminución en el número de microorganismos tiene que conseguir el tratamiento para alcanzar el criterio microbiológico pertinente. El CR puede calcularse mediante la expresión de la ICMSF (2002):

$$H_0 - CR + \Delta = FSO$$

Siendo H_0 , la contaminación inicial y Δ , el aumento del número de células durante la vida útil del alimento.

El jamón curado se considera un producto microbiológicamente estable, es decir, pertenece a la categoría de productos que no favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes*, por lo que $\Delta = 0$.

Necesitamos conocer, además, la contaminación inicial (H_0) del producto. Dado que *L. monocytogenes* es un microorganismo ubicuo que se encuentra en prácticamente todas las instalaciones de la industria alimentaria, podemos asumir la consideración hecha por la ICMSF (2002) para numerosos productos cárnicos cocidos de 10 células/g en el peor de los casos. Por lo tanto, consideramos un valor de $H_0 = 10$ células/gramo ($\text{Log} = 1$).

Sustituyendo estos valores en la expresión anterior, se calcula que, para alcanzar un FSO de 100 células/gramo ($\text{Log} = 2$), superior a la contaminación inicial, no es necesario reducir el número de listerias. Sin embargo, en aquellos países en los que rige el criterio de tolerancia

cero ($\text{Log} = -1,39$) se estima un CR de 2,39, es decir, el tratamiento que se aplique ha de ocasionar 2,39 reducciones decimales.

4.2.- Control de *Listeria monocytogenes* en jamón curado deshuesado mediante el tratamiento con electrones acelerados

4.2.1.- Estudio de la cinética de inactivación de *Listeria* y aspectos de seguridad alimentaria

Se utilizaron cuatro cepas de *L. monocytogenes* (S2, S4-2, S12-1 y S7-2, correspondientes a los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b, respectivamente) y una cepa de *L. innocua* (NCTC 11288). Las cepas patógenas habían sido previamente aisladas por Ortiz y col. (2010) de diferentes mataderos y plantas procesadoras de productos cárnicos derivados del cerdo Ibérico (más de 30 productos diferentes incluidos chorizos, salchichón, jamón Ibérico, paletas, etc.). Estos autores describieron que las cepas S2 y S4-2 fueron aisladas con mayor frecuencia en muestras del medio ambiente, equipos, canales porcinos, cortes de carne (materia prima de los productos cárnicos) y productos cárnicos curados; la cepa S12-1 fue identificada en muestras ambientales, canales y, en menor medida, en los productos cárnicos y la S7-2 se aisló principalmente de materia prima. Asimismo, estos serotipos han sido aislados por otros autores de plantas de elaboración de jamón curado en España tanto durante el procesamiento (D'Arrigo y col., 2020) como en áreas de posprocesado (Alía y col., 2020).

La cepa de *Listeria innocua* se utilizó como subrogada de la patógena debido a su mayor radioresistencia (Cabeza y col., 2007, 2009; Hoz y col., 2008; Cambero y col., 2012; Velasco y col., 2015).

Para el estudio de la cinética de inactivación, se cortaron lonchas de jamones deshuesados que se contaminaron mediante inmersión en diferentes suspensiones bacterianas correspondientes a cada una de las cepas señaladas, de forma que cada loncha tenía una carga aproximada de $9-8 \log \text{ UFC/g}$. Las lonchas contaminadas se envasaron a vacío. Unas muestras se trataron con electrones acelerados a diferentes dosis (0,5, 1, 2 y 3 kGy). El resto de las muestras, sin tratar, se emplearon como control. La metodología utilizada está recogida en el apartado 3.2.4 de Material y Métodos.

Tras la aplicación del tratamiento, se procedió al recuento de los microorganismos supervivientes usando como medio Agar Palcam selectivo con los suplementos correspondientes. Posteriormente, se representó gráficamente el logaritmo de los microorganismos supervivientes frente a la dosis de tratamiento, obteniéndose las curvas de

supervivencia para las diferentes cepas de *Listeria* (Figura 15). En todos los casos, la respuesta de *Listeria* al tratamiento con electrones acelerados se ajustó a una cinética de primer orden, obteniéndose las correspondientes ecuaciones de supervivencia a partir de las cuales se calcularon los valores D (dosis de reducción decimal) como el inverso de la pendiente (Tabla 9).

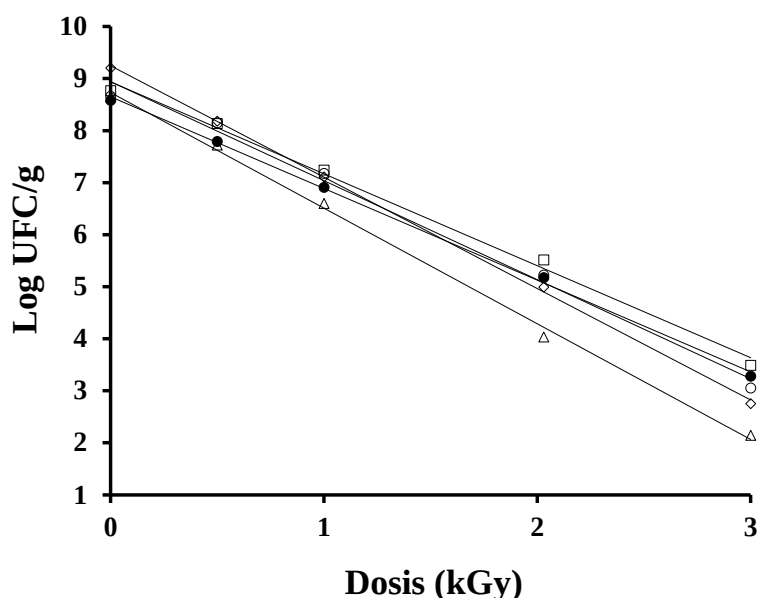


Figura 15. Curvas de supervivencia de *Listeria monocytogenes* S4-2 (□), S2 (△), S12-1 (○), y S7-2 (◇) y *L. innocua* NCTC 11288 (●) en lonchas de jamón curado tratadas con electrones acelerados

Tabla 9. Ecuaciones de supervivencia y dosis de reducción decimal (D_{10}) para las diferentes cepas de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* NCTC 11288 en lonchas de jamón curado.

Microorganismo	Ecuación de supervivencia	R ²	D_{10} (kGy)
<i>L. innocua</i> NCTC 11288	$\text{Log UFC/g} = 8,67 - 1,76 \times \text{Dosis}$	0,99	0,55
<i>L. monocytogenes</i> S2	$\text{Log UFC/g} = 8,85 - 2,25 \times \text{Dosis}$	0,99	0,44
<i>L. monocytogenes</i> S4-2	$\text{Log UFC/g} = 9,03 - 1,81 \times \text{Dosis}$	0,98	0,55
<i>L. monocytogenes</i> S12-1	$\text{Log UFC/g} = 9,12 - 1,94 \times \text{Dosis}$	0,97	0,52
<i>L. monocytogenes</i> S7-2	$\text{Log UFC/g} = 9,25 - 2,14 \times \text{Dosis}$	0,99	0,47

Como puede observarse, *L. innocua* y *L. monocytogenes* S4-2 mostraron la mayor resistencia al tratamiento, con un valor D de 0,55 kGy en ambos casos. Esta cepa S4-2 había sido previamente aislada por Ortiz y col. (2010) de forma persistente en toda la cadena de producción de los productos cárnicos, pero sobre todo de muestras ambientales y de materia prima. Además, esta cepa corresponde al serotipo 1/2b, uno de las predominantes tanto en infecciones humanas (Orsi y col., 2011; Ryser y Buchanan, 2013) como en el entorno de

producción de alimentos en general (Meloni, 2015) y específicamente en diversas superficies, equipos y utillaje en áreas de posprocesamiento de los jamones curados deshuesados, como loncheadoras, equipos de deshuesado, máquinas de envasado a vacío, etc. (Alía y col., 2020). Por otro lado, la similitud del valor D de *L. innocua* con el de la cepa S4-2, como se ha descrito anteriormente, nos permitió utilizarla en experimentos posteriores, evitando así el riesgo que conlleva trabajar con la cepa patógena y facilitando el manejo en el laboratorio.

Los valores D obtenidos en estos experimentos se encuentran en el intervalo descrito por varios autores para *Listeria* spp. en diferentes productos cárnicos cocidos, como salchichas tipo Frankfurt, mortadela (Foong y col., 2004; Sommers y col., 2003), rollos de pechuga de pavo (Zhu y col., 2009) y jamón cocido (Cabeza y col., 2007), entre otros y en embutidos crudos curados, como salchichón y chorizo (Cabeza y col., 2009).

Para calcular la dosis de irradiación que hay que aplicar para conseguir el criterio de rendimiento establecido en el apartado anterior (2,39 reducciones decimales), consideramos el caso más desfavorable, es decir, el valor D más elevado (0,55 kGy). Mediante un sencillo cálculo, se estima que la dosis requerida para alcanzar el FSO de ausencia en 25 gramos es de 1,32 kGy.

Este valor coincide con los obtenidos por numerosos autores (Cabeza y col., 2007, 2009, 2010; Hoz y col., 2008; Medina y col., 2009; Song y col., 2009; García-Márquez y col., 2012ab; Velasco y col., 2015) quienes concluyeron que dosis de entre 1 y 2,5 kGy prolongaba la vida útil y garantizaba la seguridad microbiológica respecto a *L. monocytogenes* de diversos productos cárnicos, pescados ahumados como el salmón ahumado y el atún e incluso queso.

Además, la dosis calculada en este trabajo (1,32 kGy) es inferior a la recomendada para carne de aves (2,5-7 kGy) (Patterson, 1989; Wood y Bruhn, 2000), carne roja (4,5 kGy) (Wood y Bruhn, 2000), productos cárnicos congelados de pato (3-7 kGy) (An y col., 2017) y mortadela (3 kGy) (Sommers y col., 2003). La diferencia se debe, probablemente, a que la mayor a_w de estos productos favorece el crecimiento de *Listeria* durante su vida útil.

4.2.2.- Efecto del tratamiento con electrones acelerados en la calidad sensorial de lonchas de jamón curado

Con el fin de conocer el efecto del tratamiento de lonchas de jamón curado con diferentes dosis irradiación (0, 1, 2 y 3 kGy) en los atributos sensoriales del producto, se realizó una

prueba de ordenación (véase apartado 3.2.9.1 de Material y Métodos) a diferentes tiempos durante el almacenamiento en refrigeración (1, 15 y 30 días).

Los resultados obtenidos indicaron que no hay diferencias significativas ($p > 0,01$) en ninguna de las propiedades evaluadas (apariencia, olor, sabor y aceptabilidad general) entre las muestras no tratadas y las tratadas con 1 y 2 kGy durante todo el período de almacenamiento. Sin embargo, inmediatamente después del tratamiento (día 0), se detectaron diferencias significativas ($p \leq 0,01$) en el olor, sabor y aceptabilidad general entre las muestras control (0 kGy) y las tratadas con 3 kGy. Asimismo, se encontraron diferencias entre las tratadas con 1 kGy y con 3 kGy en la aceptabilidad general. En el análisis realizado a los 15 días de almacenamiento a 4°C, los jueces únicamente encontraron diferencias en el olor en las muestras tratadas con 3 kGy con respecto a las muestras control y las tratadas con 1 kGy, aunque dichas diferencias desaparecieron después de 30 días de almacenamiento (Tabla 10).

Tabla 10. Propiedades sensoriales de las lonchas de jamón curado irradiadas y no irradiadas que mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,01$) en la prueba de ordenación después del tratamiento (día 0) y a diferentes días (15 y 30 días) de almacenamiento a 4°C.

Dosis (kGy)	0	1	2	3
0				AG ₀ , O _{0,15} , S ₀
1				AG ₀ , O ₁₅
2				
3				

AG: Aceptabilidad general; O: Olor; S: Sabor

Diferentes autores han descrito que la irradiación puede alterar las propiedades sensoriales de los alimentos y afectar significativamente a la aceptación del producto por parte de los consumidores (Stefanova y col., 2010; Kim y col., 2012; Feliciano, 2018; Ahn y col., 2018; Ravindran y Jaiswal, 2019). Este hecho se debe, posiblemente, a que por efecto de la irradiación se forman radicales libres que interaccionan con algunos componentes de los alimentos. Por ejemplo, la textura y viscosidad de algunos vegetales se deterioran a causa de la acción de los radicales libres sobre algunos polisacáridos como celulosa, almidón y pectina. Asimismo, el olor, sabor y aroma de muchos productos también se alteran debido al efecto de estos radicales libres sobre los lípidos y los aminoácidos libres, en especial los que contienen azufre, generando compuestos volátiles responsables del deterioro. Estos radicales también pueden tener un impacto negativo en el color, relacionado directamente con la dosis utilizada (Miller, 2005; Fan, 2013; Prakash, 2020).

La disminución de la calidad sensorial ha sido observada también en algunos estudios realizados en productos cárnicos (Fernanes y col., 2018; Kong y col., 2017; Jo y col., 2018; Arshad y col., 2020), en los que la aplicación de una dosis de 3 kGy afecta de forma negativa a las características organolépticas del producto. En nuestro caso, con dosis de hasta 2 kGy, no se produjeron cambios significativos, por lo que se perfila como la dosis más adecuada para el tratamiento desde el punto de vista sensorial.

Nuestros resultados coinciden con lo descrito por otros autores, quienes no encontraron cambios significativos en la calidad sensorial tras aplicar tratamientos con dosis de hasta 2 kGy de electrones acelerados en productos cárnicos convencionales como el jamón cocido (Benedito y col., 2011; Cabeza y col., 2007, 2010) e incluso en productos cárnicos funcionales (Selgas y col., 2009; Galán y col., 2010, 2011; Gámez y col., 2011). Asimismo, Cárcel y col. (2015) describieron que la aplicación a hamburguesas y filetes de pechuga de pollo de un tratamiento de irradiación con dosis de 2,04 y 1,11 kGy, respectivamente, son suficientes para obtener productos microbiológicamente seguros manteniendo sus propiedades sensoriales.

4.2.3.- Estudio de la capacidad de penetración de los electrones acelerados en el jamón curado deshuesado

Para este estudio se emplearon jamones deshuesados de tamaño y peso similar. A partir de ellos se cortaron y extrajeron bloques de jamón de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 3.2.5 de Material y Métodos. Estos bloques se cortaron perpendicularmente en tres partes y se colocaron dos dosímetros en cada superficie de corte y en las superficies superior e inferior de cada bloque y se colocaron en el sitio que originalmente ocupaban en cada jamón. Los jamones así reconstruidos se trataron con dosis de 2, 4 y 6 kGy de forma unilateral. Se sacaron de nuevo los bloques y se retiró uno de los dos dosímetros de cada superficie, se reconstruyeron de nuevo, se voltearon y se aplicó el mismo tratamiento por el lado opuesto (tratamiento bilateral). Finalmente, se procedió a la lectura de las dosis absorbidas en ambos tratamientos.

Con las lecturas obtenidas, se estableció una relación entre la distancia de cada dosímetro a la superficie del bloque y la dosis que había absorbido en cada uno de los dos tratamientos (Figura 16).

En todos los bloques se observó que la dosis absorbida en la superficie del producto (0 cm) era el 100% de la dosis aplicada. Sin embargo, a 2 cm de la superficie la dosis absorbida era superior a la aplicada, del orden del 120%, aproximadamente. Este hecho puede

explicarse por el fenómeno de la retrodispersión o Efecto Compton descrito por diversos autores (Venugopal y col., 1999; IAEA, 2002; Tahergorabi y col., 2012, 2014). Cuando los electrones acelerados impactan en un átomo, provocan la expulsión de otros electrones denominados secundarios, que proceden de las capas más externas del átomo, que quedan libres a raíz de este impacto. Estos electrones secundarios son absorbidos más eficientemente que los primarios debido a su menor energía, y el resultado es un aumento de dosis absorbida a este nivel, causando la excitación y posterior ionización de los componentes de los alimentos. Jaczynski y Park (2003) y Kim y col. (2006ab, 2007, 2008 y 2010) también observaron el efecto Compton tras la irradiación de matrices alimentarias tan diversas como surimi, canales de pollo, melones o brócolis.

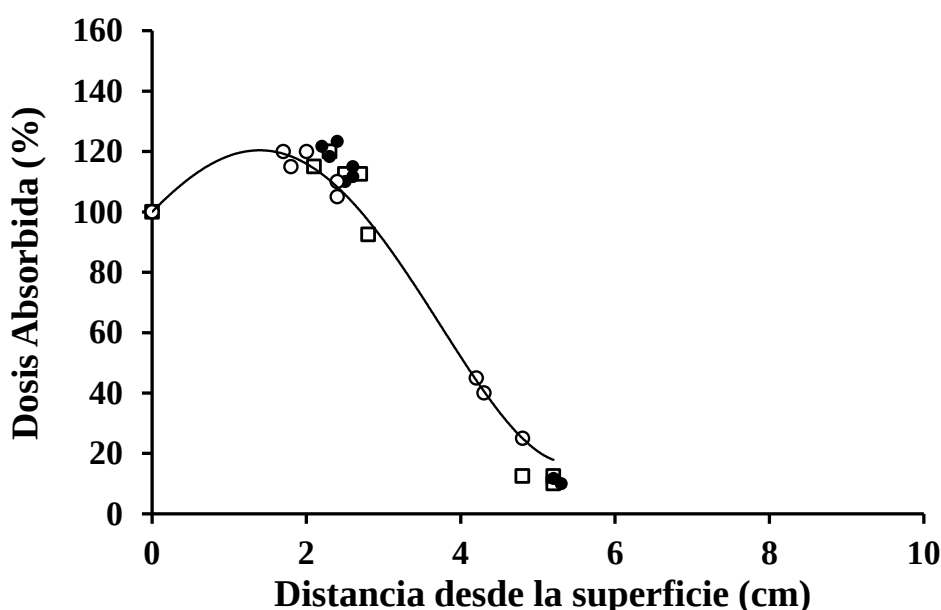


Figura 16. Porcentaje de dosis absorbidas a diferentes profundidades de bloques de jamón curado deshuesado cuando se aplicaron tratamientos unilaterales con electrones acelerados a diferentes dosis: 2 kGy (○), 4 kGy (□) y 6 kGy (●).

Sin embargo, a partir de los 2 cm de profundidad, la dosis absorbida disminuyó de forma importante; así, a los 4 cm, se absorbió aproximadamente el 50% de la dosis aplicada, y ya en torno a los 5 cm las dosis absorbidas fueron insignificantes. Este comportamiento fue el mismo independientemente de la dosis aplicada y se ajusta al reportado previamente por IAEA (2002, 2015). En los informes técnicos sobre dosimetría en la irradiación de alimentos de dicho Organismo, se ha descrito que, tras la aplicación de un tratamiento unilateral con electrones acelerados a un recipiente con agua como material de referencia, en la superficie de este material la dosis absorbida es el 100% de la dosis aplicada y a una profundidad de 2,8 cm es del 130%. Sin embargo, la dosis absorbida empieza a decrecer a partir de este

punto, siendo del 100% a los 4 cm y deja de absorberse a una profundidad aproximada de 6,5 cm. Las diferencias encontradas entre lo descrito para agua y nuestros resultados en el jamón respecto a la dosis máxima absorbida a una determinada profundidad, se deberían probablemente a la diferencia en la densidad de la matriz. Según Satin (2002), el nivel de penetración de los electrones acelerados en los alimentos puede alcanzar hasta 8 cm y varía dependiendo de la densidad de los alimentos, como se discutirá más adelante.

De acuerdo con estos resultados, si se tiene en cuenta que un jamón curado podría tener un grosor superior a 10 cm, se puede establecer que con la aplicación de un tratamiento unilateral, incluso de 6 kGy, es imposible conseguir el FSO para *Listeria monocytogenes*.

En la Figura 17 se muestra la dosis que se absorbe a distintas profundidades de los bloques de jamón curado deshuesado mediante la aplicación de un tratamiento bilateral con diferentes dosis (2, 4 y 6 kGy).

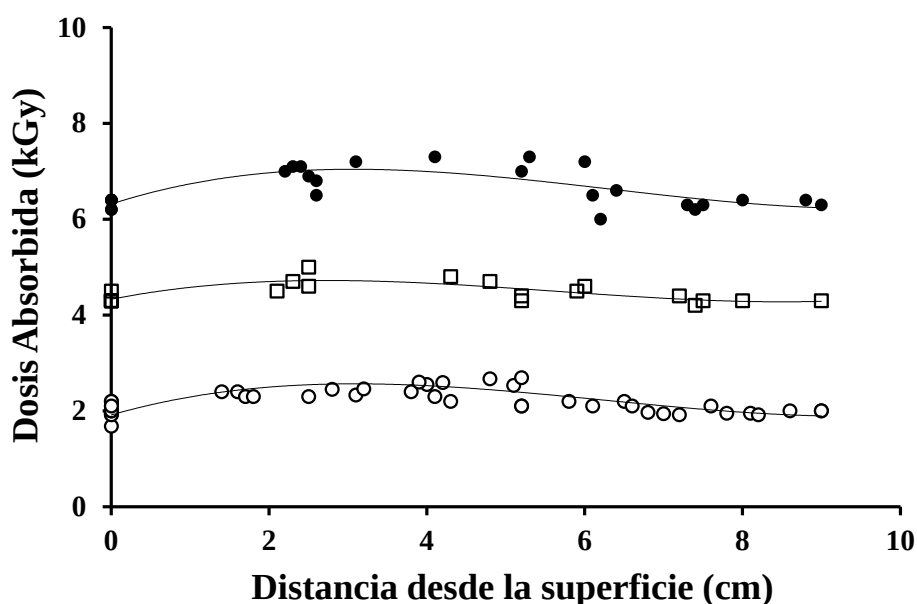


Figura 17. Dosis absorbidas a diferentes profundidades de los bloques de jamón curado deshuesado cuando se aplicaron tratamientos bilaterales con electrones acelerados a diferentes dosis: 2 kGy (○), 4 kGy (□) y 6 kGy (●)

En principio, se observó el comportamiento antes descrito, es decir al menos el 100% de la dosis aplicada se absorbía en ambas superficies y aumentaba hasta aproximadamente el 120% en los primeros 2 cm. Sin embargo, en este caso y pasado este punto de los 2 cm, la dosis absorbida se mantenía en torno a este porcentaje, independientemente de la profundidad o la dosis aplicada. Por lo tanto, las dosis alcanzadas en el centro del producto

serían ligeramente superiores a la dosis aplicada, y las dosis absorbidas en cada punto corresponderían a la suma de las dosis residuales procedentes de las aplicadas en ambas superficies. Este hecho ha sido descrito en el informe de la IAEA (2002) antes mencionado. En este estudio, se observó que en el centro del recipiente, las dosis absorbidas tras este tratamiento bilateral guardaban relación inversa con la altura del producto. Así, por ejemplo, a 9 y 9,5 cm, se determinaron dosis de 130% y 100%, respectivamente.

Otros autores también observaron este solapamiento de dosis residuales en otros productos irradiados. Así, Jaczynski y Park (2003) trataron surimi con electrones acelerados para el control de *Staphylococcus aureus* y determinaron penetraciones de 3,3 y 8,2 cm cuando el tratamiento se aplicó unilateral y bilateralmente, respectivamente. Estos autores llegaron a la conclusión de que, para lograr la higienización del surimi, era necesario un tratamiento bilateral. Asimismo, Kim y col. (2007) describieron que la irradiación de un producto heterogéneo como una canal de pollo, requiere un tratamiento bilateral para optimizar la distribución de la dosis de los electrones acelerados.

En consecuencia, con un tratamiento bilateral de tan solo 2 kGy, la parte más interna recibirá al menos la dosis necesaria (1,32 kGy) para alcanzar el FSO con respecto a *L. monocytogenes* en jamones curados deshuesados.

La variabilidad observada de las dosis absorbidas (Figura 17) también podría estar relacionada con la heterogeneidad de la matriz de este producto, concretamente la densidad y el espesor. El jamón curado está constituido principalmente por una parte magra, pero también tiene una capa más o menos gruesa de grasa subcutánea que siempre está presente en un lado del jamón curado, aunque en algunas razas esta grasa se infiltra en la parte magra. La capa grasa es menos densa que la parte magra por lo que el tratamiento penetraría de forma diferente en ambas estructuras. Por consiguiente, la penetración, la absorción y, por tanto, la eficacia de los electrones acelerados pueden variar cuando el tratamiento se aplica a una sola de las dos superficies (magro o grasa), lo que también justifica la necesidad de un tratamiento bilateral. El efecto de ambos factores, espesor y composición del producto, sobre la dosis absorbida se discutirá detalladamente en los apartados 4.2.5 y 4.3.

4.2.4.- Evaluación del efecto listericida del tratamiento con electrones acelerados en jamones curados deshuesados

Con el objetivo de confirmar que un tratamiento bilateral con 2 kGy es suficiente para ocasionar las 2,39 reducciones decimales necesarias para conseguir el FSO en jamones curados deshuesados, se realizó un ensayo *in situ*. Para ello, se tomaron jamones

deshuesados, se abrieron longitudinalmente por la mitad y se simuló una contaminación con *Listeria* en varios puntos de la zona que albergaba el hueso, depositando lonchas contaminadas con *Listeria innocua* sobre estos puntos, de acuerdo con la metodología descrita en apartado 3.2.6 de Material y Métodos. Posteriormente, los jamones se trataron de forma bilateral con electrones acelerados a dosis de 2 kGy.

Para determinar el número de reducciones decimales de *L. innocua* logradas después de aplicar este tratamiento, se hizo un recuento de los supervivientes de cada una de las lonchas contaminadas. En el 75% de las lonchas, las reducciones decimales oscilaron entre 2,39 y 3,9, en el 16,7% se alcanzaron entre 4 y 6 reducciones decimales y en el 8,3% restante, las reducciones fueron superiores a 6. A su vez, las lecturas dosimétricas en esta zona revelaron que la dosis absorbida era desde 1,47 kGy en la parte más gruesa y hasta 3 kGy en la más fina, es decir, todos los puntos recibieron más de los 1,32 kGy necesarios para alcanzar el FSO. Por lo tanto, se puede establecer que la variabilidad en estas reducciones decimales estaba relacionada con el espesor que tenía el jamón en el punto donde se colocaron las lonchas contaminadas. De hecho, los espesores oscilaban entre 4 (en las zonas más cercanas al codillo) y 10,8 cm (en la zona de la maza). Así, las partes menos gruesas del jamón se correspondieron con mayores dosis absorbidas y, por tanto, mayores reducciones decimales.

4.2.5.- El espesor del jamón curado deshuesado como factor limitante del tratamiento con electrones acelerados

A raíz de la variabilidad observada en los resultados anteriores, se consideró necesario determinar de una forma más precisa la influencia del grosor (tamaño) del jamón curado deshuesado en la penetración de los electrones acelerados y poder así optimizar el tratamiento propuesto.

Para realizar este experimento, se hicieron dos lotes de 4 jamones deshuesados: uno de ellos con jamones cuyo espesor era ≤ 7 cm (Grupo A) y otro con jamones cuyo espesor era > 7 cm (Grupo B). Se contaminaron con *L. innocua* de forma similar al experimento anterior, pero en dos puntos denominados X (próximo a la zona que albergaba el hueso extraído) e Y (próximo a la punta del jamón). En cada uno de estos se dispusieron superpuestas dos muestras contaminadas (véase apartado 3.2.7 de Material y Métodos). Basándonos en los resultados del apartado anterior, en el que se observaron las mayores reducciones decimales de la carga de listerias en las partes con menor grosor del producto y considerando, además, el solapamiento de las dosis residuales que se produce cuando se aplica un tratamiento bilateral, se aplicó un tratamiento bilateral con 1 kGy (la mitad de la dosis

establecida previamente) a los jamones del Grupo A, manteniendo la propuesta de 2 kGy para los del Grupo B.

La Tabla 11 muestra los espesores de cada uno de los jamones curados deshuesados del Grupo A, así como las reducciones decimales de *L. innocua* en las diferentes muestras después de un tratamiento bilateral con 1 kGy. En este grupo, el espesor de los jamones en la zona en la que se colocaron las muestras contaminadas fue muy similar: 6,1-6,7 cm; el grosor de las partes P1 osciló entre 2,8 y 3,4 cm y el de las partes P2, entre 3 y 3,5 cm. De forma general, se obtuvo una relación inversa entre el grosor de las partes P1 o P2 y las reducciones decimales de *Listeria*, de tal manera que cuanto menor era el espesor, mayor fue la reducción decimal. Así, la disminución de *Listeria* osciló entre 2,7 y 4,2 log UFC.

Tabla 11. Reducciones de *Listeria innocua* (Log UFC) después de un tratamiento bilateral con electrones acelerados (1 kGy) de cuatro jamones del Grupo A (≤ 7 cm).

Jamón	Espesor (cm)			Muestra	Reducciones (Log UFC)
	Total	P1	P2		
1	6,7	3,3		X1	3,9
			3,4	X2	3,1
	6,4	3,4		Y1	2,9
			3,0	Y2	4,2
2	6,5	3,0		X1	4,1
			3,5	X2	3,1
	6,4	3,3		Y1	2,7
			3,1	Y2	3,2
3	6,6	3,2		X1	2,7
			3,4	X2	3,1
	6,4	3,3		Y1	2,9
			3,1	Y2	3,2
4	6,1	3,0		X1	3,7
			3,1	X2	3,2
	6,2	2,8		Y1	3,9
			3,3	Y2	2,7

P1: Parte superior del jamón curado. P2: Parte inferior del jamón curado.

X1 e Y1: Muestras contaminadas en P1. X2 y Y2: Muestras contaminadas en P2

En la Tabla 12 se muestran las reducciones decimales ocasionadas en el número de microorganismos en los jamones del Grupo B mediante la aplicación de un tratamiento bilateral con 2 kGy. En este grupo, el espesor de los jamones en las áreas en las que se colocaron las muestras osciló entre 7,8 y 9,7 cm. Al igual que en el Grupo A, se observó una

relación inversa entre el grosor de las partes P1 y P2 del jamón y la disminución del número de células de *Listeria*. En este grupo, además, las reducciones oscilaron entre 2,6 y 5,0 log UFC.

Tabla 12. Reducciones de *Listeria innocua* (Log UFC) después de un tratamiento bilateral con electrones acelerados (2 kGy) de cuatro jamones del Grupo B (> 7 cm).

Jamón	Espesor (cm)			Muestra	Reducciones (Log UFC)
	Total	P1	P2		
1	9,7	5,2		X1	2,9
			4,5	X2	2,9
	9,4	5,3		Y1	2,8
			4,1	Y2	3,1
2	7,9	4,3		X1	3,7
			3,6	X2	5,0
	8,6	4,4		Y1	2,9
			4,2	Y2	3,4
3	8,4	3,6		X1	5,0
			4,8	X2	3,3
	8,2	3,8		Y1	4,0
			4,4	Y2	3,1
4	7,8	3,9		X1	3,5
			3,9	X2	3,6
	9,2	5,0		Y1	2,6
			4,2	Y2	3,1

P1: Parte superior del jamón curado. P2: Parte inferior del jamón curado.

X1 e Y1: Muestras contaminadas en P1. X2 y Y2: Muestras contaminadas en P2

Estos resultados indican que, en ambos grupos, se consiguieron reducciones de *Listeria* superiores a 2,39 Log que es la reducción decimal mínima necesaria para lograr el FSO respecto a *L. monocytogenes*, como se ha indicado previamente. Es importante tener en cuenta que para facilitar el desarrollo de este tipo de experimentos se emplearon unas concentraciones elevadas de microorganismos, del orden de 10^7 células; si además se considera una contaminación, en el peor de los casos, de 10 células de listerias por gramo de producto (véase apartado 4.1), el tratamiento bilateral con 1 kGy en los jamones curados deshuesados con espesor ≤ 7 cm es suficiente para higienizar este producto, mientras que en jamones de mayor tamaño (espesor > 7 cm) es necesario aplicar una dosis de 2 kGy.

Respecto a la dosis absorbida, los dosímetros próximos a las muestras contaminadas registraron valores de entre 2 y 3 kGy, es decir, dosis superiores a las aplicadas en ambos grupos. El éxito del tratamiento en ambos casos guarda relación con la superposición de las

dosis residuales tras un tratamiento bilateral tal y como se ha explicado anteriormente. Sin embargo, el efecto fue más evidente en el Grupo A (≤ 7 cm). En los jamones de este grupo, las reducciones máximas conseguidas de 4,2 log se correspondieron con una dosis absorbida superior al doble de la aplicada (230% aproximadamente). Esto resulta coherente pues cuanto menor sea el grosor del producto tratado, mayor será la dosis acumulada en el centro. De forma similar, la IAEA (2002) describe que cuando un recipiente con agua de 6 cm es irradiado bilateralmente, se pueden observar en el centro del recipiente, dosis absorbidas de más del doble (250%) de la dosis aplicada, a una profundidad de 3 cm.

Además, es poco probable que los tratamientos aplicados en este trabajo puedan producir algún cambio en las propiedades sensoriales ya que las dosis absorbidas no superaron en ningún caso los 3 kGy. Como ya se ha descrito en esta memoria, con esta dosis sí que se pueden ver afectadas las propiedades sensoriales del jamón curado, pero es importante recordar que estos cambios desaparecen durante el almacenamiento. Sin embargo, el efecto del tratamiento sobre las propiedades sensoriales de un producto entero se discutirá de forma más detallada en el apartado 4.4.

Otro aspecto a considerar en este estudio es que, para minimizar el efecto de la composición del jamón en la inactivación bacteriana y en la penetración de los electrones acelerados, se utilizaron jamones curados estandarizados, procedentes de animales de la misma raza, que recibieron el mismo procesamiento y que, además, fueron clasificados en dos grupos en función de su tamaño. En cualquier caso, no se puede descartar que esa pequeña influencia probablemente explicase las ligeras diferencias encontradas en la reducción de *Listeria* entre los jamones cuyas partes P1 o P2 tenían espesores similares.

4.3.- Modelización de la penetración de los electrones acelerados para la optimización del tratamiento higienizante de los jamones curados deshuesados

Como se ha indicado previamente, las características particulares de cada alimento en cuanto a su composición y dimensiones son determinantes en la capacidad de penetración de los electrones acelerados. En el apartado anterior se ha discutido el efecto del tamaño (grosor) del jamón curado deshuesado y a continuación se va a estudiar la influencia de la heterogeneidad de su matriz, específicamente del espesor de la capa de grasa subcutánea.

Según la IAEA (2015, 2002), la efectividad de un tratamiento de irradiación puede evaluarse mediante el denominado “mapeo de dosis”, el cual permite determinar el

comportamiento de los electrones mientras atraviesa el producto, es decir, la distribución de la dosis en el interior. Para ello, se distribuyen los dosímetros en el interior y superficie de un producto y, tras la aplicación del tratamiento de irradiación bajo condiciones conocidas, se retiran los dosímetros y se procede a su lectura. Este mapeo se hace con las dosis absorbidas en cada punto y puede acompañarse de modelos matemáticos que hacen más robusto el cálculo de la dosis absorbida a una profundidad determinada del producto (Kim y col., 2006ab, 2007, 2008, 2010). Estos modelos ayudan a reducir el número de mediciones durante un mapeo de dosis e incluso la cantidad misma de los mapeos realizados (Craven y col., 2018).

4.3.1.- Evaluación del efecto de la composición de la matriz del jamón curado en la penetración de los electrones acelerados

Para evaluar el efecto de la composición del jamón curado en la penetración de electrones acelerados, se obtuvieron por separado lonchas de tocino y lonchas de la parte magra del jamón, todas del mismo tamaño y espesor, las cuales se superpusieron unas sobre otras formando bloques de 12 lonchas. Un tipo de bloques estuvo conformado por lonchas solo de tocino y otro tipo de bloque por lonchas solo de la parte magra (véase apartado 3.2.8.1 de Material y Métodos). Se intercalaron dosímetros entre cada dos lonchas y los bloques se irradiaron unilateralmente con dosis de 2 kGy para determinar la distribución de la dosis en el interior.

En las Figuras 18 y 19 se muestra el mapeo de las dosis absorbidas en diferentes puntos de cada uno de los dos tipos de bloques después de un tratamiento unilateral con 2 kGy. Se pudo observar cómo los electrones acelerados penetran de forma muy diferente en ambas matrices.

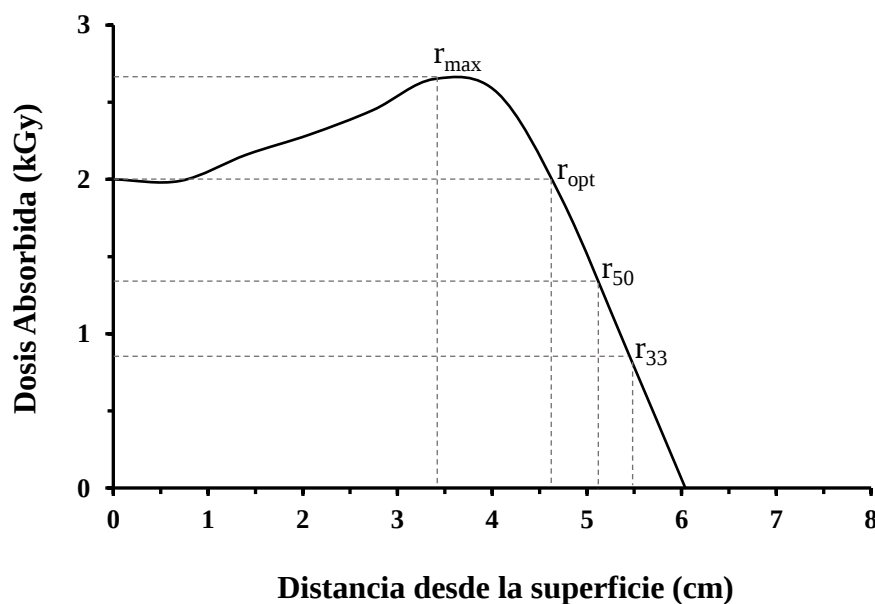


Figura 18. Curva de distribución de la dosis en relación a la profundidad de un bloque conformado por lonchas de tocino tras un tratamiento unilateral con electrones acelerados a dosis de 2 kGy.

r_{max} : profundidad a la que se registra la dosis máxima (3,4 cm)

r_{opt} : profundidad a la que se registra la dosis igual a la dosis aplicada (4,6 cm)

r_{50} : profundidad a la que se registra la mitad de la dosis máxima (5,2 cm)

r_{33} : profundidad a la que se registra la tercera parte de la dosis máxima (5,5 cm)

En las muestras conformadas solo por tocino (Figura 18), se observó que la dosis máxima (r_{max}) absorbida fue de aproximadamente 2,7 kGy a 3,4 cm medidos desde la superficie del producto. La profundidad a la que la dosis es igual a la dosis aplicada o de entrada (r_{opt}), es decir 2 kGy, fue a los aproximadamente 4,6 cm, la profundidad a la que la dosis fue igual a la mitad de la dosis máxima (r_{50}), aproximadamente 1,35 kGy ($2,7 \text{ kGy}/2$), fue a los 5,2 cm y la profundidad a la que la dosis fue de a un tercio de la dosis máxima (r_{33}), es decir 0,9 kGy ($2,7 \text{ kGy}/3$), fue a los 5,5 cm. A los 6 cm de profundidad la dosis absorbida fue imperceptible.

En la parte magra (Figura 19) la dosis máxima absorbida fue de 2,8 kGy y se alcanzó a aproximadamente 3 cm de profundidad (r_{max}). El r_{opt} fue de 3,8 cm, mientras que r_{50} (1,4 kGy) y r_{33} (aproximadamente 0,9 kGy) fueron de aproximadamente 4,3 y 4,5 cm de profundidad, respectivamente. En este caso, la dosis absorbida fue imperceptible a partir de 5 cm aproximadamente.

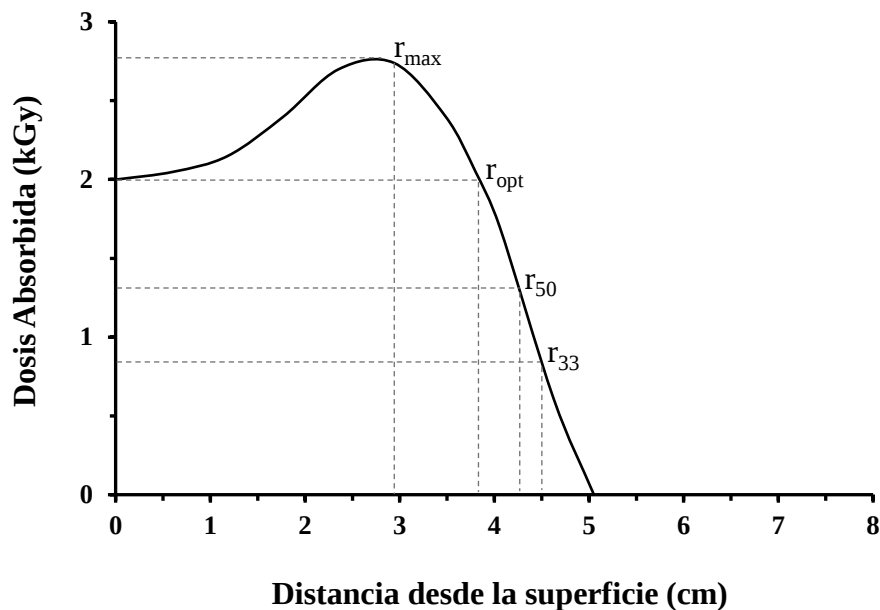


Figura 19. Curva de distribución de la dosis en relación a la profundidad de un bloque conformado por lonchas de la parte magra del jamón tras un tratamiento unilateral con electrones acelerados a dosis de 2 kGy.

r_{max} : profundidad a la que se registra la dosis máxima (3 cm)

r_{opt} : profundidad a la que se registra la dosis igual a la dosis aplicada (3,8 cm)

r_{50} : profundidad a la que se registra la mitad de la dosis máxima (4,3 cm)

r_{33} : profundidad a la que se registra la tercera parte de la dosis máxima (4,5 cm)

Por una parte, la dosis máxima absorbida fue muy similar en ambos tipos de producto, 2,7 y 2,8 kGy para el tocino y la parte magra del jamón, respectivamente. Sin embargo, la profundidad que alcanza la dosis máxima (r_{max}) varía según el tipo de producto, 3,4 cm vs 3 cm, en tocino y magro, respectivamente.

Se ha descrito que la dosis absorbida aumenta bajo la superficie y luego disminuye gradualmente y se explica por el fenómeno de retrodispersión o efecto Compton, discutido anteriormente. Este patrón de distribución se observó tanto en los bloques de tocino como en los de magro.

Quizás lo más relevante es que la profundidad a la que penetran los electrones acelerados difiere en 1 cm de una matriz a otra (6 vs 5 cm en tocino y magro, respectivamente). Estos datos están de acuerdo con lo descrito por Kim y col., (2008, 2010) en relación con el efecto de la matriz de un alimento. Por ejemplo, el aire que puede estar presente en algunos alimentos, como la cámara de aire de los huevos, tiene una densidad tan insignificante ($1,2 \text{ kg/m}^3$) que los electrones acelerados lo atraviesan con mucha facilidad y en el trayecto la pérdida de energía es despreciable (dosis absorbida=0) (Kim y col., 2006ab, 2011). En el

extremo opuesto, estructuras como huesos o la cáscara de huevo, que presentan una densidad mucho mayor (de hasta 1500 kg/m^3), reducen el poder de penetración de los electrones acelerados, quedando en el interior y alrededor de estas estructuras, por lo que consecuentemente la dosis absorbida en ellas es más alta que en otros componentes del mismo alimento (Kim y col., 2007, 2011).

Esto explicaría las diferencias detectadas en la penetración de electrones en las partes grasa y magra del jamón. Por lo tanto, se podría concluir que la penetración de los electrones acelerados y la deposición de energía o dosis absorbida en un jamón curado deshuesado serían, en gran medida, dependiente de su densidad y mayor en aquellos jamones que presentan una capa de grasa subcutánea más gruesa.

4.3.2.- Modelo matemático de la penetración de los electrones acelerados en el jamón curado deshuesado

Para simular diferentes espesores de capa de grasa subcutánea y acercarnos más a la realidad de un jamón, se llevó a cabo un experimento con un tercer tipo de bloques, formado por 12 lonchas superpuestas en diferente proporción de tocino/magro (3/9, 2/10, 1/11) entre las que se intercalaron los dosímetros. Estos bloques fueron irradiados bilateralmente a dosis de 2 kGy. Con los registros obtenidos de la lectura de los dosímetros, se modelizó la distribución de las dosis absorbidas a lo largo de los bloques (véase apartado 3.2.8.2 de Material y Métodos).

Dicha modelización tenía el objetivo de predecir cuál sería la dosis absorbida a una determinada profundidad desde la superficie del jamón irradiado en función de su composición (relación entre parte grasa y magra del jamón). Este trabajo se ha realizado en colaboración con el Prof. José Javier Benedito Fort y el Prof. Juan A. Cárcel del Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural de la Universidad Politécnica de Valencia.

El modelo matemático que mejor representa esta relación consta de dos sumandos, uno de ellos es una función de Gompertz y el otro es una función lineal de dos fases.

El modelo cuenta con 4 parámetros con un significado físico muy claro:

$$\text{Dosis} = T + C' \cdot \text{EXP}(-\text{EXP}(B' \cdot (\text{distancia})))$$

Donde:

$T = \text{lat}$, si $0 < \text{distancia} < \text{lat}$

$T = \text{dec} \cdot (\text{distancia} - \text{lat})$, si la distancia $> \text{lat}$

lat: valor de distancia hasta donde crece la dosis = $1,875 \cdot (\text{cm de tocino}) + 28,056$

dec: pendiente de la parte lineal de decrecimiento de la dosis = $-0,187$

B' : Relacionado con la tasa de crecimiento de la dosis = $0,0026 \cdot (\text{cm de tocino}) - 0,0149$

C' : Relacionado con el umbral de partida de la dosis = $6,0059$

Distancia: Distancia de cada punto desde la superficie del jamón en cm

EXP: Base del logaritmo natural e elevado a una potencia específica

Los valores de los parámetros lat, dec, B' y C' fueron determinados tras el ajuste del modelo a los valores experimentales, es decir, las dosis absorbidas a una distancia determinada y recogidas por los dosímetros. Este ajuste resultó en una relación de estos parámetros con el grosor del tocino, representado en la Figura 20, en la que se observan los valores obtenidos de lat y B' para 4 niveles distintos de espesor de tocino (sin tocino y con 1, 2 o 3 lonchas de tocino de aproximadamente 0,8 cm cada una). Para determinar los valores de los parámetros en jamones que no tienen tocino en la capa externa, únicamente se utilizaron las dosis absorbidas resultantes tras el tratamiento por el lado sin tocino.

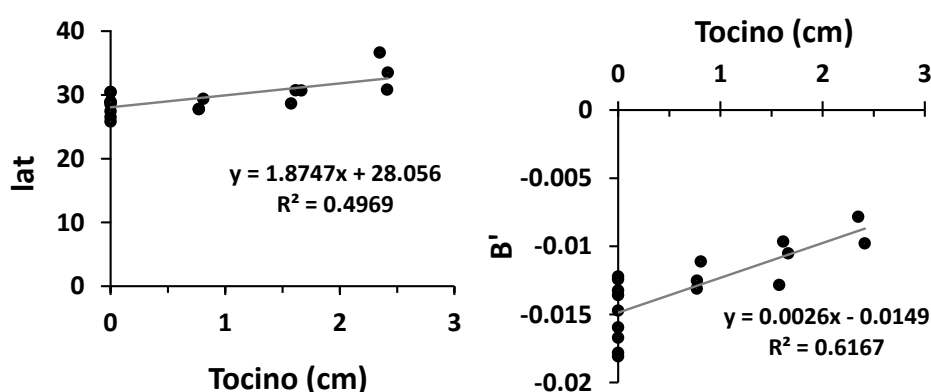


Figura 20. Relación entre los parámetros del modelo matemático lat y B' y el espesor de tocino de las muestras constituidas por cuatro niveles distintos de tocino y parte magra del jamón.

Los parámetros lat y B' mostraron una relación lineal con el espesor de tocino de las muestras (Figura 20). En el caso de los parámetros dec y C' no se identificó una relación significativa con el espesor de tocino, por lo que se optó por utilizar un valor promedio a modo de constante para ambos. Así, con este modelo se confirma la importancia que supone la composición de la matriz, en términos de parte grasa y magra del jamón, en la penetración del tratamiento y, por ende, en la distribución de las dosis absorbidas.

Posteriormente, ya usando los valores determinados para los parámetros lat , dec , B' y C' , se calcularon con el modelo las dosis que se absorberían a diferentes profundidades de los bloques conformados por diferentes proporciones de tocino y magro de jamón y se compararon con los datos experimentales (dosis absorbidas por los dosímetros) obtenidos a esas mismas profundidades. Los resultados se muestran en la Figura 21.

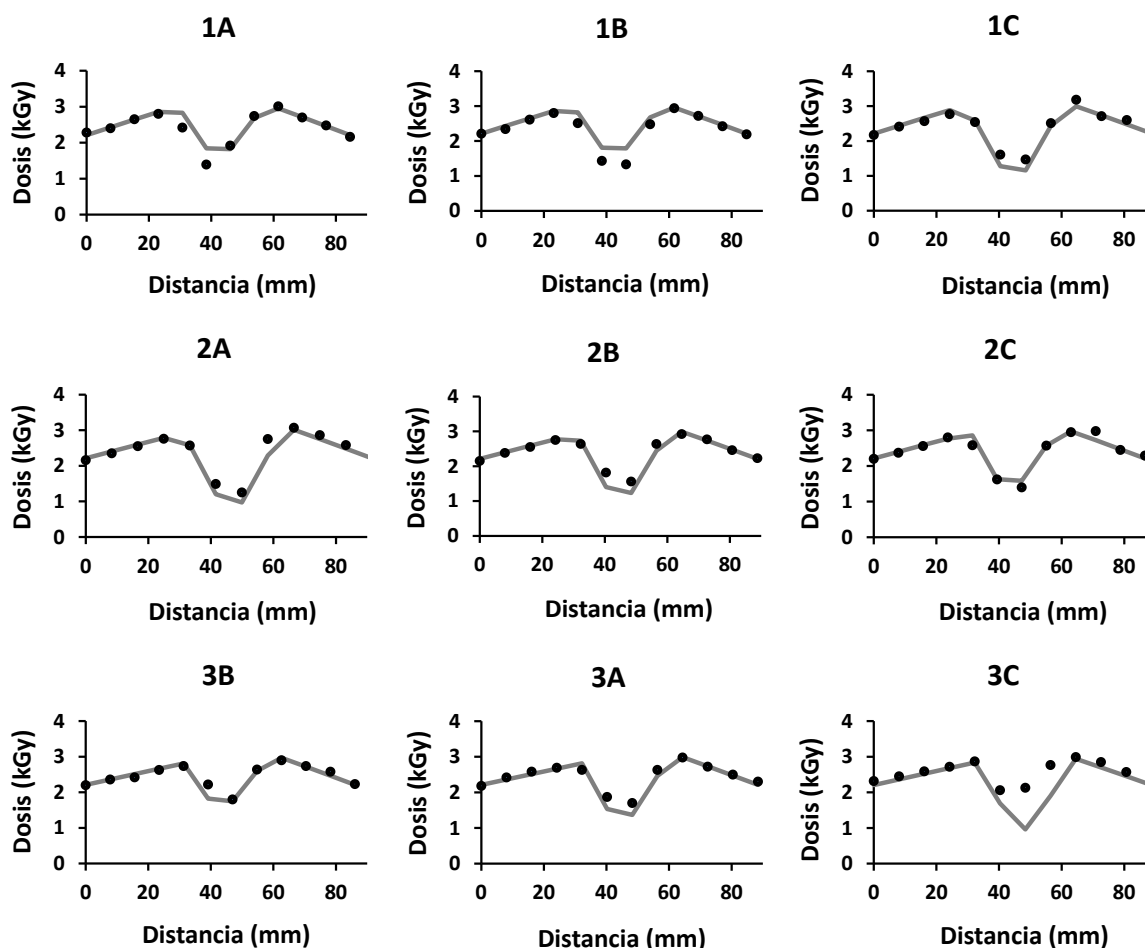


Figura 21. Dosis absorbidas por muestras conformadas por lonchas de tocino y magro del jamón a distintas profundidades después de un tratamiento bilateral con 2 kGy. Las muestras estaban conformadas por 1 (1A, 1B y 1C), 2 (2A, 2B y 2C) y 3 (3A, 3B y 3C) lonchas de tocino completando hasta doce con lonchas de magro. Los puntos (●) representan los datos experimentales y las líneas (—) representan datos calculados por el modelo.

El modelo fue capaz de explicar aproximadamente el 90% de la variabilidad de la distribución de las dosis ($R^2 > 0,8$). Se demostró que la tendencia de las dosis experimentales y las calculadas por el modelo es muy similar, incluso en la muestra 3C, que fue la que peor se ajustó al modelo. Por tanto, se podría concluir que, dentro de los límites de la capa de grasa establecidos en este experimento y que intentan representar el espesor de la capa grasa subcutánea del jamón curado, la mayor capacidad de penetración de los electrones acelerados en la parte grasa que en la magra del jamón, no es determinante para su higienización ya que con un tratamiento bilateral con 2 kGy se absorbe, por lo menos, la dosis mínima de 1,32 kGy a través de la matriz de todos los productos irradiados, dosis necesaria para alcanzar el FSO respecto a *L. monocytogenes*.

El análisis en conjunto de estos experimentos realizados hasta el momento indica que el grosor del jamón curado deshuesado es el factor determinante para su higienización con electrones acelerados.

4.4.- Efecto del tratamiento sobre las propiedades sensoriales de jamón curado deshuesado

Tras conocer que cuando el tratamiento se aplicaba a piezas enteras, sin lonchear, de jamón curado deshuesado, las dosis absorbidas diferían mucho de uno a otro nivel de profundidad, surgió la necesidad de realizar un análisis sensorial para investigar la posible influencia en la percepción sensorial por parte de los consumidores. Para ello, piezas de jamones curados deshuesados se irradiaron con una dosis de 2 kGy de forma bilateral y, posteriormente, se envasaron a vacío y se almacenaron en refrigeración durante 30 días. Las piezas se lonchearon para su evaluación sensorial mediante una prueba hedónica de nivel de agrado (véase apartado 3.2.9.2 de Material y Métodos). Las muestras se sometieron a evaluación después del tratamiento y a diferentes tiempos durante el almacenamiento en refrigeración (4°C). Los consumidores debían indicar su valoración rayando una línea vertical sobre una escala no estructurada de 10 cm, teniendo como referencia los extremos (muy desagradable – muy agradable) y una raya en el centro (5 cm) que indicaba el límite de aceptabilidad. Los atributos evaluados fueron los siguientes: color, textura, olor, sabor y aceptabilidad general.

Tabla 13. Puntuaciones obtenidas mediante una prueba de nivel de agrado para cada una de las propiedades sensoriales evaluadas de jamón curado deshuesado no irradiado e irradiado (2 kGy) después del tratamiento (día 0) y a diferentes tiempos (7, 15 y 30 días) durante el almacenamiento a 4°C.

Tiempo (Días) Dosis	0		7		15		30	
	0 kGy	2 kGy	0 kGy	2 kGy	0 kGy	2 kGy	0 kGy	2 kGy
Aspecto Visual	6,8 ^a ± 1,3	6,8 ^a ± 1,3	7,0 ^a ± 1,5	6,1 ^a ± 2,0	6,8 ^a ± 1,7	6,7 ^a ± 1,6	7,3 ^a ± 1,3	7,6 ^a ± 1,4
Color	7,0 ^a ± 1,2	6,8 ^a ± 1,3	6,8 ^a ± 1,4	5,6 ^a ± 2,3	6,6 ^a ± 1,7	6,3 ^a ± 1,9	7,0 ^a ± 1,4	7,5 ^a ± 1,6
Olor	6,9 ^a ± 1,4	5,9 ^b ± 1,1	6,6 ^a ± 1,3	5,5 ^b ± 1,6	6,4 ^a ± 1,6	5,3 ^b ± 1,4	6,7 ^a ± 1,3	7,3 ^a ± 1,4
Sabor	6,5 ^a ± 1,5	5,9 ^a ± 1,5	6,1 ^a ± 1,8	5,9 ^a ± 1,9	5,9 ^a ± 1,4	5,4 ^a ± 1,9	6,8 ^a ± 1,8	6,8 ^a ± 2,0
Textura	6,8 ^a ± 1,6	6,6 ^a ± 1,9	6,0 ^a ± 1,8	5,8 ^a ± 2,1	6,4 ^a ± 1,5	6,2 ^a ± 1,7	6,9 ^a ± 1,9	7,1 ^a ± 1,9
Aceptabilidad general	6,8 ^a ± 1,7	6,5 ^a ± 1,3	6,6 ^a ± 1,4	6,1 ^a ± 1,5	6,2 ^a ± 1,2	5,6 ^a ± 1,3	6,9 ^a ± 1,3	7,2 ^a ± 1,7

^{a,b} Letras diferentes en la misma fila y para el mismo tiempo de almacenamiento indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Puede observarse en la Tabla 13 que todas las propiedades de las muestras irradiadas obtuvieron puntuaciones inferiores a las de las muestras no irradiadas durante los primeros 15 días de almacenamiento, aunque no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$), excepto en el olor. En relación al olor, se detectaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) inmediatamente después del tratamiento (día 0) respecto a los días 7 y 15; sin embargo, dichas diferencias no se apreciaron en el análisis del día 30. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros autores (Ahn y Lee, 2006; Brewer, 2009; Cabeza y col., 2009), que han descrito olores desagradables, como "a irradiación", "metálico", "pluma escaldada" y "medio de cultivo", en muestras irradiadas.

Observaciones similares también han sido descritas por otros autores, quienes han indicado que los compuestos volátiles responsables de los malos olores en diferentes productos irradiados: carne fresca (Ahn y col., 2000), lonchas de jamón cocido (Cabeza y col., 2007), salmón ahumado en frío (Medina y col., 2009), productos cárnicos funcionales (Galán y col., 2010; Galán y col., 2013) y ensalada de patatas con mayonesa (Cambero y col., 2011), entre otros, desaparecen durante el almacenamiento.

Sin embargo, no se conoce con exactitud la causa por la que con el tiempo desaparecen estos olores "a irradiación". Es posible que los radicales, altamente reactivos, generados por efecto del tratamiento, interaccionen entre sí o con otros componentes de los alimentos, formando compuestos más estables. Probablemente, además, este fenómeno se hace más evidente en almacenamientos prolongados debido a que dichas interacciones suceden de forma lenta (Ahn y col., 2000; Cabeza y col., 2007; Cabeza y col., 2009).

Zanardi y col. (2009) observaron una relación directa entre el grado de oxidación de las grasas y la dosis de irradiación. Estos autores sugirieron, basándose en el mecanismo de oxidación lipídica inducida por radicales libres, que cabría esperar que los productos resultantes de dicha oxidación evolucionaran con el tiempo a otras moléculas. Sin embargo, describieron que el contenido de algunos compuestos de la oxidación lipídica como el malondialdehído y los óxidos de colesterol aumentaban en función de la dosis de irradiación y el tiempo de almacenamiento (60 días).

A pesar de que las muestras irradiadas recibieron puntuaciones inferiores a las no irradiadas, fueron siempre superiores al límite de aceptabilidad (5 puntos) para las diferentes propiedades sensoriales evaluadas, es decir, todas las muestras fueron valoradas como "aceptables" o "agradables". Los resultados fueron muy diferentes a los obtenidos en el análisis sensorial de las lonchas de jamón (véase apartado 4.2.2). Sin embargo, el tratamiento no produjo cambios de relevancia en la aceptación general del producto, por lo que los resultados fueron satisfactorios a pesar de que en aquellas zonas en las que el espesor del jamón es inferior se absorbe una dosis superior a 2 kGy debido a la acumulación de dosis residuales descrito anteriormente.

Por tanto, puede decirse que el tratamiento propuesto, además de eficaz en la consecución del objetivo de seguridad alimentaria, no produce cambios en la aceptabilidad general del producto.

4.5.- Compuestos volátiles como posibles marcadores del tratamiento de irradiación en jamón curado

La mayoría de los cambios químicos de la carne irradiada derivan de las interacciones de los radicales libres generados por el tratamiento de irradiación con numerosos componentes orgánicos de los alimentos, como proteínas y lípidos, formando, entre otros, compuestos volátiles responsables del olor característico a irradiación descrito anteriormente. De hecho, se ha reportado que los productos cárnicos irradiados presentan una mayor concentración de compuestos volátiles que la no irradiada. La formación de estos compuestos depende en gran medida de la dosis aplicada, por lo que su identificación podría resultar útil para la detección de alimentos irradiados (Bhattacharjee y col., 2003; Barreira y col., 2018; Prakash, 2020).

En este trabajo, por tanto, se han analizado los compuestos volátiles presentes en los jamones curados deshuesados no tratados y tratados con electrones acelerados, con el objetivo de identificar potenciales marcadores de este tratamiento.

Para ello, se aplicaron diferentes dosis de irradiación (1, 2 y 10 kGy) a lonchas de jamón curado deshuesado envasadas a vacío. Posteriormente, a diferentes tiempos (días 1, 15 y 30) durante su almacenamiento en refrigeración (4°C), se procedió a la determinación de los compuestos volátiles presentes mediante microextracción en fase sólida y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, bajo las condiciones y parámetros que se recogen en el apartado 3.2.10 de Material y Métodos.

Los resultados obtenidos permitieron identificar un total de 87 compuestos volátiles diferentes, que se agruparon en base a su grupo funcional, siendo los hidrocarburos (alcanos y alquenos) el grupo predominante (38%), sobre todo en los jamones irradiados, en una concentración relacionada directamente con la dosis. Así, la proporción de hidrocarburos en los jamones sin irradiar estuvo en el rango de 27-34% y en los irradiados con 1, 2 y 10 kGy, en los rangos de 30-33%, 32-36% y 41-42%, respectivamente (Figura 22). En proporción algo inferior se identificaron alcoholes (16%), cetonas (14%), aldehídos (12%) y ácidos (8%). Además, otros grupos menos abundantes como éteres, ésteres y compuestos clorados, nitrogenados, sulfúricos y bencenos, también estaban presentes.

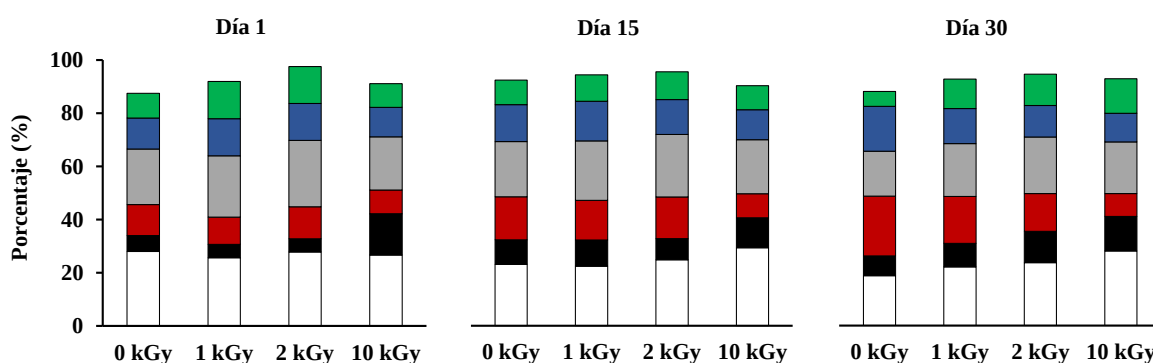


Figura 22. Compuestos volátiles presentes en jamón curado control (0 kGy) e irradiado con diferentes dosis (1, 2 y 10 kGy). Alcanos (blanco), alquenos (negro), alcoholes (rojo), aldehídos (gris), cetonas (azul) y ácidos (verde).

En la Tabla 14 se muestran los 87 compuestos volátiles identificados en este trabajo tanto en jamones no irradiados (0 kGy) como irradiados a diferentes dosis (1, 2 o 10 kGy) en los diferentes días de análisis (1, 15 o 30 días) durante el almacenamiento a 4°C.

Tabla 14. Compuestos volátiles identificados en jamones no irradiados (0 kGy) e irradiados a diferentes dosis (1, 2 y 10 kGy) y almacenados a 4°C durante 1, 15 y 30 días.

Grupo Químico	Número CAS	Dosis (kGy)	Día
<u>Alcano</u>			
2,4-dimetil-heptano	2213-23-2	0	1, 15, 30
2,2-dimetil-hexano	590-73-8	0	30
2,3,3-trimetil-pentano	560-21-4	0	1
2,3,4-trimetil-pentano	565-75-3	0	1, 15, 30
2,2,4,4-tetrametiloctano	62183-79-3	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
2,2,4,6,6-pentametil-heptano	13475-82-6	1, 2, 10	1, 15, 30
2,2,5-trimetil-hexano	3522-94-9	0	1
2-metil-pentano	107-83-5	0	1
3-metil-pentano	96-14-0	1, 2, 10	30
4-metil-heptano	589-53-7	0	1, 15
Pentano	109-66-0	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Hexano	110-54-3	2	1
Heptano	142-82-5	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Octano	111-65-9	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Nonano	111-84-2	1, 2, 10	1, 15, 30
Decano	124-18-5	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Dodecano	112-40-3	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Tridecano	629-50-5	10	1, 15, 30
Undecano	1120-21-4	10	1, 15, 30
Pentadecano	629-62-9	10	1, 15, 30
<u>Alqueno</u>			
1-penteno	109-67-1	1, 2, 10	30
1-hexeno	592-41-6	10	1, 15
1-hepteno	592-76-7	10	1, 15, 30
1-octeno	111-66-0	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
1-noneno	124-11-8	10	1
1-deceno	872-05-9	10	1, 15, 30
2-metil-1-penteno	763-29-1	0, 1, 2, 10	30
2,4-dimetil-1-hepteno	19549-87-2	0, 1, 2, 10	30
2-metil-1-butenos	563-46-2	10	1
3-metil-3-hepteno	7300-03-0	2	15
3-metil-3-hexeno	3404-65-7	2	15
2-metil-2-butenos	513-35-9	10	1
(E)-2-octeno	13389-42-9	0, 1, 15, 30	30
<u>Ácido</u>			
Ácido 2-metilbutanoico	116-53-0	0, 1	1
Ácido 4-metilpentanoico	646-07-1	10	30
Ácido acético	64-19-7	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Ácido butanoico	107-92-6	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Ácido hexanoico	142-62-1	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Ácido octanoico	124-07-2	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Ácido nonanoico	112-05-0	1, 2, 10	30

Éster

Hexanoato de etilo	123-66-0	2	30
Decanoato de etilo	110-38-3	10	15
Hexanoato de vinil	3050-69-9	1	1

Alcohol

2-metil-2-propanol	75-65-0	0	1, 15, 30
2-metil-2-butanol	75-85-4	0	1, 15
2-metil-1-butanol	137-32-6	0, 1, 2	15, 30
2-metil-1-propanol	78-83-1	0	30
3-metil-1-butanol	123-51-3	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
1-metoxi-2-propanol	107-98-2	10	1
1-octen-3-ol	3391-86-4	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
1-pentanol	71-41-0	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
1-heptanol	111-70-6	0, 1, 2, 10	30
1-hexanol	111-27-3	0, 1, 2	15, 30
2-pentanol	31087-44-2	0	1, 15, 30
2-hexanol	626-93-7	0	30
2-heptanol	543-49-7	0, 1	30
Alcohol bencílico	100-51-6	0	30

Aldehído

2-metil-butanal	96-17-3	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
2-metil-propanal	78-84-2	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
3-metil-butanal	590-86-3	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Pentanal	110-62-3	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Heptanal	111-71-7	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Hexanal	66-25-1	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Octanal	124-13-0	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Nonanal	124-19-6	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Dodecanal	112-54-9	0	30
Fenilacetaldehído	122-78-1	0, 1, 2, 10	1, 15, 30

Éter

2-etoxi-2-metil-propano	637-92-3	0	1, 15, 30
2-metoxi-2-metil-propano	1634-04-4	0	1

Cetona

2-butanona	78-93-3	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
2-pentanona	107-87-9	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
2-hexanona	591-78-6	1, 2, 10	1, 15, 30
2-heptanona	110-43-0	0	15, 30
2-octanona	111-13-7	0, 1	1, 15, 30
2-nonanona	821-55-6	0	30
2-undecanona	112-12-9	0	30
3-octanona	106-68-3	0	30
Acetoina	513-86-0	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Hidroxiacetona	116-09-6	0	15
Isobutilmetilcetona	108-10-1	0	1, 30
2(3H)-5-ethildihidrofuranona	695-06-7	1, 2, 10	1, 15, 30

Compuestos Bencenos

1,3-dimetilbenzeno	108-38-3	0	30
1,3-bis(1,1-dimetiletil)-benceno	1014-60-4	0, 1, 2, 10	1, 15, 30

Compuestos Sulfúricos

Disulfuro de carbono	75-15-0	0, 1, 2, 10	1, 15, 30
Disulfuro de dimetilo	624-92-0	0, 1, 2, 10	30

Otros compuestos

Hexanonitrilo	628-73-9	10	1
Triclorometano	67-66-3	2	15

*Número CAS: Indica el número de identificación del compuesto químico que ha sido asignado por la “Chemical Abstracts Service (CAS)” de la Sociedad Americana de Química.

*Día: Días de almacenamiento a los que se identifica cada compuesto

En estudios previos realizados sobre compuestos volátiles en jamón curado, se han obtenido resultados muy dispares. En este sentido, y acorde con nuestros resultados, Pérez-Santaescolástica y col. (2018) observaron que los hidrocarburos eran los principales compuestos volátiles en el jamón curado español. Por el contrario, en otros trabajos, los aldehídos constituyen el grupo mayoritario en los jamones Serrano, Ibérico, Toscano, de Istria y de Jinhua (Ruiz y col., 2001; Gianelli y col., 2002; Pugliese y col., 2010; Marušić y col., 2014; Petričević y col., 2018; Domínguez y col., 2019; Sirtori y col., 2020). Pérez-Juan y col. (2006) describieron que los compuestos volátiles más abundantes del jamón curado eran los alcoholes, seguido de las cetonas y aldehídos.

Los compuestos volátiles están presentes en todos los productos cárnicos y resultan de numerosas y complejas reacciones. La mayoría de esas reacciones tienen lugar durante la fase de maduración y derivan principalmente de los procesos lipolíticos y proteolíticos (Leroy y col., 2013; Montanari y col., 2018); los ácidos grasos libres, aminoácidos libres y péptidos liberados constituyen sustratos para las reacciones de oxidación, Strecker y Maillard, produciéndose una gran variedad de compuestos volátiles con distintos matices aromáticos y/o de olor (Lorenzo y Carballo 2015; Petričević y col., 2018).

Específicamente, la abundancia relativa de los grupos de compuestos volátiles, principalmente de los ácidos, alcoholes, aldehídos, cetonas, compuestos de benceno y compuestos de azufre, refleja la composición química del jamón curado evaluado y esta, a su vez, estaría determinada por una serie de factores relacionados con las particularidades de la materia prima y la tecnología aplicada (Gilles, 2009; Toldrá, 2012; Martínez-Onandi y col., 2016).

Tabla 15. Compuestos volátiles propuestos como posibles marcadores de irradiación presentes en las muestras control (blanco) o en las muestras tratadas (gris).

	Día 1				Día 15				Día 30			
	0 kGy	1 kGy	2 kGy	10 kGy	0 kGy	1 kGy	2 kGy	10 kGy	0 kGy	1 kGy	2 kGy	10 kGy
ALCANOS												
2,3,4-trimetil-pentano	X				X				X			
4-metil-heptano	X				X							
2,4-dimetil-heptano	X				X				X			
Undecano				X				X				X
Tridecano				X				X				X
Pentadecano				X				X				X
3-metil-pentano		X	X	X		X	X	X		X	X	X
2,2,4,6,6-pentametil-heptano		X	X	X		X	X	X		X	X	X
Nonano		X	X	X		X	X	X		X	X	X
ALQUENOS												
2-metil-1-penteno	X				X				X			
2,4-dimetil-1-hepteno	X				X				X			
1-Hexeno				X				X				
1-Hepteno				X				X				X
1-Noneno				X								
1-Deceno				X				X				X
ALCOHOLES												
2-metil-2-propanol	X				X				X			
2-pentanol	X				X				X			
2-metil-2-butanol	X				X							
CETONAS												
Metil isobutil cetona	X				X				X			
2-hexanona		X	X	X		X	X	X		X	X	X
5-etildihidro-2(3H)-furanona		X	X	X		X	X	X		X	X	X
ÉTER												
2-etoxi-2-metil-propano	X				X				X			

En la tabla 15 se muestran los compuestos volátiles propuestos como posibles marcadores de irradiación. Del total de compuestos volátiles determinados, se seleccionaron 18, aquellos que podrían ser considerados indicadores de la irradiación, en función de su comportamiento con la dosis aplicada y su evolución a lo largo del almacenamiento en refrigeración. Además, también se incluyen otros cuatro compuestos que desaparecen durante el almacenamiento posterior a la aplicación de electrones acelerados.

Del conjunto de volátiles seleccionados, 5 estuvieron presentes en todas las muestras irradiadas: 3 alcanos (nonano, 2,2,4,6,6-pentametil heptano y 3-metil pentano) y 2 cetonas (2-hexanona y 5-etilhidro-2(3H)-furanona), mientras que 7 se encontraron únicamente en las muestras irradiadas con 10 kGy: 3 alcanos (pentadecano, tridecano y undecano) y 4 alquenos (1-hexeno, 1-hepteno, 1-noneno, 1-deceno). Diez de los compuestos volátiles se detectaron solo en las muestras sin irradiar: 3 alcanos (2,4-dimetil heptano, 4-metil heptano y 2,3,4-trimetil pentano), 2 alquenos (2-metil-1-penteno y 2,4-dimetil-1-hepteno), 3 alcoholes (2-metil-2-propanol, 2-metil-2-butanol y 2-pentanol), 1 cetona (metil isobutil cetona) y 1 éter (2-etoxi-2-metil-propano), por lo que también podrían ser considerados como potenciales marcadores radiolíticos.

En general, estos compuestos estuvieron presentes durante todo el periodo de almacenamiento, excepto el 1-noneno, que no se detectó a los 15 días, y el 1-hexeno, 4-metil-heptano y el 2-metil-2-butanol, que no se encontraron a los 30 días.

Es un hecho conocido que la irradiación modifica el perfil de estos compuestos volátiles, ya sea por la generación de nuevos compuestos inducidos por el tratamiento o por la transformación de los compuestos volátiles ya existentes. Por ejemplo, entre los aminoácidos libres, los alifáticos y los que contienen azufre son altamente susceptibles de un ataque radiolítico, pudiendo generar compuestos volátiles con impacto negativo en el aroma (Ahn y col., 2016 ab). Sin embargo, estos aminoácidos resultan mucho menos sensibles cuando forman parte de una proteína (Miller, 2005; Fan, 2013; Prakash, 2020). En cambio, los lípidos son las macromoléculas más sensibles a la irradiación debido al efecto, tanto directo como indirecto, de este tratamiento, en especial los ácidos grasos libres poliinsaturados. Además, la oxidación de los lípidos acarrea la formación de distintos compuestos volátiles, incluyendo hidrocarburos, alcoholes, cetonas y aldehídos (Fan, 2013; Ahn y col., 2017; Sirtori y col., 2020).

Diferentes autores han descrito que los hidrocarburos son los mayores componentes formados a partir de los ácidos grasos como consecuencia del efecto de los radicales libres derivados de la irradiación (Miyahara y col., 2002; Ahn y col., 2017). Esto concuerda con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, ya que también se ha observado que la mayoría de compuestos volátiles identificados en jamones irradiados pertenecían a este grupo.

Algunos de los compuestos identificados en este trabajo como potenciales marcadores de irradiación, también han sido reconocidos como tales en una gran variedad de alimentos: pentadecano, en jamón cocido (Barba y col., 2012); 1-hexeno, 1-hepteno y 1-noneno, en la carne (Ahn y col., 2017) y undecano, en jamón curado (Kong y col., 2017), entre otros.

Sin embargo, la mayoría de estos compuestos también han sido identificados en jamones curados no irradiados. Así, se ha detectado nonano en jamón Serrano (Gianelli y col., 2002), 2,2,4,6,6-pentametil heptano en Prosciutto crudo (Kong y col., 2017), 3-metil pentano en jamones Serranos (Armenteros y col., 2012b), 2-hexanona en jamón curado español (Ruiz y col., 2001; Gianelli y col., 2002; Pérez-Juan y col., 2006; Armenteros y col., 2012b), 5-etilhidro-2(3H)-furanona en jamón Serrano (Gianelli y col., 2002; Pérez-Juan y col., 2006; Martínez-Onandi y col., 2016) y de Toscana (Sirtori y col., 2020), pentadecano y tridecano en jamón de Istra (Marusic y col., 2014), en jamón curado español (Ruiz y col., 2001; Gianelli y col., 2002; Domínguez y col., 2019), en Prosciutto crudo (Kong y col., 2017) y

jamón de Toscana (Sirtori y col., 2020), y undecano en jamón curado español (Gianelli y col., 2002; Martínez-Onandi y col., 2016; Domínguez y col., 2019).

Existen muchos factores que influyen en el perfil de compuestos volátiles de un producto. En general, los distintos tipos de jamones poseen un perfil específico de estos compuestos. Incluso dentro de un mismo tipo de jamón pueden encontrarse diferencias dependiendo del contenido de sal (Marusic y col., 2011, 2014, Tian y col., 2020), el tipo de sal (Armenteros y col., 2012b) o el tiempo de maduración (Pérez-Juan y col., 2006; Sirtori y col., 2020). Es más, un mismo jamón puede presentar diferencias en el perfil de los compuestos volátiles dependiendo de la técnica de extracción empleada (Ruiz y col., 2001) y de la parte del jamón (codillo, centro o cadera) (Pérez-Juan y col., 2006) o de la loncha (parte grasa o magra) (Narváez-Rivas y col., 2010) analizada. Incluso si a una misma porción del jamón se le aplica un tratamiento con electrones acelerados o rayos gama, producirá un perfil de compuestos volátiles diferentes (Kong y col., 2017).

El perfil de los compuestos volátiles identificados en un alimento irradiado también se modifica a lo largo del almacenamiento tras el tratamiento, ya que algunos compuestos serán resultado inmediato de la acción de los radicales libres sobre sus componentes mientras que otros tendrán origen en reacciones químicas que pueden transcurrir de forma lenta y requerir más tiempo para hacer posible su detección, e incluso hay compuestos que desaparecen con el tiempo (véase apartado 4.4), lo que concuerda con nuestros resultados.

Por tanto, si bien los compuestos volátiles identificados como posibles marcadores del tratamiento con electrones acelerados en este trabajo son buenos candidatos para este fin e incluso algunos de ellos han sido identificados como tales previamente en otros productos cárnicos, es importante realizar trabajos adicionales para encontrar marcadores más precisos.

4.6.- Efecto del tratamiento con electrones acelerados en la fuerza de pegado del plasma en polvo utilizado para elaborar jamones curados reestructurados

Como ya se comentó en la Introducción, el plasma en polvo (PP) es el agente ligante en frío que ha mostrado los mejores resultados en la elaboración de jamones curados reestructurados, ya que aplicado directamente en el pernil de cerdo deshuesado en fresco, proporciona interacciones proteicas de mayor intensidad que otros ligantes, y en número suficiente para conformar la pieza y recuperar su forma original (Romero de Ávila y col., 2013, 2014b). El plasma en polvo debe sus propiedades aglutinantes al fibrinógeno ya que,

al entrar en contacto con la trombina, enzima disponible en cantidades suficientes en la carne fresca, produce aglutinación y la formación de fibrina (EFSA, 2015).

Sin embargo, desde el punto de vista tecnológico, la preparación de jamones reestructurados también implica una manipulación adicional que conlleva un riesgo de contaminación con microorganismos patógenos, entre los que se encuentra *Listeria*. Si para la higienización de estos jamones reestructurados se utilizasen electrones acelerados, la cuestión a resolver sería si el tratamiento afecta a las proteínas del agente ligante comprometiendo su capacidad de pegado.

Este estudio se llevó a cabo en un modelo desarrollado a pequeña escala, de aproximadamente 1 kg de peso, de jamón curado reestructurado (MJR), usando PP como agente de ligazón en frío. Para su procesado, se adaptaron las condiciones (tiempo, temperatura, humedad) de un proceso de elaboración convencional de jamón curado al tamaño del modelo desarrollado. De esta forma, se optimizaron las condiciones de cada etapa del procesado.

Una vez establecidas las condiciones más adecuadas, se estudió la evolución de la fuerza del pegado del plasma en polvo en modelos irradiados con 2 kGy en relación a los no irradiados y a lo largo de todo el procesado, así como los posibles cambios en la microestructura de la línea de pegado. Finalmente, se investigó la eficacia listericida del tratamiento bilateral de 2 kGy en los modelos contaminados de forma intencionada. Toda la metodología se encuentra descrita en el apartado 3.2.11 de Material y Métodos.

4.6.1.- Evolución de los parámetros físico-químicos de los modelos de jamones reestructurados durante su procesamiento

Para establecer las condiciones más adecuadas para el procesamiento de los MJR, se realizó un seguimiento de los cambios que se iban produciendo en los parámetros físico-químicos más relevantes (a_w , humedad, pH y contenido de sal) hasta comprobar que en los MJR evolucionaban de forma similar a los jamones convencionales, usando como valores de referencia del producto convencional los descritos por Asensio y Díaz (2001), Ventanas y Cava (2001) y Bosse y col. (2018).

Los resultados finales obtenidos se recogen en la Figura 23 donde se muestra una comparación entre los valores de humedad y a_w durante el procesamiento tanto de los MJR como de los jamones curados convencionales.

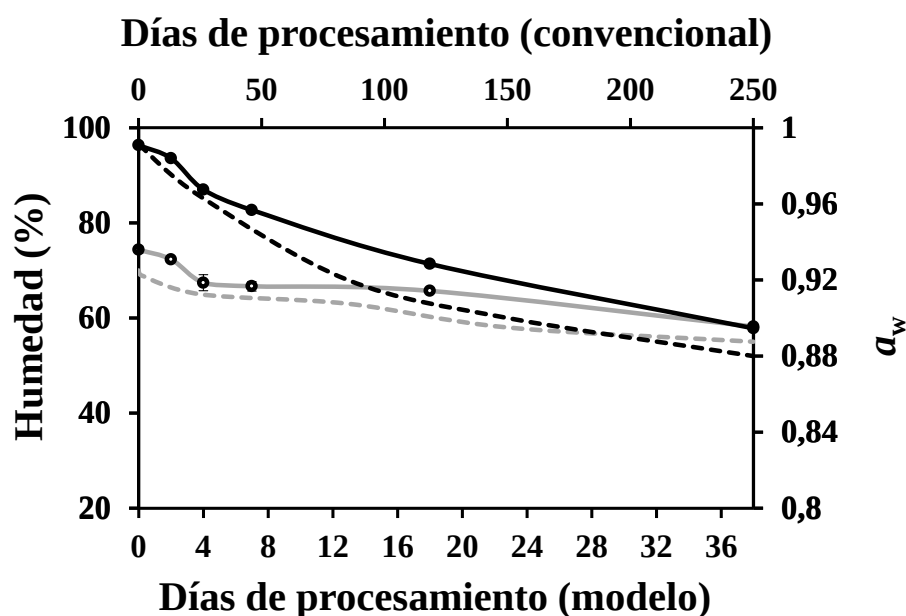


Figura 23. Evolución de la humedad (gris) y de la actividad del agua (negro) durante la elaboración del modelo de jamón curado reestructurado (líneas continuas) y de jamón curado convencional (líneas discontinuas).

En términos generales, con las condiciones finales establecidas, los parámetros físico-químicos de los MJR evolucionaron de manera similar que en un jamón curado convencional. Así, de acuerdo con los valores descritos por los autores antes mencionados, la humedad en los jamones curados convencionales pasa de valores iniciales cercanos al 70% (correspondiente al pernil fresco) a un 65% en el período de post-salado y a un 55% al final del período de secado/maduración. En los MJR, los valores de humedad determinados en estos períodos fueron muy similares: $75 \pm 0,9\%$, $67,4 \pm 2,4\%$ y $58,2 \pm 1,8\%$, respectivamente.

En ambos productos la a_w presentó valores de 0,990 en el pernil fresco y de 0,968 en el post-salado. Sin embargo, al final del procesamiento estos valores disminuyeron hasta 0,894 y 0,880 en los MJR y en los jamones curados convencionales, respectivamente.

En lo que se refiere al pH, diferentes autores indican un posible aumento del pH hasta 6,5 al final del período de secado/maduración en los productos convencionales como consecuencia de la proteólisis que se produce en este período con la consiguiente formación de nitrógeno no proteico (Losantos y col., 2000; Sánchez-Molinero y Arnau, 2008; Mora y col., 2009). En nuestros modelos, el valor del pH se mantuvo en torno a 6 durante todo el proceso y no se observó ese aumento, probablemente debido a que, al ser piezas de menor peso, el tiempo necesario para la maduración fue mucho más corto que en los jamones curados convencionales y la proteólisis fue menor. No obstante, nuestros valores están de

acuerdo con los de otros autores que han descrito amplios intervalos de pH en el producto final (de 5,1 a 6,4) para diferentes variedades de jamones curados (Toldrá, 2012; Petrova y col., 2015; Bosse y col., 2018).

Después de la fase de pegado, el contenido de sal fue de $1,31 \pm 0,79$ g/100 g de materia seca (MS) y después del período de secado/maduración (final del procesamiento), fue de $5,71 \pm 0,51$ g/100 g de MS. La determinación de cenizas en los mismos períodos fue de $2,63 \pm 0,79$ y $7,01 \pm 0,51$ g/100 g de MS, respectivamente, incremento relacionado con la migración de sal a los músculos y la pérdida de agua. Estos resultados son similares a los que han reportado anteriormente varios autores en los jamones curados convencionales (Petrova y col., 2015; Bosse y col., 2018).

La similitud del comportamiento de los parámetros físico-químicos en ambos productos permite establecer que la adaptación del proceso de fabricación tradicional propuesta es adecuada y que los MJR podrían considerarse como un modelo de jamón curado útil para las investigaciones realizadas en este trabajo.

En los MJR irradiados con dosis de 2 kGy, no se observaron cambios significativos en ninguno de los parámetros físico-químicos al compararlo con los MJR sin irradiar. Estos resultados son coherentes con los mostrados por otros autores, quienes no observaron diferencias significativas entre los parámetros físico-químicos (pH, la a_w , humedad, cenizas, contenido de sal) de los productos no irradiados y los irradiados con dosis de hasta 3 kGy, como atún y salmón ahumado (Medina y col., 2009; Cambero y col., 2012), queso (Velasco y col., 2011, 2015), cecina y jamón Ibérico (Cambero et al 2012) y lomo de cerdo, tanto fresco como marinado (García-Márquez y col., 2012ab), entre otros.

En consecuencia, los modelos desarrollados se consideraron útiles para el objetivo propuesto en esta parte del trabajo.

4.6.2.- Efecto del tratamiento con electrones acelerados en la fuerza de pegado del plasma en polvo (PP)

El primer paso fue determinar la fuerza de pegado del PP en los MJR sin irradiar a lo largo del procesado tomando muestras de diferentes modelos intentando que siempre estuviese la línea de pegado en el centro. La fuerza de pegado se determinó mediante un ensayo de tracción uniaxial, tal y como se describe en el apartado 3.2.11.6 de Material y Métodos. Los resultados se muestran en la Figura 24.

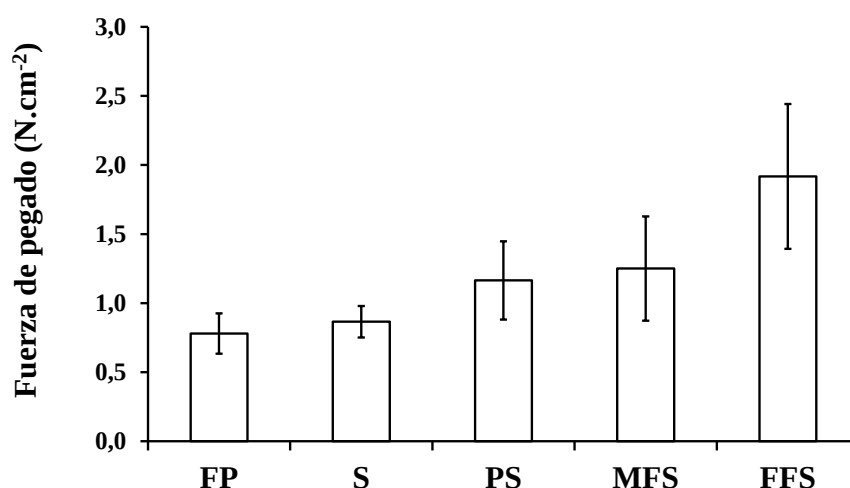


Figura 24. Fuerza de pegado (N.cm⁻²) de modelos de jamón curado reestructurado sin irradiar en diferentes momentos del proceso: FP (fase de pegado), S (salazón), PS (post-salado), MFS (mitad de la fase de secado/maduración, día 19) y FFS (final de la fase de secado/maduración, día 38).

Como puede observarse, se produjo un aumento progresivo en la fuerza de pegado a lo largo del tiempo de procesado, desde $0,78 \pm 0,15$ N.cm⁻² después de la fase de pegado (FP) a $1,96 \pm 0,52$ N.cm⁻² al final del período de secado-maduración (FFS), pero sólo se observó diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre la fuerza de pegado en las etapas iniciales (fase de pegado y salazón) y al final del secado-maduración. Estas diferencias podrían estar relacionadas con los cambios en la estructura y en la solubilidad de tienen lugar en las proteínas como resultado de la disminución de la humedad y la a_w y del aumento del contenido de sal. Así, se ha descrito que durante la salazón, el anión cloruro se une a los grupos proteicos cargados positivamente e incrementa la fuerza iónica del medio lo que reduce el espacio entre filamentos miofibrilares y, con ello, la retención de agua en la masa muscular (Toldrá, 2012; Toldrá y Barat, 2018). Como resultado global, se favorece la reorganización molecular entre las proteínas. Kramer y col., (2012) describieron que en estas condiciones se favorece el aumento de los enlaces cruzados entre las proteínas en general y, por consiguiente, las interacciones entre ellas; en nuestro caso, las interacciones se establecerían entre las proteínas del PP y las proteínas de la carne. Además, estos autores indicaron que la reducción del contenido de agua promueve la disminución de la solubilidad de las proteínas. Todo ello justificaría el aumento de la fuerza de pegado obtenido en nuestras muestras. Los resultados, además, coinciden con los obtenidos por Romero de Ávila y col. (2014b) en jamones curados enteros reestructurados también con PP.

Al comparar la fuerza de pegado entre las muestras irradiadas y las no irradiadas no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) (Figura 25), lo que parece indicar que este

tratamiento no compromete la capacidad de ligazón del PP y, por tanto, la estabilidad y consiguiente viabilidad de este tipo de productos.

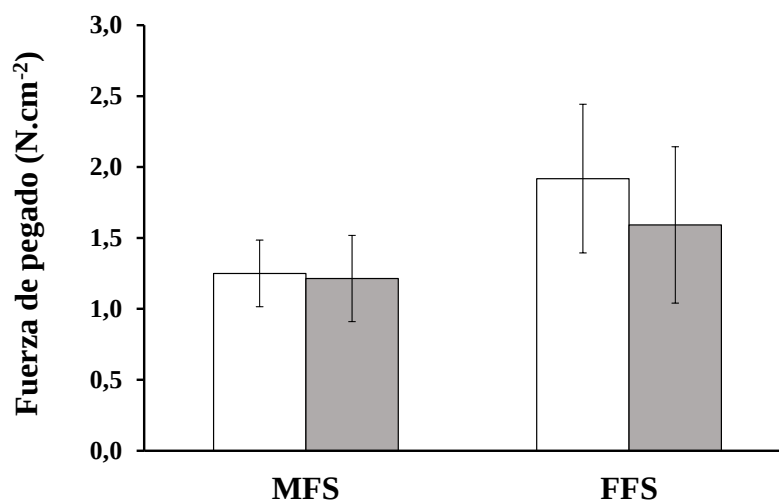


Figura 25. Fuerza de pegado (N.cm⁻²) del plasma en polvo en modelos de jamón curado reestructurado irradiado con 2 kGy (gris) y sin irradiar (blanco) a la mitad de la fase de secado/maduración (MFS) y al final de la fase de secado/maduración (FFS).

Existía la posibilidad de que el tratamiento pudiera afectar la estructura y/o la función aglutinante de las proteínas del PP, ya que la irradiación puede producir cambios en estas moléculas. En la revisión de Lalande y col. (2019) se recogen los posibles efectos de la irradiación en la estructura de las proteínas a causa de las reacciones químicas de los radicales libres radioinducidos, como la formación y/o ruptura de enlaces inter e intramoleculares, que conduce a la polimerización o fragmentación de la cadena polipeptídica, la agregación de los fragmentos formados o el entrecruzamiento entre las proteínas. La irradiación también puede producir un cambio conformacional de las estructuras secundaria y terciaria, resultando en la agregación, fragmentación, plegamiento y despliegue de las cadenas polipeptídicas que provoca un incremento de la función biológica de la proteína (Baccaro et al., 2018; Li y col., 2018; Lalande y col., 2019). Todos estos fenómenos han hecho que, en la actualidad, la irradiación no solo sea una alternativa atractiva para la conservación de alimentos sino también para la modificación de las proteínas, atribuyéndole efectos tanto de aumento como de disminución de distintas propiedades como viscosidad, solubilidad, emulsionante, espumante y resistencia a la tracción (Kuan y col., 2013).

Sin embargo, la aparición de estos efectos depende de factores como la temperatura, el pH, las características de la matriz, la concentración de proteínas o la dosis de radiación absorbida, entre otros (Baccaro et al., 2018). Así, las condiciones particulares de nuestro

experimento, principalmente la dosis aplicada y las características físico-químicas de los MJR, no parece que favorezcan la aparición de cambios significativos en la fuerza de pegado.

Estos resultados están relacionados con lo observado macroscópicamente, ya que los MJR mantuvieron su forma y firmeza después del tratamiento con electrones acelerados a dosis de 2 kGy. La zona de pegado se apreció siempre como una línea estable y firme, casi imperceptible, lo que confirió al MJR la apariencia de una sola pieza, tanto en las muestras irradiadas como en las no irradiadas.

4.6.3.- Determinación de la microestructura de la zona de pegado

Las Figuras 26 y 27 corresponden a imágenes de la zona de pegado obtenidas por microscopía electrónica de barrido con un aumento de x 5000, tanto en los MJR irradiados como sin tratar (muestras control). La Figura 26 corresponde a una imagen de la microestructura de esta zona en los MJR sin irradiar después de la fase de post-salado. En esta imagen se observa la zona de pegado como una red desorganizada de estructuras fibrosas entrecruzadas que interaccionan con las superficies cárnicas. Esta organización, además de revelar la apariencia de las interacciones propias del PP, puede corresponder a enlaces que surgen entre las proteínas cuando, como se ha mencionado anteriormente, pierden su estructura como consecuencia de la concentración de sal.

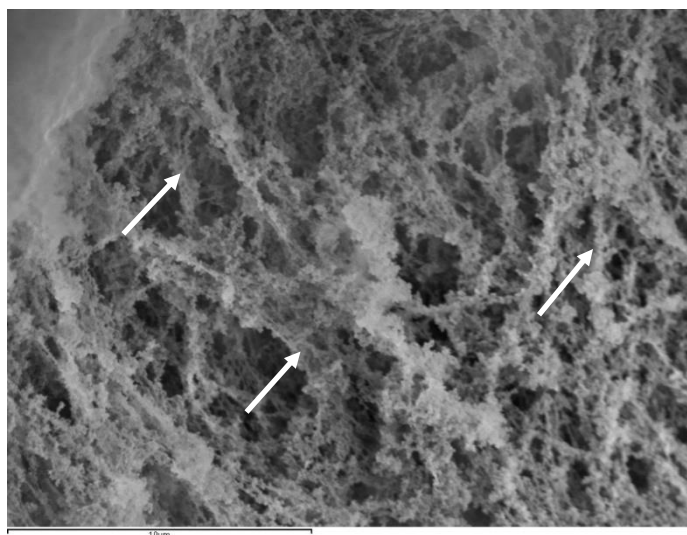


Figura 26. Microestructura de la zona de pegado de una pieza cárnica restructurada sin irradiar (muestra control) después del período de post-salado obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (x 5000). Las flechas señalan algunas de las estructuras fibrosas distribuidas en la zona de pegado.

La Figura 27 corresponde a imágenes obtenidas de la zona de pegado al final del período de secado-maduración en muestras no tratadas (A) y tratadas (B). En la muestra no tratada, (Figura 27A), al final del procesamiento esta estructura cambia y se observa más organizada y firme, y las estructuras fibrosas de la zona de pegado, que como hemos mencionado se interconectan con la carne, aparecen como filamentos retraídos y, por tanto, más gruesos. Romero de Ávila y col. (2014b) también describieron estos entrecruzamientos entre el plasma en polvo y las proteínas cárnicas durante el período de salazón e indicaron que fueron estables y se transformaron en estructuras compactas durante la deshidratación en etapas posteriores. Estos autores relacionaron estos hallazgos con la retracción que se produce cuando las proteínas se deshidratan como consecuencia de la pérdida de agua durante el período de secado/maduración. Además, estos resultados concuerdan con el aumento de la fuerza de unión con el tiempo de procesamiento observado en el ensayo de tracción.

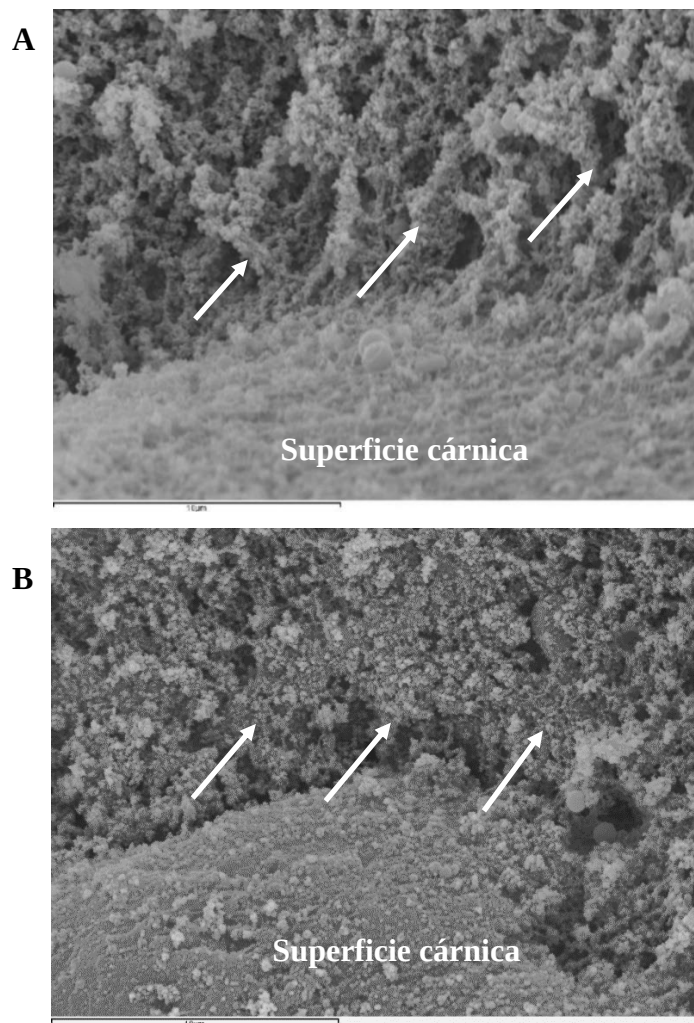


Figura 27. Microestructura de la zona de pegado de una pieza cárnica reestructurada al final del período de secado/maduración obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (x 5000): (A) no tratada y (B) tratada. Las flechas señalan las estructuras fibrosas (A) o agregados proteicos (B) distribuidos en la zona de pegado.

La imagen de la zona de pegado al final de procesamiento de los MJR irradiados (Figura 27B) cambia drásticamente, observándose la zona de pegado como una masa no estructurada, más compacta y densa y en la que casi no se identificaron estructuras fibrosas. Esta imagen podría ser la representación de los intensos cambios conformacionales que se producen en las proteínas del plasma en polvo e incluso en las proteínas de la carne como resultado del tratamiento de irradiación.

En este sentido, Lee y col. (2003) y Chmielewski y col. (2005) describieron que la irradiación produce radicales libres en la matriz del alimento que promueven la formación de nuevos y numerosos enlaces cruzados entre las proteínas, lo que resulta en una intensa modificación de su estructura. Asimismo, Yoon (2003) observó cambios en la microestructura de las proteínas cárnicas (pechuga de pollo) irradiadas con rayos gamma (2,9 kGy) e informó de una contracción miofibrilar (disminución de la anchura del sarcoma) asociada a una textura significativamente más firme. Zhao y col. (2017) también detectaron una estructura más compacta en las proteínas de la harina de nuez cuando tras la aplicación de electrones acelerados a una dosis de 2,5 kGy. Además, otros autores observaron cambios en una amplia variedad de proteínas de diferentes fuentes (suero de leche, soja, pescado, gambas, gluten y colágeno, entre otras) tras la aplicación de dosis superiores a 10 kGy (Lacroix y col., 2002; Ouattara y col., 2002; Jo y col., 2005; Lee y col., 2005; Inamura et al, 2013; Sabato et al, 2007; Mahto y col., 2015; Benbettaieb y col., 2016).

Este efecto está directamente relacionado con el contenido de agua del alimento. Tahergorabi y col. (2014) describieron que en las matrices de alimentos con bajo contenido de agua, las proteínas se ven mínimamente afectadas por la radiación debido a la escasa producción de radicales. Asimismo, Lee y col. (2003) estudiaron el efecto de la radiación gamma a dosis de entre 1 y 10 kGy en las proteínas plasmáticas, observando dos tipos de comportamiento. En el plasma en polvo, la irradiación no influyó en las propiedades funcionales de las proteínas (solubilidad, viscosidad) y no hubo modificaciones significativas en cuanto al perfil de peso molecular. Sin embargo, cuando estas proteínas se encontraban en solución (hidratadas), se detectaron cambios significativos, incluso a dosis tan bajas como 1 kGy. A esta dosis, los radicales generados por la radiolisis del agua ocasionaron la fragmentación de las proteínas en las cadenas de polipéptidos de bajo peso molecular. Sin embargo, al aumentar gradualmente la dosis de irradiación (2-10 kGy), se establecieron diversos tipos de interacciones entre las proteínas, dando lugar a agregados de alto peso molecular.

Es posible que en la zona de pegado de los modelos irradiados se produzca este último comportamiento, es decir, puede ser que los electrones acelerados hayan favorecido la formación de numerosos agregados que se observan uniformemente distribuidos en la zona de pegado, lo que explicaría en gran medida los cambios en la microestructura (Figura 27). Sin embargo, estas modificaciones no fueron lo suficientemente severas como para establecer diferencias significativas entre la fuerza de pegado del PP de los MJR irradiados y los no irradiados.

4.6.4.- Efecto listericida del tratamiento con electrones acelerados en los modelos de jamones curados reestructurados

Para confirmar que el efecto listericida del tratamiento con electrones acelerados era efectivo también en los MJR, diferentes piezas cárnicas fueron contaminadas con una concentración de aproximadamente 10^5 células de *L. innocua* durante su reestructurado (fase de pegado) y se dividieron en dos grupos: a uno de ellos se aplicó el tratamiento de 2 kGy bilateral, mientras que el otro grupo permaneció sin irradiar (control) (véase apartado 3.2.11.2 de Material y Métodos).

En los MJR control, los niveles de *L. innocua* disminuyeron en 0,5 unidades logarítmicas durante los primeros 3 días de procesamiento, coincidiendo con el período de salazón. Posteriormente, aumentaron hasta alcanzar los niveles iniciales (10^5 UFC) al final de la fase de post-salado, manteniéndose en estos valores hasta el final del procesamiento. Este comportamiento parece estar relacionado con las condiciones físico-químicas de los MJR durante las primeras etapas, principalmente con el aumento de la concentración de sal. Morales-Partera y col. (2017) describieron este mismo comportamiento en el lomo de cerdo curado, donde la sal también ocasiona, en un principio, una ligera disminución en la carga de *Listeria* (0,8 log) hasta que se adaptan al nuevo entorno y se recuperan los niveles iniciales, permaneciendo constante durante el resto del procesamiento.

Está ampliamente demostrado que el bajo valor de a_w ($\leq 0,92$) que tiene el jamón curado dificulta enormemente, por no decir imposibilita, el crecimiento de *L. monocytogenes* (Comisión Europea, 2007; ICMSF, 2002). Asimismo, se ha descrito la eficacia de una baja a_w en la disminución de microorganismos patógenos, como *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *E. coli* O157:H7, hasta niveles indetectables durante el procesamiento del jamón curado (Reynolds y col., 2001; Montiel et al, 2020; Serra-Castelló y col., 2020). Otros factores, como el contenido de nitritos, mejoran la estabilidad de los productos al actuar de forma sinérgica (Asensio y Díaz, 2001; Portocarrero y col., 2002; Stollewerk y col., 2014).

Sadeghi-Mehr y col. (2016) informaron de que la combinación de factores intrínsecos (pH y a_w) y extrínsecos (condiciones de fermentación y secado) durante la elaboración de jamones curados reestructurados podría reducir la carga de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. hasta 1,25 y 2,28 log UFC/g, respectivamente.

Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, de estar presente *Listeria* en la zona de pegado de un jamón curado reestructurado, y aunque este microorganismo no se multiplique debido a las condiciones imperantes, mantendría su carga inicial, siendo necesario, por lo tanto, aplicar un tratamiento adicional de higienización. Esto concuerda con los resultados obtenidos por otros autores en diferentes productos cárnicos curados. Prencipe y col. (2012) y Giovannini y col. (2007) reportaron que *L. monocytogenes* no se elimina completamente durante la elaboración del jamón de Parma y San Daniele enteros deshuesado. Mena y col. (2004) y Gómez y col. (2015) obtuvieron los mismos resultados en jamones curados loncheados portugueses y españoles, respectivamente. Como se ha mencionado antes, Morales-Partera y col. (2017) también observaron la resistencia de este patógeno a las condiciones del lomo de cerdo curado.

Cuando los MJR fueron tratados con electrones acelerados de forma bilateral con 2 kGy, el nivel de *Listeria* disminuyó hasta niveles indetectables, en al menos 5 unidades logarítmicas, lo que confirma la eficacia listericida del tratamiento en los jamones reestructurados. Asimismo, queda demostrado que la zona de pegado no solo resiste el tratamiento con electrones acelerados, sino que no supone ninguna barrera para su paso y, por lo tanto, para la higienización del producto. La estabilidad de esta metodología de reestructuración después de la radiación hace posible su uso industrial/comercial, ya que estos productos podrían manejarse fácilmente durante las operaciones de reducción de tamaño, como el loncheado o la obtención de bloques, sin temor a que pierdan su forma y firmeza.

4.7.- Efecto de los electrones acelerados sobre la expresión de los genes de virulencia (*plcA*, *hly* e *iap*) y de respuesta al estrés (*sigB*) de *Listeria monocytogenes* en jamón curado

Hasta ahora se ha demostrado la eficacia del tratamiento bilateral con electrones acelerados a dosis de 2 kGy en jamón curado deshuesado tanto convencional como reestructurado. Sin embargo, es necesario conocer el efecto de dicho tratamiento en los microorganismos supervivientes. *L. monocytogenes* tolera una amplia variedad de

condiciones estresantes, es lo que le brinda la versatilidad necesaria para poder desarrollarse como un microorganismo saprofita del suelo, contaminante de los alimentos y patógeno del hombre (Gandhi y Chikindas 2007; Schmid y col. 2009; Takahashi y col. 2011). Para poder hacer frente a una serie de condicionantes tan diversos, *L. monocytogenes* posee una compleja regulación de la expresión de genes de virulencia y respuesta al estrés que le confieren esta capacidad única de resistencia (Gandhi y Chikindas, 2007; Miner y col., 2007; Bucur y col., 2018).

Esta respuesta genética le permite superar algunos tratamientos y condiciones adversas (frio, acidez, concentración de sal, etc.) que se pueden presentar en los alimentos, las duras condiciones del tracto gastrointestinal y cada paso del sofisticado ciclo celular infeccioso el cual se conoce con detalle merced a las investigaciones realizadas por numerosos autores (Vázquez-Boland y col., 2001; Gandhi y Chikindas, 2007; de las Heras y col., 2011; Camejo y col. 2011; Pizarro-Cerdá y col., 2012; Rolhion y Cossart, 2017; Radoshevich y Cossart, 2018; Gaballa y col., 2019).

Asimismo, se ha descrito que los mecanismos genéticos mediante los que *Listeria* logra resistir este estrés subletal, los denominados genes de respuesta al estrés, pueden favorecer también la expresión de genes de virulencia (Kazmierczak y col., 2003, 2006; Chaturongakul y col., 2008, 2011; Ollinger y col., 2009; Liu y col., 2017). Esta misma respuesta podría ser desencadenada en las células supervivientes a un tratamiento subletal con electrones acelerados. De ser así, la supervivencia de una única célula, que en principio sería irrelevante, podría suponer un mayor riesgo sanitario de presentar una virulencia superior a la de una célula que no ha sido sometida a estrés.

En un intento de conocer los posibles cambios en la expresión de los genes de respuesta al estrés y de virulencia por efecto de la irradiación, se desarrollaron experimentos con la cepa más radioresistente de este patógeno (*L. monocytogenes* S4-2) de acuerdo a la metodología descrita en el apartado 3.2.12 de Material y Métodos. Para ello, se contaminaron muestras de jamón con un número elevado de listerias, del orden de 7,9 log UFC/g. Posteriormente, las muestras se irradiaron con diferentes dosis (0, 1, 2 y 3 kGy) y se almacenaron durante 30 días a 7 y 15°C. Se utilizaron estas temperaturas por ser consideradas como de abuso de temperatura durante el almacenamiento de alimentos a nivel de operadores de empresas alimentarias, minoristas y consumidores (CRL/AFSSA, 2008). A lo largo del almacenamiento se realizaron recuentos microbiológicos y se estudió la expresión absoluta de los genes de respuesta al estrés y de virulencia *sigB*, *plcA*, *iap* e *hly* en los microorganismos que sobrevivieron al tratamiento, evaluándose de esta forma el

efecto del tiempo y la temperatura. Además, a partir de los datos se estableció una relación entre el número de copias de genes obtenidos mediante expresión génica absoluta y el número de células de *Listeria* supervivientes (Log [copias del gen/(UFC/g)]).

Los recuentos microbiológicos obtenidos se muestran en las Tablas 16 y 17. Como era de esperar, tras el tratamiento con electrones acelerados (día 0), el número de *L. monocytogenes* disminuyó significativamente conforme aumentó la dosis aplicada, siguiendo una cinética de primer orden que se ajustó a la ecuación de una recta a partir de la cual se calculó un valor *D* de 0,57 kGy (inverso de la pendiente). Este valor es muy similar al determinado previamente en el apartado 4.2.1 de este capítulo (*D* = 0,55 kGy) y al descrito para el mismo microorganismo en otros productos cárnicos como pechuga de pavo, pastrami, mortadela, jamón de cerdo y de pavo (Sommers y Mackay, 2013).

Tabla 16. Recuento de supervivientes de *Listeria monocytogenes* S4-2 (Log UFC/g $\pm$ DE) en lonchas de jamón curado no irradiadas (0 kGy) e irradiadas con diferentes dosis (1, 2 y 3 kGy) inmediatamente después del tratamiento (día 0) y a diferentes tiempos (días 7, 15 y 30) durante el almacenamiento a 7°C.

Dosis	Día 0	Día 7	Día 15	Día 30
0 kGy	7,91 $\pm$ 0,06 ^{A,a}	7,76 $\pm$ 0,01 ^{A,b}	7,65 $\pm$ 0,20 ^{A,b,c}	7,21 $\pm$ 0,10 ^{A,d}
1 kGy	6,78 $\pm$ 0,16 ^{B,a}	6,82 $\pm$ 0,12 ^{B,a}	6,17 $\pm$ 0,21 ^{B,b}	5,88 $\pm$ 0,19 ^{B,c}
2 kGy	5,33 $\pm$ 0,08 ^{C,a}	4,91 $\pm$ 0,12 ^{C,b}	4,72 $\pm$ 0,38 ^{C,b}	4,30 $\pm$ 0,02 ^{C,c}
3 kGy	3,30 $\pm$ 0,06 ^{D,a}	2,79 $\pm$ 0,02 ^{D,b}	2,50 $\pm$ 0,09 ^{D,c}	1,86 $\pm$ 0,11 ^{D,d}

DE, desviación estándar.

A,B,C,D Valores en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

a,b,c,d Valores en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Tabla 17. Recuento de supervivientes de *Listeria monocytogenes* S4-2 (Log UFC/g $\pm$ DE) en lonchas de jamón curado no irradiadas (0 kGy) e irradiadas con diferentes dosis (1, 2 y 3 kGy) inmediatamente después del tratamiento (día 0) y a diferentes tiempos (días 7, 15 y 30) durante el almacenamiento a 15°C.

Dosis	Día 0	Día 7	Día 15	Día 30
0 kGy	7,91 $\pm$ 0,06 ^{A,a}	7,76 $\pm$ 0,03 ^{A,b}	7,64 $\pm$ 0,03 ^{A,c}	7,29 $\pm$ 0,03 ^{A,d}
1 kGy	6,78 $\pm$ 0,16 ^{B,a}	6,08 $\pm$ 0,30 ^{B,b}	5,88 $\pm$ 0,24 ^{B,b}	6,02 $\pm$ 0,28 ^{B,b}
2 kGy	5,33 $\pm$ 0,08 ^{C,a}	4,75 $\pm$ 0,08 ^{C,b}	4,32 $\pm$ 0,01 ^{C,c}	4,19 $\pm$ 0,39 ^{C,c}
3 kGy	3,30 $\pm$ 0,06 ^{D,a}	2,41 $\pm$ 0,16 ^{D,b}	2,28 $\pm$ 0,02 ^{D,c}	1,64 $\pm$ 0,09 ^{D,d}

DE, desviación estándar.

A,B,C,D Valores en la misma columna con letras diferentes son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

a,b,c,d Valores en la misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Durante el almacenamiento a 7°C, los recuentos de *L. monocytogenes* disminuyeron ligeramente con el tiempo de almacenamiento tanto en las muestras irradiadas como en las control, aunque no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) atribuibles al tratamiento con electrones acelerados. Es decir, aparentemente, la destrucción de los microorganismos se debió a las condiciones físico-químicas del jamón (principalmente al contenido de sal y a la baja a_w) y no al daño subletal ocasionado por la radiación. Este mismo patrón fue observado en las muestras almacenadas a 15°C. De forma similar, Montiel y col. (2020) describieron que las condiciones adversas del jamón curado redujeron la carga de *L. monocytogenes* en al menos 4,6 unidades logarítmicas en la superficie de este producto durante su procesamiento.

En la Figura 28 se observan las curvas estándar determinadas para cada uno de los genes estudiados. La Tabla 18 muestra los valores de la cuantificación absoluta de la expresión génica.

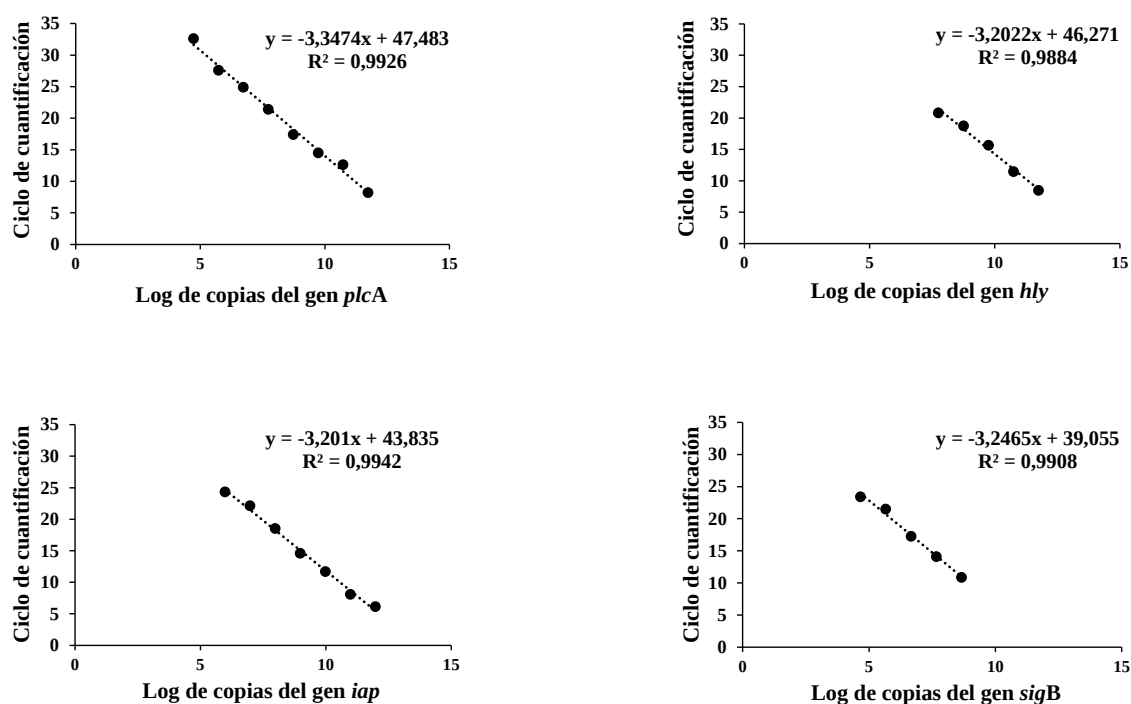


Figure 28. Curvas estándar que muestran la correlación entre el ciclo de cuantificación y el número de copias de los genes de virulencia (*plcA*, *hly* e *iap*) y de respuesta al estrés (*sigB*) de *Listeria monocytogenes*.

Tabla 18. Valores de la expresión génica absoluta (Log de copias de genes $\pm$ DE) de los genes de respuesta al estrés (*sigB*) y de virulencia (*plcA*, *hly* e *iap*) de *Listeria monocytogenes* S4-2 en lonchas de jamón curado no irradiadas (0 kGy) e irradiadas con diferentes dosis (1, 2 y 3 kGy) inmediatamente después del tratamiento (día 0) y a diferentes tiempos (días 7, 15 y 30) durante el almacenamiento a 7 y 15°C.

<i>sig B</i>							
Dosis	Día 0	7°C			15°C		
		Día 7	Día 15	Día 30	Día 7	Día 15	Día 30
0 kGy	2.82 $\pm$ 0.25 ^b	2.72 $\pm$ 0.15 ^b	3.27 $\pm$ 0.04 ^b	3.49 $\pm$ 0.56 ^a	2.99 $\pm$ 0.17 ^{a,b}	3.55 $\pm$ 0.76 ^a	2.28 $\pm$ 0.17 ^b
1 kGy	3.18 $\pm$ 0.19 ^{a,b}	2.58 $\pm$ 0.19 ^b	3.37 $\pm$ 0.24 ^a	2.80 $\pm$ 0.49 ^{a,b}	2.98 $\pm$ 0.12 ^{a,b}	3.09 $\pm$ 0.28 ^a	2.63 $\pm$ 0.29 ^{a,b}
2 kGy	3.19 $\pm$ 0.12 ^b	2.95 $\pm$ 0.35 ^b	3.87 $\pm$ 0.59 ^a	2.90 $\pm$ 0.09 ^b	2.97 $\pm$ 0.06 ^b	3.00 $\pm$ 0.28 ^b	2.04 $\pm$ 0.19 ^c
3 kGy	2.96 $\pm$ 0.41 ^b	2.88 $\pm$ 0.19 ^b	3.94 $\pm$ 0.46 ^a	3.00 $\pm$ 0.17 ^b	2.96 $\pm$ 0.05 ^b	3.09 $\pm$ 0.19 ^b	2.93 $\pm$ 0.49 ^b

<i>plc A</i>							
Dosis	Día 0	7°C			15°C		
		Día 7	Día 15	Día 30	Día 7	Día 15	Día 30
0 kGy	5.95 $\pm$ 0.53 ^a	5.51 $\pm$ 0.14 ^a	6.14 $\pm$ 0.12 ^a	6.44 $\pm$ 0.45 ^a	5.78 $\pm$ 0.29 ^a	6.10 $\pm$ 0.95 ^a	5.43 $\pm$ 0.35 ^a
1 kGy	6.28 $\pm$ 0.14 ^a	5.62 $\pm$ 0.14 ^a	6.47 $\pm$ 0.12 ^a	5.62 $\pm$ 0.48 ^a	5.47 $\pm$ 0.13 ^b	5.98 $\pm$ 0.21 ^a	5.66 $\pm$ 0.26 ^a
2 kGy	6.17 $\pm$ 0.22 ^b	5.85 $\pm$ 0.34 ^b	6.82 $\pm$ 0.43 ^a	5.63 $\pm$ 0.49 ^{b,c}	5.34 $\pm$ 0.21 ^c	5.81 $\pm$ 0.39 ^{b,c}	5.12 $\pm$ 0.32 ^c
3 kGy	5.44 $\pm$ 1.11 ^b	5.72 $\pm$ 0.19 ^b	6.88 $\pm$ 0.56 ^a	5.41 $\pm$ 0.02 ^b	5.31 $\pm$ 0.20 ^b	6.05 $\pm$ 0.19 ^{a,b}	5.89 $\pm$ 0.48 ^b

<i>hly</i>							
Dosis	Día 0	7°C			15°C		
		Día 7	Día 15	Día 30	Día 7	Día 15	Día 30
0 kGy	5.75 $\pm$ 0.29 ^a	5.40 $\pm$ 0.27 ^a	5.56 $\pm$ 0.18 ^a	5.66 $\pm$ 0.25 ^a	5.26 $\pm$ 0.29 ^a	5.59 $\pm$ 0.73 ^a	5.17 $\pm$ 0.38 ^a
1 kGy	5.76 $\pm$ 0.15 ^a	5.54 $\pm$ 0.22 ^a	5.57 $\pm$ 0.11 ^a	4.89 $\pm$ 0.57 ^a	5.16 $\pm$ 0.22 ^a	5.30 $\pm$ 0.07 ^a	5.21 $\pm$ 0.19 ^a
2 kGy	5.67 $\pm$ 0.04 ^a	5.87 $\pm$ 0.62 ^a	5.85 $\pm$ 0.34 ^a	5.15 $\pm$ 0.37 ^a	5.18 $\pm$ 0.20 ^a	5.17 $\pm$ 0.47 ^a	4.95 $\pm$ 0.38 ^a
3 kGy	4.75 $\pm$ 0.95 ^b	5.64 $\pm$ 0.31 ^{a,b}	5.88 $\pm$ 0.38 ^a	4.92 $\pm$ 0.06 ^b	5.06 $\pm$ 0.13 ^b	5.25 $\pm$ 0.22 ^b	5.48 $\pm$ 0.53 ^{a,b}

<i>iap</i>							
Dosis	Día 0	7°C			15°C		
		Día 7	Día 15	Día 30	Día 7	Día 15	Día 30
0 kGy	4.92 $\pm$ 0.21 ^a	4.34 $\pm$ 0.19 ^a	5.51 $\pm$ 0.15 ^a	5.68 $\pm$ 0.45 ^a	4.94 $\pm$ 0.29 ^a	5.16 $\pm$ 0.93 ^a	4.39 $\pm$ 0.40 ^a
1 kGy	5.27 $\pm$ 0.13 ^b	4.42 $\pm$ 0.29 ^b	5.63 $\pm$ 0.19 ^a	4.85 $\pm$ 0.58 ^{a,b}	4.77 $\pm$ 0.19 ^b	4.92 $\pm$ 0.06 ^b	4.66 $\pm$ 0.35 ^b
2 kGy	5.23 $\pm$ 0.07 ^b	4.92 $\pm$ 0.82 ^{b,c}	5.91 $\pm$ 0.46 ^a	4.88 $\pm$ 0.45 ^{b,c}	4.71 $\pm$ 0.10 ^c	4.81 $\pm$ 0.56 ^{b,c}	4.19 $\pm$ 0.42 ^c
3 kGy	4.33 $\pm$ 0.99 ^b	4.57 $\pm$ 0.31 ^b	6.01 $\pm$ 0.39 ^a	4.82 $\pm$ 0.08 ^b	4.67 $\pm$ 0.05 ^b	4.96 $\pm$ 0.23 ^b	4.98 $\pm$ 0.76 ^b

DE, desviación estándar.

^{a,b,c,d} Valores en el misma fila con letras diferentes son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

En términos generales, la expresión absoluta de los genes estudiados no se vio afectada por la dosis de irradiación ni por las condiciones de almacenamiento (tiempo y temperatura). Sin embargo, se observó que en las muestras irradiadas a las dosis más altas (2 y 3 kGy), la expresión génica absoluta a 7°C aumentó de forma significativa ($p \leq 0.05$) a los 15 días de almacenamiento, disminuyendo posteriormente, en el día 30. Es posible que este

comportamiento sea una respuesta adaptativa de *L. monocytogenes* a las condiciones adversas de baja temperatura y al daño subletal ocasionado por los electrones acelerados. Así, las células de *Listeria* que resistan estas dosis responderían durante los primeros 15 días aumentando la expresión de los genes evaluados y, posteriormente, cuando la bacteria se ha adaptado a estas nuevas condiciones, la expresión génica disminuiría.

Sin embargo, cuando se analizan todos los datos en conjunto, se puede observar que aunque la expresión génica absoluta es similar, el número de células que la produce es marcadamente diferente, debido a la muerte celular ocasionada por la irradiación. De hecho, el número de *L. monocytogenes* disminuye al aumentar la dosis aplicada y se observa una diferencia de hasta 5 unidades logarítmicas entre los recuentos obtenidos a 0 y 3 kGy. En un intento de incorporar este posible efecto a este estudio, se estableció la relación entre el número de copias de los genes *sigB*, *plcA*, *hly* e *iap* y el número de supervivientes de *L. monocytogenes* (Log [copias del gen/(UFC/g)]), la cual se muestra en la Figura 29. Se observa que dicha relación aumenta significativamente ($p \leq 0.05$) con la disminución del número de células.

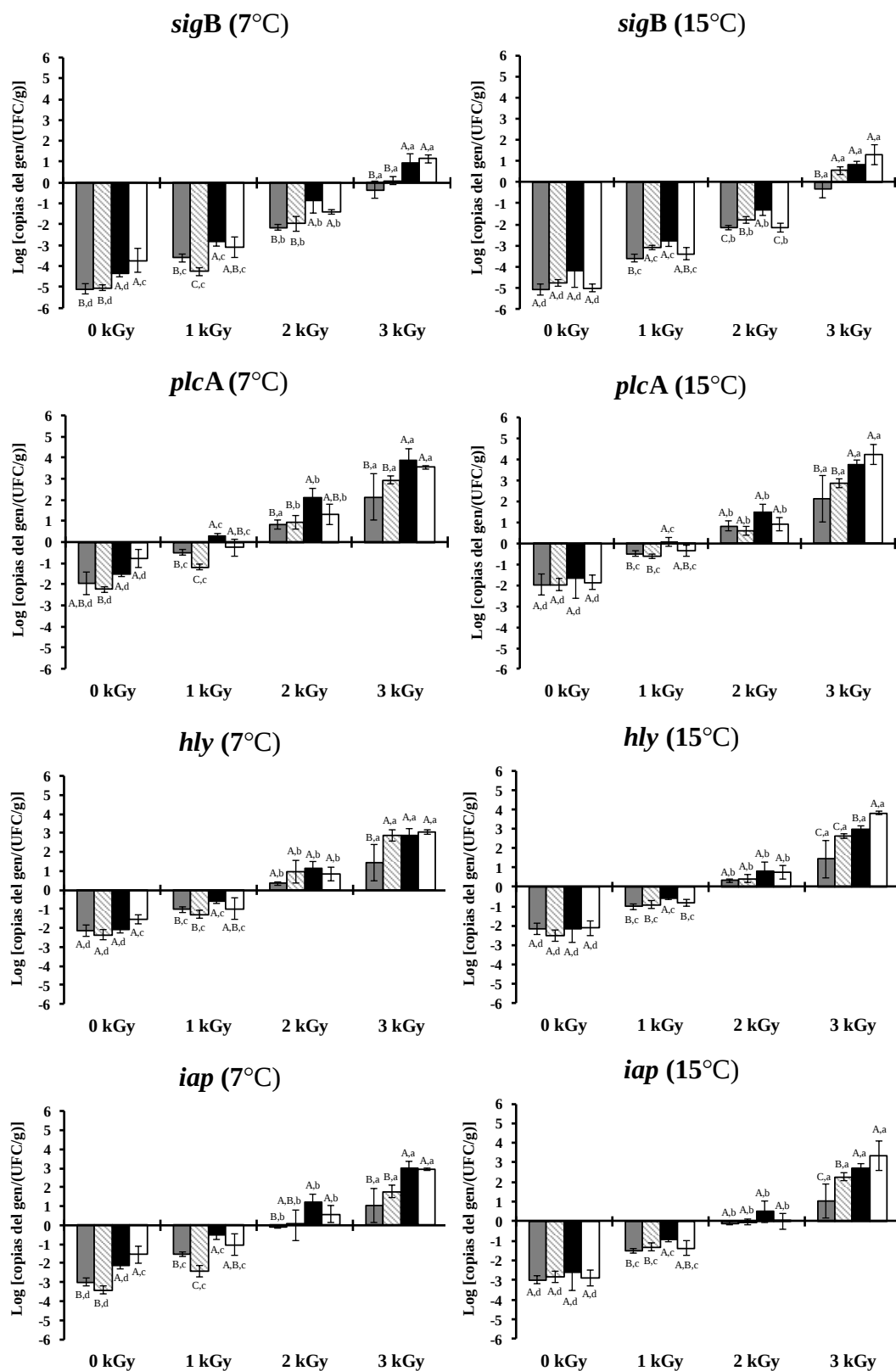


Figura 29. Relación entre el número de copias de los genes *sigB*, *plcA*, *hly* e *iap* y el número de supervivientes de *L. monocytogenes* (Log [copias del gen/(UFC/g)]) en lonchas de jamón curado no irradiadas (0 kGy) e irradiadas con diferentes dosis (1, 2 y 3 kGy) después del tratamiento (día 0: gris) y a diferentes tiempos (días 7: rayado; 15: negro y 30: blanco) durante el almacenamiento a 7 y 15°C.

A,B,C,D Valores de en la misma dosis con letras diferentes son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

a,b,c,d Valores en el mismo día con letras diferentes son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

Está ampliamente documentado que los electrones acelerados inhiben el crecimiento microbiano mediante dos mecanismos que se producen de forma simultánea, ocasionando la muerte celular cuando la magnitud del daño supera su capacidad de reparación (Huang y col., 2019). El primer mecanismo es la interacción directa de los electrones acelerados con algunas macromoléculas vitales como el ADN y el ARN, y el segundo es la acción indirecta de las especies reactivas de oxígeno generadas por la radiolisis del agua, que contribuye al daño oxidativo de los ácidos nucleicos, las proteínas y enzimas. De hecho, la supervivencia a la radiación de las bacterias está determinada por el mecanismo de reparación del ADN y su capacidad de eliminación de las especies reactivas de oxígeno (Slade y Radman, 2011). Por lo tanto, las células de *L. monocytogenes* que sobreviven al tratamiento con electrones acelerados han sido sometidas a un elevado estrés oxidativo.

La resistencia de este microorganismo al daño oxidativo no es totalmente desconocida. De hecho, se ha descrito que *L. monocytogenes* frecuentemente desarrolla mecanismos moleculares para superar la exposición a compuestos oxidantes en el interior de los macrófagos (Imlay, 2002, Lungu y col., 2009).

Esta situación, así como la mayoría de situaciones altamente estresantes, desencadena el mecanismo general de respuesta al estrés de *L. monocytogenes* controlado por el *sigB*, con el cual se puede expresar un gran número de genes de forma simultánea (Bucur y col., 2018; Gaballa y col., 2019). En este trabajo también se ha observado una expresión del gen *sigB* tanto mayor cuanto mayor fue la dosis aplicada. Este gen codifica el factor sigma alternativo σ^B , que regula directamente la expresión de más de 200 genes implicados en la respuesta a condiciones ambientales adversas (Guariglia-Oropeza y col., 2018; Dorey y col., 2019). Concretamente, se ha descrito que el factor σ^B está implicado en la resistencia de *L. monocytogenes* a las altas concentraciones de sal, al estrés ácido, al frío, a las altas presiones hidrostáticas, a antimicrobianos como la penicilina, amoxicilina y nisina, al arseniato, a la bilis y a la oxidación (O'Byrne y Karatzas, 2008; Raengpradub y col., 2008; Oliver y col., 2010; Mujahid y col., 2013; NicAogáin y O'Byrne, 2016; Guariglia-Oropeza y col., 2018; Dorey y col., 2019).

En nuestro caso, la principal causa de una sobreexpresión de *sigB* sería el estrés oxidativo causado por los electrones acelerados. De hecho, varios estudios han demostrado el papel del factor σ^B en la resistencia a la oxidación de *L. monocytogenes*, ya sea porque existen genes dependientes de dicho factor implicados en la resistencia a este tipo de estrés (Hecker y col., 2007; Kazmierczak y col., 2003; Raengpradub y col., 2008) o porque los microorganismos modificados genéticamente para carecer del gen *sigB* muestran una

supervivencia significativamente inferior (Ferreira y col., 2001; Oliver y col., 2010). Además, σ^B también contribuye a la transcripción del gen *prfA*, cuyo producto, la proteína PrfA, regula positivamente los genes de virulencia como *plcA* y *hly*, cuyos productos son vitales para el éxito de la invasión celular de *L. monocytogenes* al permitirle escapar del fagosoma, interconectando así la respuesta al estrés y la expresión de los genes de virulencia (Chaturongakul y col., 2008; Kazmierczak y col., 2003, 2006; Ollinger y col., 2009).

Otra respuesta molecular de *L. monocytogenes* que proporciona adaptación al estrés oxidativo es la síntesis de proteínas de choque térmico (Csp) (Loepfe y col., 2010). *L. monocytogenes* posee tres Csp (CspA, CspB y CspD, codificadas en los genes *cspA*, *cspB* y *cspD*, respectivamente) que son esenciales para la adaptación a diversas condiciones de estrés, expresándose, por ejemplo, en condiciones de baja temperatura y estrés osmótico (Gandhi y Chikindas 2007; Schmid y col., 2009; Eshwar y col., 2017). Las Csp también contribuyen a la regulación de la expresión de los genes de virulencia, como los *hly*, *plcB* y *plcA*, a través del control del gen *prfA*, y los asociados con la agregación celular, producción de flagelos y, por ende, motilidad, es decir *actA* y *flaA* (Eshwar y col., 2017). Por lo tanto, la irradiación podría desencadenar la expresión de los genes *plcA* y *hly* a través del aumento de la expresión de *sigB* y, posiblemente, de la respuesta de las Csp. Estos mecanismos podrían explicar el efecto de inducción dependiente de la dosis que los electrones acelerados han mostrado en este estudio sobre la expresión de los genes *plcA* y *hly*.

Aunque nuestros resultados, en términos generales, indican que no hay una diferencia significativa en la expresión absoluta de los genes *sigB*, *plcA* y *hly* debido al tratamiento con electrones acelerados, cuando se relaciona con el número de microorganismos sí se observa una cierta influencia. En los casos de estrés producido por otros agentes, la expresión génica muestra una mayor variabilidad. Alía y col. (2019) observaron que la presencia de NaCl en los niveles habituales en jamón curado y actividades de agua de entre 0,92 y 0,94, disminuyeron la expresión de los genes de virulencia *plcA*, *hly* e *iap* y, sin embargo, potenciaron la expresión del *sigB*. Mataragas y col. (2015) realizaron un estudio con salchichas fermentadas y describieron que la adaptación al estrés ácido y osmótico aumentó la expresión del *sigB*, aunque no tuvo relación con un aumento de la expresión del *prfA*. En otras tecnologías no térmicas, como las altas presiones hidrostáticas, se ha descrito que el estrés resultante provoca una fuerte supresión de genes como el *sigB* y el *prfA* (Bowman y col., 2008).

El gen *iap* es el que codifica la proteína P60, una mureína hidrolasa responsable de la remodelación del peptidoglicano de la pared celular durante la división bacteriana. Es una

proteína de superficie que, además, permite a *Listeria* adherirse a cualquier tipo de célula, por lo que es esencial en su capacidad de invasión (Pucciarelli y col., 2007). La proteína P60 también participa en el movimiento intracelular de *Listeria* y en la propagación de célula a célula, ya que es necesaria para el ensamblaje de la actina (Pilgrim y col., 2003). La regulación del gen *iap* es independiente de la expresión del gen *prfA* (Vázquez-Boland y col., 2001) y del gen *sigB* (Kim y col., 2005); el factor σ^B contribuye a la capacidad de invasión de *L. monocytogenes* principalmente mediante el control directo de la expresión de los genes *inlA* e *inlB*, más que mediante los efectos indirectos regulados por el PrfA (Kim y col., 2005). Se ha informado de que la transcripción del gen *iap* es inducida por la exposición de *L. monocytogenes* a situaciones de estrés ácido y osmótico (Olesen y col., 2009). Los resultados obtenidos en este trabajo no mostraron una influencia de los electrones acelerados en la expresión del gen *iap*, aunque la relación entre la expresión genética absoluta y el número de microorganismos (Figura 29) podría evidenciar algún efecto. Sin embargo, hasta la fecha, no se han descrito mecanismos que expliquen la respuesta del gen *iap* frente al estrés oxidativo.

El tiempo y la temperatura de almacenamiento no influyeron sobre la relación entre la expresión génica absoluta y el número de microorganismos (Figura 29), aunque se observó un aumento significativo ($p \leq 0.05$) conforme transcurrían los días de almacenamiento cuando se aplicó el tratamiento con electrones acelerados a dosis de 3 kGy.

Son pocos los estudios en los que se puede observar el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la expresión génica de *L. monocytogenes*. Por ejemplo, Makariti y col. (2015) evaluaron la respuesta de *L. monocytogenes* a diferentes combinaciones de pH y NaCl y notificaron un aumento de la regulación de *sigB* y *pfrA* tras 6 días de almacenamiento a 7°C. Estos autores relacionaron las variaciones en la expresión génica con la habituación del patógeno a las condiciones de los experimentos. Montiel y col. (2019) reportaron una tendencia a la disminución en la expresión de algunos genes de virulencia de *L. monocytogenes* (*prfA*, *gbuB*, *lmo1421*, *lmo2434* y *lmo0669*) en presencia de enterocina y *Enterococcus faecalis* en jamón curado almacenado durante 7 días a 7°C.

Estudios realizados sobre el efecto de la temperatura de almacenamiento en la expresión génica de *L. monocytogenes*, han mostrado resultados muy dispares, probablemente debido a las particularidades de cada experimento, como la cepa utilizada, serotipo, genes evaluados, tratamiento aplicado, matriz alimentaria, etc. Por ejemplo, Duodu y col. (2010) describieron que la exposición a condiciones de abuso de temperatura (20°C) podría influir en el potencial de virulencia de las cepas de *L. monocytogenes* en el salmón. Rantsiou y col.

(2012) observaron una variabilidad en la expresión de *sigB*, *hly*, *iap* y *plcA* relacionada con factores como el tipo cepa de *L. monocytogenes*, la matriz del alimento y la temperatura de almacenamiento (4 y 12°C). Alía y col. (2019), utilizando sistemas modelo de jamón curado contaminado con *Listeria*, informaron que los genes *hly* y *iap* estaban más sobreexpresados a 15°C que a 7°C, mientras que el gen *plcA* se comportaba de forma contraria.

Además, se ha descrito que las células de *L. monocytogenes* supervivientes a algún tipo de estrés subletal generalmente muestran una tolerancia cruzada con otras condiciones adversas como las consideradas comúnmente como obstáculos en la industria alimentaria. Así, Ivy y col. (2012) concluyeron que *L. monocytogenes* mejora su capacidad para superar un medio ácido como condición adversa si previamente está adaptada a temperaturas bajas. De la misma manera, la adaptación de *Listeria* al estrés ácido u osmótico puede mejorar su capacidad para tolerar el estrés térmico, osmótico y oxidativo (Bergholz y col., 2012; Phan-Thanh y col., 2000). Incluso Zhang y col. (2011) describen cómo un corto tiempo (30 min) de preexposición a estrés alcalino (pH 9,0) y osmótico (0,3 M NaCl) mejoró la resistencia de *L. monocytogenes* a concentraciones subletales de sales biliares. Las altas presiones hidrostáticas también pueden inducir una resistencia cruzada al calor, al ácido y al estrés oxidativo (Karatzas y Bennik, 2002). Sin embargo, las células supervivientes a los electrones acelerados parecen no haber adquirido una mayor protección contra las condiciones adversas del jamón curado (baja a_w y concentraciones de sal) ya que, como se ha descrito anteriormente, su tasa de mortalidad durante el almacenamiento fue similar a la de los microorganismos no irradiados.

Es la primera vez que se realiza un trabajo de esta naturaleza. Aunque el tratamiento propuesto en este trabajo es lo suficientemente eficaz como para eliminar la posible carga de *L. monocytogenes* presente en los alimentos hasta niveles seguros (< 4 UFC/100 g), los resultados obtenidos enfatizan la necesidad de optimizar el tratamiento con electrones acelerados y evitar la supervivencia de células que son potencialmente más virulentas. Además, desde un punto de vista práctico, estos resultados pueden ser especialmente interesantes, por ejemplo, cuando se pretenda reducir la dosis mínima requerida de irradiación al diseñar una combinación de estrategias para eliminar este patógeno.

5. CONCLUSIONES

1.- El criterio microbiológico de "tolerancia cero" para *Listeria monocytogenes* se logra mediante un tratamiento con electrones acelerados a dosis de 2 kGy aplicado de forma unilateral a las lonchas de jamón curado y de forma bilateral, con volteo, al jamón curado deshuesado. Este tratamiento no produce cambios significativos ($p > 0,05$) en las propiedades sensoriales y sólo se observan diferencias en el olor que desaparecieron durante el almacenamiento a 4°C.

2.- El espesor del jamón curado deshuesado es un factor determinante para su higienización con electrones acelerados. Un tratamiento bilateral con dosis de 1 kGy es suficiente para eliminar *Listeria* en jamones de hasta 7 cm de grosor. Para tamaños superiores, es necesario aplicar un tratamiento bilateral con dosis de 2 kGy.

3.- La capacidad de penetración de los electrones acelerados es mayor en la parte grasa del jamón que en la parte magra; sin embargo, si se aplica un tratamiento bilateral con 2 kGy, esta diferencia no es determinante para la higienización del producto.

4.- Se proponen 18 compuestos volátiles como posibles marcadores radiolíticos; 10 de ellos se generan incluso a bajas dosis, manteniéndose durante el almacenamiento (nonano, 2,2,4,6,6-pentametil heptano, 3-metil pentano, 2-hexanona, 5-etilhidro-2(3H)-furanona, pentadecano, tridecano, undecano, 1-hepteno, 1-deceno) y 8 se detectan únicamente en los jamones sin irradiar (2,4-dimetilheptano, 2,3,4-trimetilpentano, 2-metil-1-penteno, 2,4-dimetil-1-hepteno, 2-metil-2-propanol, 2-pentanol, metil-isobutil-cetona y 2-etoxi-2-metil-propano).

5.- La aplicación de una dosis de 2 kGy, de forma bilateral, permite higienizar jamón curado reestructurado sin que se produzcan modificaciones significativas ($p > 0,05$) en la fuerza de pegado del plasma en polvo utilizado como agente de ligazón en frío, a pesar de los cambios microestructurales observados en la zona de pegado.

6.- La exposición de *L. monocytogenes* a un tratamiento subletal con electrones acelerados podría ocasionar la sobreexpresión de los genes de respuesta al estrés (*sigB*) y de virulencia (*plcA*, *hly* e *iap*) sin que se vea afectada por la temperatura y el tiempo de almacenamiento. En consecuencia, las células de *Listeria* que sobrevivan a este tratamiento podrían presentar una mayor virulencia constituyendo un riesgo para la salud pública.

6. BIBLIOGRAFÍA

AHN, D. U. & LEE, E. J. 2006. Mechanisms and Prevention of Quality Changes in Meat by Irradiation. En: SOMMERS, C. H. & FAN, X. (eds.) *Food Irradiation Research and Technology*. Iowa (USA): IFT Press, Blackwell Publishing. pp.127-142.

AHN, D. U., JO, C. & OLSON, D. G. 2000. Analysis of volatile components and the sensory characteristics of irradiated raw pork. *Meat Science*, 54, 209-15.

AHN, D. U., LEE, E. J. & MENDONÇA, A. 2018. Meat decontamination by irradiation. En: TOLDRÁ, F. & NOLLET, L. M. (eds.) *Advanced Technologies for Meat Processing*, segunda edición. Boca Raton (USA): CRC Press, pp.197-226.

AHN, D. U., LEE, E. J., FENG, X., ZHANG, W., LEE, J. H., JO, C. & NAM, K. 2016a. Mechanisms of volatile production from non-sulfur amino acids by irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 119, 64-73.

AHN, D. U., LEE, E. J., FENG, X., ZHANG, W., LEE, J. H., JO, C. & NAM, K. C. 2016b. Mechanisms of volatile production from sulfur-containing amino acids by irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 119, 80-84.

AHN, D. U., MENDONÇA, A. F. & FENG, X. 2017. Chapter 8 - The Storage and Preservation of Meat: II—Nonthermal Technologies. En: TOLDRA, F. (ed.) *Lawrie's Meat Science*, octava edición. Woodhead Publishing, pp.231-263.

ALÍA, A., ANDRADE, M. J., RODRÍGUEZ, A., MARTÍN, I., PÉREZ-BALTAR, A., MEDINA, M. & CÓRDOBA, J. J. 2020. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* in deboning and slicing areas of Spanish dry-cured ham processing. *LWT - Food Science and Technology*, 128, 109498.

ALÍA, A., RODRÍGUEZ, A., ANDRADE, M. J., GÓMEZ, F. M. & CÓRDOBA, J. J. 2019. Combined effect of temperature, water activity and salt content on the growth and gene expression of *Listeria monocytogenes* in a dry-cured ham model system. *Meat Science*, 155, 16-19.

ALÍA, A. 2019. Efectos de tratamientos no térmicos y de bioconservación en jamón curado loncheado sobre la expresión génica de *Listeria monocytogenes*. Tesis para optar el grado de doctor. Universidad de Extremadura. Cáceres.

AN, K. A., JO, Y., AKRAM, K., SUH, S. C. & KWON, J. H. 2018. Assessment of microbial contaminations in commercial frozen duck meats and the application of electron beam irradiation to improve their hygienic quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98, 5444-5449.

AN, K. A., JO, Y., ARSHAD, M. S., KIM, G. R., JO, C. & KWON, J. H. 2017. Assessment of Microbial and Radioactive Contaminations in Korean Cold Duck Meats and Electron-Beam Application for Quality Improvement. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37, 297-304.

ANDRONIKOV, D., GAV PERLIN, L., POLAK, T. & LENDER, B. 2013. Texture and quality parameters of Slovenian dry-cured ham Krbaki psaut according to mass and salt levels. *Food Technology and Biotechnology*, 51, 112-122.

ANZFSC - AUSTRALIA NEW ZEALAND FOOD STANDARDS CODE, 2016. Standard 1.5.3. Irradiation of Food. ID F2016C00171. 1 March 2016. Disponible en: <https://www.legislation.gov.au/Details/F2016C00171>.

ARMENTEROS, M., ARISTOY, M.-C. & TOLDRÁ, F. 2012a. Evolution of nitrate and nitrite during the processing of dry-cured ham with partial replacement of NaCl by other chloride salts. *Meat Science*, 91, 378-381.

ARMENTEROS, M., TOLDRÁ, F., ARISTOY, M. C., VENTANAS, J. & ESTÉVEZ, M. 2012b. Effect of the partial replacement of sodium chloride by other salts on the formation of volatile

compounds during ripening of dry-cured ham. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7607-7615.

ARNAU J, GUERRERO L, GOU P. 2003 Effect of meat pH and the amount of added nitrite and nitrate on color uniformity of dry-cured hams. *Fleischwirtsch Int*, 18:31–32

ARNAU, J. 2014. Ham production: Dry-cured ham. En: DIKEMAN, M. & DEVINE, C. (eds.) *Encyclopedia of Meat Sciences*, segunda edición. Oxford: Academic Press, pp.87-91.

ARSHAD, M. S., KWON, J.-H., AHMAD, R. S., AMEER, K., AHMAD, S. & JO, Y. 2020. Influence of E-beam irradiation on microbiological and physicochemical properties and fatty acid profile of frozen duck meat. *Food Science & Nutrition*, 8, 1020-1029.

ASENSIO, M. A., & DÍAZ, C. 2001. La estabilización del pernil desde la perspectiva microbiológica: un concepto ecológico dinámico. En: VENTANAS, J. (ed.) *Tecnología del jamón ibérico*. Madrid: Ediciones mundi prensa S.A, pp. 201-226

AUSTRALIAN GOVERNMENT. 217. AUSTRALIA NEW ZEALAND FOOD STANDARDS CODE – Standard 1.6.1 – Microbiological limits in food, schedule 27. Disponible en: <https://www.legislation.gov.au/Details/F2018C00939>

BACCARO, S., BAL, O., CEMMI, A. & DI SARCINA, I. 2018. The effect of gamma irradiation on rice protein aqueous solution. *Radiation Physics and Chemistry*, 146, 1-4.

BAE, D., LIU, C., ZHANG, T., JONES, M., PETERSON, S. N. & WANG, C. 2012. Global Gene Expression of *Listeria monocytogenes* to Salt Stress. *Journal of Food Protection*, 75, 906-912.

BARBA, C., SANTA-MARÍA, G., HERRAIZ, M. & CALVO, M. M. 2012. Rapid detection of radiation-induced hydrocarbons in cooked ham. *Meat Science*, 90, 697-700.

BARBEZAN, A. B., MARTINS, R., BUENO, J. B. & VILLAVICENCIO, A. L. C. H. 2017. Ames Test to Detect Mutagenicity of 2-Alkylcyclobutanones: A Review. *Journal of Food Science*, 82, 1518-1522.

BARREIRA, J., ANTONIO, A. & FERREIRA, I. 2018. Chemical methods. En: FERREIRA, I., ANTONIO, A. & CABO VERDE, S. (eds.) *Food irradiation technologies: concepts, applications and outcomes*. UK: The Royal Society of Chemistry. pp. 301-313.

BARRIENTOS, E. W., LUCAS, J. R., RAMOS, D., REBATT, M. & ARBAIZA, T. 2015. Presencia de *Listeria monocytogenes* en canales porcinas en Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26, 135-139.

BATT, C. A. 2014. *LISTERIA* | Introduction. En: BATT, C. A. & TORTORELLO, M. L. (eds.) *Encyclopedia of Food Microbiology*, segunda edición. Oxford: Academic Press, pp.466-469.

BAUGREET, S., KERRY, J. P., BOTINEȘTEAN, C., ALLEN, P. & HAMILL, R. M. 2016. Development of novel fortified beef patties with added functional protein ingredients for the elderly. *Meat Science*, 122, 40-47.

BELLO-GUTIÉRREZ, J. 2008. *Jamón curado: Aspectos científicos y tecnológicos*. España, Editorial Díaz de Santos, S.A.

BENBETTAÏEB, N., KARBOWIAK, T., BRACHAIS, C.-H. & DEBEAUFORT, F. 2016. Impact of electron beam irradiation on fish gelatin film properties. *Food Chemistry*, 195, 11-18.

BENEDITO, J., CAMBERO, M. I., ORTUÑO, C., CABEZA, M. C., ORDOÑEZ, J. A. & 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.

BERGHOLZ, T. M., BOWEN, B., WIEDMANN, M. & BOOR, K. J. 2012. *Listeria monocytogenes* shows temperature-dependent and -independent responses to salt stress, including

- responses that induce cross-protection against other stresses. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 2602.
- BHATTACHARJEE, P., SINGHAL, R. S., GHOLAP, A. S., VARIYAR, P. S. & BONGIRWAR, D. R. 2003. Hydrocarbons as marker compounds for irradiated cashew nuts. *Food Chemistry*, 80, 151-157.
- BIERNE, H., SABET, C., PERSONNIC, N. & COSSART, P. 2007. Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes and Infection*, 9, 1156-1166.
- BLESA, E., ALIÑO, M., BARAT, J. M., GRAU, R., TOLDRÁ, F. & PAGÁN, M. J. 2008. Microbiology and physico-chemical changes of dry-cured ham during the post-salting stage as affected by partial replacement of NaCl by other salts. *Meat Science*, 78, 135-142.
- BOLES, J. A. 2011. Use of cold-set binders in meat systems. En: KERRY, J. P. & KERRY, J. F. (eds.) *Processed Meats*. Woodhead Publishing, pp.270-298.
- BORTOLUSSI, R. 2008. Listeriosis: a primer. *Canadian Medical Association Journal*, 179, 795.
- BOSSE, R., MÜLLER, A., GIBIS, M., WEISS, A., SCHMIDT, H. & WEISS, J. 2018. Recent advances in cured raw ham manufacture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58, 610-630.
- BOVER-CID, S., BELLETTI, N., GARRIGA, M. & AYMERICH, T. 2011. Model for *Listeria monocytogenes* inactivation on dry-cured ham by high hydrostatic pressure processing. *Food Microbiology*, 28, 804-809.
- BOWMAN, J. P., BITTENCOURT, C. R. & ROSS, T. 2008. Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology*, 154, 462-475.
- BREIDBACH, A. & ULBERTH, F. 2016. Comparative evaluation of methods for the detection of 2-alkylcyclobutanones as indicators for irradiation treatment of cashew nuts and nutmeg. *Food Chemistry*, 201, 52-58.
- BREWER, M. S. 2009. Irradiation effects on meat flavor: A review. *Meat Science*, 81, 1-14.
- BROWN, D. (2015) Integrating electron beam equipment into food processing facilities: strategies and design consideration. En: PILLAI, S.D, SHAYANFAR, S. (eds), *Electron beam pasteurization and complimentary food processing technologies*. Oxford (UK): Woodhead Publishing. pp. 26-46
- BRYKSA, B. C., YADA, R. Y. 2018. Food Biochemistry. En: CAMPBELL-PLATT G. (ed.), *Food science and technology*, segunda edición. New Jersey (SA): John Wiley & Sons, pp 75-104.
- BUCHANAN, R. L., GORRIS, L. G. M., HAYMAN, M. M., JACKSON, T. C. & 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.
- BUCUR, F. I., GRIGORE-GURGU, L., CRAUWELS, P., RIEDEL, C. U. & NICOLAU, A. I. 2018. Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- BURALL, L. S., GRIM, C. J., MAMMEL, M. K. & DATTA, A. R. 2017. A comprehensive evaluation of the genetic relatedness of *Listeria monocytogenes* serotype 4b variant strains. *Frontiers in Public Health*, 5.

CABEZA, M. C., CAMBERO, 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.

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.

CABEZA, M. C., DE LA HOZ, L., VELASCO, R., CAMBERO, M. I. & ORDÓÑEZ, J. A. 2009. Safety and quality of ready-to-eat dry fermented sausages subjected to E-beam radiation. *Meat Science*, 83, 320-327. 84.

CABEZAS, L., GALÁN, E. & FERNANDEZ-SALGUERO, J. 2013. Relationships between physico-chemical and sensory characteristics of three types of dry-cured hams. *Fleischwirtschaft International*, 28, 134-136.

CAC - CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 2003. General Standard for Irradiated Foods (CODEX STAN 106-1983, Rev.1-2003). Codex Alimentarius, FAO/WHO, Rome.

CAC - CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. 2010. General Standard for the Labelling of Pre-packaged Foods (CODEX STAN 1-1985, Rev. 7-2010). Codex Alimentarius, FAO/WHO, Rome.

CAMBERO, M. I., CABEZA, M. C., ESCUDERO, R., MANZANO, S., GARCIA-MÁRQUEZ, I., VELASCO, R. & 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. & 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.

CAMEJO, A., CARVALHO, F., REIS, O., LEITÃO, E., SOUSA, S. & CABANES, D. 2011. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence*, 2, 379-394.

CAMPANIELLO, M., MARCHESANI, G., ZIANNI, R., TARALLO, M., MANGIACOTTI, M. & CHIARAVALLE, A. E. 2020. Validation of an alternative method for the identification of 2-dodecylcyclobutanone (2-DCB) of irradiated meats by solid-phase microextraction (SPME) gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). *International Journal of Food Science & Technology*, 55, 961-969.

CÁRCEL, J. A., BENEDITO, J., CAMBERO, M. I., CABEZA, M. C. & 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 Bioprocess Technology*, 96, 133-144.

CARPENTIER, B. & CERF, O. 2011. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 1-8.

CARREÑO, I. 2018. Chapter 2 International Standards and Regulation on Food Irradiation. En: FERREIRA, I., ANTONIO, A. & CABO VERDE, S., (eds), *Food Irradiation Technologies: Concepts, Applications and Outcomes*. UK: The Royal Society of Chemistry, pp.5-27.

CASTELL-PEREZ, M. E. & MOREIRA, R. G. 2020. Irradiation and consumers acceptance. En: KNOERZER, K. & MUTHUKUMARAPPAN, K. (eds.) *Innovative Food Processing Technologies*. Oxford: Elsevier, pp.122-135.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2016. Multistate outbreak of listeriosis linked to packaged salads produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html> [Visitado el 5 de julio de 2020].

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2017. Multistate outbreak of listeriosis linked to soft raw milk cheese made by Vulto Creamery. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheese-03-17/index.html> [Visitado el 5 de julio de 2020].

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2018. Brote de infecciones por *Listeria* vinculado a jamón elaborado por Johnston County Hams, Inc. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/countryham-10-18/index-esp.html> [Visitado el 5 de julio de 2020].

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2019. Brote de infecciones por *Listeria* vinculado a productos de carne de cerdo elaborados por 165368 C. Corporation. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/porkproducts-11-18/index-esp.html>. [Visitado el 5 de julio de 2020].

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2020a. Outbreak of *Listeria* infections linked to hard-boiled eggs. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/eggs-12-19/index.html> [Visitado el 5 de julio de 2020].

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2020b. Outbreak of *Listeria* infections linked to Enoki mushrooms. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/enoki-mushrooms-03-20/index.html> [Visitado el 5 de julio de 2020].

CEBRIÁN, E., RODRÍGUEZ, M., PEROMINGO, B., BERMÚDEZ, E. & NÚÑEZ, F. 2019. Efficacy of the combined protective cultures of penicillium chrysogenum and Debaryomyces hansenii for the control of ochratoxin a hazard in dry-cured ham. *Toxins*, 11, 710.

CFIA. 2019. Canadian Food Inspection Agency. Irradiated Food. Guidance Document. Disponible en: <https://www.inspection.gc.ca/food-label-requirements/labelling/industry/irradiated-foods/eng/1334594151161/1334596074872>.

CFR - Code Federal Regulation. 2012. Title 9 - Animals and Animal Products. Section 317.8 - False or misleading labeling or practices generally; specific prohibitions and requirements for labels and containers. B (36 and 39). Disponible en: <https://www.govinfo.gov/content/pkg/CFR-2012-title9-vol2/pdf/CFR-2012-title9-vol2-sec317-8.pdf> [Visitado el 26 de junio del 2020].

CHATURONGAKUL, S., RAENGPRADUB, S., PALMER, M. E., BERGHOLZ, T. M., ORSI, R. H., HU, Y., OLLINGER, J., WIEDMANN, M. & BOOR, K. J. 2011. Transcriptomic and phenotypic analyses identify coregulated, overlapping regulons among PrfA, CtsR, HrcA, and the alternative sigma factors σ^B , σ^C , σ^H , and σ^L in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 187-200.

CHATURONGAKUL, S., RAENGPRADUB, S., WIEDMANN, M. & BOOR, K. J. 2008. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology*, 16, 388-396.

CHEN, Y., ROSS, W. H., WHITING, R. C., VAN STELTEN, A., NIGHTINGALE, K. K., WIEDMANN, M. & SCOTT, V. N. 2011. Variation in *Listeria monocytogenes* dose responses in relation to subtypes encoding a full-length or truncated internalin A. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1171.

CHMIELEWSKI, A. G., HAJI-SAEID, M. & AHMED, S. 2005. Progress in radiation processing of polymers. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 236, 44-54.

- 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, S132-S143.
- CILLA, I., MARTÍNEZ, L., BELTRÁN, J. A. & RONCALÉS, P. 2006. Effect of low-temperature preservation on the quality of vacuum-packaged dry-cured ham: Refrigerated boneless ham and frozen ham cuts. *Meat Science*, 73, 12-21.
- CLELAND, M. R. 2013. Advances in electron beam and x-ray technologies for food irradiation. En: FAN, X. & SOMMERS, C. H. (eds.) *Food Irradiation Research and Technology*, segunda edición. UK: John Wiley Sons, pp. 9-27.
- CLELAND, M.R. 2006. Advances in gamma ray, electron beam, and x-ray technologies for food irradiation. En: SOMMERS, C. H. FAN, X. (eds.) *Food Irradiation: Research and Technology*. Oxford (UK): Blackwell Publishing Ltd., pp. 11-36.
- CLEMMONS, H. E., CLEMMONS, E. J. & BROWN, E. J. 2015. 2 - Electron beam processing technology for food processing. En: PILLAI, S. D. & SHAYANFAR, S. (eds.) *Electron Beam Pasteurization and Complementary Food Processing Technologies*. Oxford (UK): Woodhead Publishing, pp.11-25.
- COCCONCELLI, P. S. & FONTANA, C. 2015. Bacteria. En: TOLDRÁ, F., HUI, Y. H., ASTIASARÁN, I., SEBRANEK, J. G. & TALON, R. (eds.) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. John Wiley & Sons, Ltd, pp.117-128.
- COMISIÓN EUROPEA. 2005. Reglamento (CE) No 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L338:1-26.
- COMISIÓN EUROPEA. 2007. Reglamento (CE) No 1441/2007 del 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) No 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L322:12-29.
- COMISIÓN EUROPEA. 2008. Reglamento (CE) No 1333/2008 del parlamento europeo y del consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L354: 16–33.
- COMISIÓN EUROPEA. 2011. Reglamento (UE) No 1169/2011 del parlamento europeo y del consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los reglamentos (CE) No 1924/2006 y (CE) No 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) No 608/2004 de la Comisión. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L304:18-63.
- COMISIÓN EUROPEA. 2019. 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. COM (2019) 454 final. Bruselas, 8.10.2019. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/es/TXT/?uri=CELEX:52019DC0454>.
- CORDERO, M. R. & ZUMALACÁRREGUI, J. M. 2000. Characterization of *Micrococcaceae* isolated from salt used for Spanish dry-cured ham. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 303-306.
- COSTA, A. C., PINHEIRO, J., REIS, S. A., CABANES, D. & SOUSA, S. 2020. *Listeria monocytogenes* interferes with host cell mitosis through its virulence factors InlC and ActA. *Toxins*, 12, 411.
- CRAVEN, E., MITTENDORFER, J. & HOWARD, C. 2018. Software for food irradiation simulation and equipment validation. En: FERREIRA, I. & ANTONIO, A. & Cabo Verde, S. (eds.)

Food irradiation technologies: concepts, applications and outcomes., UK: The Royal Society of Chemistry. pp. 105-122.

CREWS, C., DRIFFIELD, M. & THOMAS, C. 2012. Analysis of 2-alkylcyclobutanones for detection of food irradiation: Current status, needs and prospects. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26, 1-11.

CRL/AFSSA, 2008. Technical guidance document on shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods.

CRUZ, J. 2017. ¿Caminamos hacia una burbuja en el sector jamonero?. *Eurocarne*, 256: 51-64.

CRUZ, J. 2019. Solamente las exportaciones logran dinamizar el sector cárnico ante la caída del consumo. *Eurocarne*, 278: 17-32.

CRUZ, J. 2020. La “nueva normalidad” llega para sustituir a nuestra añorada antigua realidad. *Eurocarne*, 286: 15-24.

D'ARMS, J. H. 2004. The Culinary Reality of Roman Upper-Class Convivia: Integrating Texts and Images. *Comparative Studies in Society and History*, 46, 428-450.

D'ARRIGO, M., MATEO-VIVARACHO, L., GUILLAMÓN, E., FERNÁNDEZ-LEÓN, M. F., BRAVO, D., PEIROTÉN, Á., MEDINA, M. & GARCÍA-LAFUENTE, A. 2020. Characterization of persistent *Listeria monocytogenes* strains from ten dry-cured ham processing facilities. *Food Microbiology*, 92, 103581.

DE LAS HERAS, A., CAIN, R. J., BIELECKA, M. K. & VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. 2011. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 118-127.

DEANGLIS, A. P., NUR, I., GORMAN, A. J. & MEIDLER, R. 2017. A method to measure thrombin activity in a mixture of fibrinogen and thrombin powders. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 28, 134-138.

DEMAÎTRE, N., VAN DAMME, I., DE ZUTTER, L., GEERAERD, A. H., RASSCHAERT, G. & DE REU, K. 2020. Occurrence, distribution and diversity of *Listeria monocytogenes* contamination on beef and pig carcasses after slaughter. *Meat Science*, 169, 108177.

DIEHL, J. F. 2002. Food irradiation—past, present and future. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 211-215.

DOMÍNGUEZ, R., PURRIÑOS, L., PÉREZ-SANTAESCOLÁSTICA, C., PATEIRO, M., BARBA, F. J., TOMASEVIC, I., CAMPAGNOL, P. C. B. & LORENZO, J. M. 2019. Characterization of Volatile Compounds of Dry-Cured meat products using HS-SPME-GC/MS Technique. *Food Analytical Methods*, 12, 1263-1284.

DOREY, A., MARINHO, C., PIVETEAU, P. & O'BYRNE, C. 2019. Role and regulation of the stress activated sigma factor sigma B (σ^B) in the saprophytic and host-associated life stages of *Listeria monocytogenes*. *Adv Appl Microbiol*, 106, 1-48.

DUARTE, L., MATTE, C. R., BIZARRO, C. V. & AYUB, M. A. Z. 2020. Transglutaminases: part I-origins, sources, and biotechnological characteristics. *World J Microbiol Biotechnol*, 36, 15.

DUODU, S., HOLST-JENSEN, A., SKJERDAL, T., CAPPELIER, J.-M., PILET, M.-F. & LONCAREVIC, S. 2010. Influence of storage temperature on gene expression and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains grown in a salmon matrix. *Food Microbiology*, 27, 795-801.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. 2011. Scientific Opinion on the efficacy and microbiological safety of irradiation of food. EFSA Journal 9: 2103.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. 2011. Scientific Opinion on the efficacy and microbiological safety of irradiation of food. EFSA Journal, 9, 2103.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. 2015. Scientific Opinion on thrombin from cattle (bovines) and pig's blood. EFSA Journal, 13, 4018.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. 2020. Scientific Opinion on the public health risk posed by *Listeria monocytogenes* in frozen fruit and vegetables including herbs, blanched during processing. EFSA Journal, 18: 6092, pp. 102.

EFSA/ECDC - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY AND EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. EFSA Journal, 17: 5926, pp. 276.

EHLERMANN, D. A. E. 2016. The early history of food irradiation. Radiation Physics and Chemistry, 129, 10-12.

EN 14569:2004 - EUROPEAN STANDARD. Foodstuffs – Microbiological Screening for Irradiated Food Using LAL/GNB Procedures – Screening Method. European Committee for Standardization (CEN), Brussels.

EN 1788: 2001 - EUROPEAN STANDARD. Foodstuffs – Thermoluminescence detection of irradiated food from which silicate minerals can be isolated. European Committee for Standardization (CEN), Brussels.

EN-13708:2001 - EUROPEAN STANDARD. Foodstuffs – Detection of Irradiated Food Containing Crystalline Sugar by ESR Spectroscopy. European Committee for Standardisation (CEN), Brussels.

EN-13751:2009 - EUROPEAN STANDARD. Foodstuffs – Detection of Irradiated Food Using Photostimulated Luminescence. European Committee for Standardization (CEN), Brussels.

EN-13783:2001 - EUROPEAN STANDARD. Foodstuffs – Detection of Irradiated Food Using Direct Epifluorescent Filter Technique/Aerobic Plate Count (DEFT/APC) – Screening Method. European Committee for Standardization (CEN), Brussels.

EN-13784:2001 - EUROPEAN STANDARD. Foodstuffs – DNA Comet Assay for the Detection of Irradiated Foodstuffs – Screening Method. European Committee for Standardization (CEN), Brussels.

EN-1784:1996 - EUROPEAN STANDARD. Foodstuffs – Detection of Irradiated. Food Containing Fat. Gas Chromatographic Analysis of Hydrocarbons. European Committee for Standardization (CEN), Brussels.

EN-1785:2003 - EUROPEAN STANDARD. Foodstuffs – Detection of Irradiated Food containing Fat – Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Analysis of 2-Alkylcyclobutanones. European Committee for Standardization (CEN), Brussels.

EN-1786:2000 - EUROPEAN STANDARD. Foodstuffs – Detection of Irradiated Food Containing Bone – Method by ESR Spectroscopy. European Committee for Standardisation (CEN), Brussels.

EN-1787:2001 - EUROPEAN STANDARD. Foodstuffs – Detection of Irradiated Food Containing Cellulose Method by ESR Spectroscopy. European Committee for Standardisation (CEN), Brussels.

ERKMEN, O. & BOZOGLU, T. F. 2016. *Food Microbiology: Principles into Practice*. New Jersey (USA): John Wiley & Sons.

ESHWAR, A. K., GULDIMANN, C., OEVERMANN, A. & TASARA, T. 2017. Cold-shock domain family proteins (Csps) are involved in regulation of virulence, cellular aggregation, and flagella-based motility in *Listeria monocytogenes*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 453.

ESTÉVEZ, M. 2017. Chapter 5 - What's New in Meat Oxidation? En: PURSLOW, P. P. (ed.) *New Aspects of Meat Quality*. Cambridge (USA): Woodhead Publishing, pp.91-109.

ESTÉVEZ, M., VENTANAS, S., MORCUENDE, D. & VENTANAS, J. 2015. Mediterranean Products. En: TOLDRÁ, F., HUI, Y. H., ASTIASARÁN, I., SEBRANEK, J. G. & TALON, R. (eds.) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. West Sussex (UK): John Wiley & Sons, Ltd, pp.361-369.

EVANS, E. W. & REDMOND, E. C. 2016. Older adult consumer knowledge, attitudes, and self-reported storage practices of ready-to-eat food products and risks associated with listeriosis. *Journal of Food Protection*, 79, 263-272.

FADDA, S. & VIGNOLO, G. 2015. Central and South American Products. En: TOLDRÁ, F., HUI, Y. H., ASTIASARÁN, I., SEBRANEK, J. G. & TALON, R. (eds.) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, segunda edición. UK: Willey Blackwell, pp.355-360.

FAN, X. 2013. Radiation Chemistry of Food Components. En: FAN, X. & SOMMERS, C.H. (eds.) *Food Irradiation Research and Technology*. West Sussex (UK), pp.75-98.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods. Technical report. Report no.: Microbiological Risk Assessment Series 5. Rome: FAO/WHO. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-y5394e.pdf> [Visitado el 05 de Julio de 2020].

FARBER, J.M, PAGOTTO, F.& SCHERF, C. 2007. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. En: RYSER, E.T & MARTH, E. H. (editors), *Listeria, listeriosis, and food safety*, tercera edición. Boca Raton (Estados Unidos): CRC press, pp. 503-570.

FARKAS, J. 2006. Irradiation for better foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 148-152.

FARKAS, J. & MOHÁCSI-FARKAS, C. 2011. History and future of food irradiation. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 121-126.

FARKAS, J. 2006. Irradiation for better foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 148-152.

FAROUK, M. M. 2010. Restructured Whole-Tissue Meats. En: TOLDRÁ, F. (ed.) *Handbook of Meat Processing*. Iowa: Wiley-Blackwell, pp.399-421.

FELICIANO, C. P. 2018. High-dose irradiated food: Current progress, applications, and prospects. *Radiation Physics and Chemistry*, 144, 34-36.

FELICIANO, C. P., DE GUZMAN, Z. M., TOLENTINO, L. M. M., COBAR, M. L. C. & ABRERA, G. B. 2014. Radiation-treated ready-to-eat (RTE) chicken breast Adobo for immunocompromised patients. *Food Chemistry*, 163, 142-146.

FENG, X. & AHN, D. U. 2016. Volatile profile, lipid oxidation and protein oxidation of irradiated ready-to-eat cured turkey meat products. *Radiation Physics and Chemistry*, 127, 27-33.

FERNANDES A, PEREIRA C, ANTONIO AL, FERREIRA ICFR. 2018. Food Irradiation Chemistry. En: FERNANDES, A., PEREIRA, C., ANTONIO, A.L.& FERREIRA, I.C.F.R (eds), *Food Irradiation Technologies: Concepts, Applications and Outcomes*. UK: The Royal Society of Chemistry, pp. 210-36.

- FERNÁNDEZ, M., HOSPITAL, X. F., CABELLOS, C. & HIERRO, E. 2020. Effect of pulsed light treatment on *Listeria* inactivation, sensory quality and oxidation in two varieties of Spanish dry-cured ham. *Food Chemistry*, 316, 126294.
- FERREIRA, A., O'BYRNE, C. P. & BOOR, K. J. 2001. Role of ζ B in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 4454-4457.
- FERREIRA, V., WIEDMANN, M., TEIXEIRA, P. & STASIEWICZ, M. J. 2014. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *J Food Prot*, 77, 150-70.
- FLEMMING, H.-C. & WINGENDER, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623-633.
- FLEMMING, H.-C., NEU, T. R. & WOZNIAK, D. J. 2007. The EPS Matrix: The “House of biofilm cells”. *Journal of Bacteriology*, 189, 7945-7947.
- FLORES, M. & TOLDRÁ, F. 2011. Microbial enzymatic activities for improved fermented meats. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 81-90.
- FLORES, M. 2017. Chapter 13 - The Eating Quality of Meat: III—Flavor. En: TOLDRÁ, F. (ed.) *Lawrie's Meat Science*, octava edición. Woodhead Publishing, pp.383-417.
- FOONG, S. C. C., GONZALEZ, G. L. & DICKSON, J. S. 2004. Reduction and Survival of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meats after Irradiation. *Journal of Food Protection*, 67, 77-82.
- FORSYTHE, S. J. 2020. *The Microbiology of Safe Food*, tercera edición. Nueva York: John Wiley & Sons.
- FOX, J. A., HAYES, D. J. & SHOGREN, J. F. 2002. Consumer preferences for food irradiation: how favorable and unfavorable descriptions affect preferences for irradiated pork in experimental auctions. *Journal of Risk and Uncertainty*, 24, 75-95.
- FREITAG, N. E., PORT, G. C. & MINER, M. D. 2009. *Listeria monocytogenes*— from saprophyte to intracellular pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 7, 623-628.
- FSIS - Food Safety and Inspection Service. 2014. FSIS Compliance guideline: Controlling *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products. Washington, DC: FSIS
- FSIS - Food Safety and Inspection Service. 2015. 9 CFR part 430: Control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat and poultry products. *Federal Register*, 80 (118), pp. 35178-35188
- FSSAI. 2011. Food safety and standards authority of india. food safety and standards (packaging and labelling) regulations, labelling of irradiated food. Disponible en: https://www.fssai.gov.in/upload/uploadfiles/files/Packaging_Labelling_Regulations.pdf
- GABALLA, A., GUARIGLIA-OROPEZA, V., WIEDMANN, M. & BOOR, K. J. 2019. Cross talk between SigB and PrfA in *Listeria monocytogenes* facilitates transitions between extra- and intracellular environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 83, e00034-19.
- GAHAN, C. G. M. & HILL, C. 2005. Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 1345-1353.
- GALÁN, I., GARCÍA, M. L. & SELGAS, M. D. 2010. Effects of irradiation on hamburgers enriched with folic acid. *Meat Science*, 84, 437-443.

GALÁN, I., GARCÍA, M. L. & SELGAS, M. D. 2011. Irradiation is useful for manufacturing ready-to-eat cooked meat products enriched with folic acid. *Meat Science*, 87, 330-335.

GALÁN, I., GARCÍA, M. L. & SELGAS, M. D. 2013. Effects of the storage time on the folic acid added to ready-to-eat meat products manufactured by irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*, 85, 193-196.

GÁMEZ, M., GARCÍA, M. L., SELGAS, M. D. & CALVO, M. M. 2011. Irradiation of ready-to-eat sausages containing lycopene. *Italian Journal Food Science and Technology*, 23, 260–269.

GANDEMER, G. 2002. Lipids in muscles and adipose tissues, changes during processing and sensory properties of meat products. *Meat Science*, 62, 309-321.

GANDHI, M. & CHIKINDAS, M. L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 1-15.

GARCÍA, M. L. & SELGAS, M. D. 2015. Yeasts. En: TOLDRÁ, F., HUI, Y. H., ASTIASARÁN, I., SEBRANEK, J. G. & TALON, R. (eds.) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. UK: Willey Blackwell, pp.139-146.

GARCÍA-MÁRQUEZ, I., CAMBERO, M. I., ORDÓÑEZ, J. A. & CABEZA, M. C. 2012a. Shelf-life extension and sanitation of fresh pork loin by E-beam treatment. *Journal of Food Protection*, 75, 2179-89.

GARCÍA-MÁRQUEZ, I., ORDÓÑEZ, J. A., CAMBERO, M. I. & CABEZA, M. C. 2012b. Use of E-beam for shelf-life extension and Sanitizing of Marinated Pork Loin. *International Journal of Microbiology*, 2012, 962846.

GARRIGA, M., GRÈBOL, N., AYMERICH, M. T., MONFORT, J. M. & HUGAS, M. 2004. Microbial inactivation after high-pressure processing at 600 MPa in commercial meat products over its shelf life. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5, 451-457.

GIANELLI, M. P., FLORES, M. & TOLDRÁ, F. 2002. Optimisation of solid phase microextraction (SPME) for the analysis of volatile compounds in dry-cured ham. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1703-1709.

GIBIS, M., WEISS, J. & FISCHER, A. 2014. Ethnic meat products | Germany. En: DIKEMAN, M. & DEVINE, C. (eds.) *Encyclopedia of Meat Sciences*, segunda edición. Oxford: Academic Press, pp.530-537.

GILLES, G. 2009. Dry cured ham quality as related to lipid quality of raw material and lipid changes during processing: a review. *Grasas y Aceites*, 60, 297-307.

GIOVANNINI, A., MIGLIORATI, G., PRENCIPE, V., CALDERONE, D., ZUCCOLO, C. & COZZOLINO, P. 2007. Risk assessment for listeriosis in consumers of Parma and San Daniele hams. *Food Control*, 18, 789-799.

GOLDFINE, H. & MARQUIS, H. 2007. Escape of *Listeria monocytogenes* from a vacuole. En: GOLDFINE H. & H., S. (eds.) *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and Host Response*. Boston, MA: Springer, pp.177-196.

GOMBAS, D. E., CHEN, Y., CLAVERO, R. S. & SCOTT, V. N. 2003. Survey of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods. *Journal of Food Protection*, 66, 559-569.

GÓMEZ, D., IGUÁCEL, L. P., ROTA, M. C., CARRAMIÑANA, J. J., ARIÑO, A. & YANGÜELA, J. 2015. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meat Products and Meat Processing Plants in Spain. *Foods (Basel, Switzerland)*, 4, 271-282.

- GORRIS, L. G. M. 2005. Food safety objective: An integral part of food chain management. *Food Control*, 16, 801-809.
- GOU, P., ARNAU, J., GARCIA-GIL, N., FULLADOSA, E. & SERRA, X. 2012. Dry-cured ham. En: Hui, Y. H (ed.) *Handbook of meat and meat processing*, segunda edición. Boca Raton: CRC Press. pp. 673-688.
- GOULET, V., HEBERT, M., HEDBERG, C., LAURENT, E., VAILLANT, V., DE VALK, H. & DESENCLOS, J.-C. 2012. Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*, 54, 652-660.
- GRIGSON, C. 2007. Culture, ecology, and pigs from the 5th to the 3rd millennium BC around the Fertile Crescent. En: Albarella, U., Dobney, K., Ervynck, A., Rowley-Conwy, P. (eds.) *Pigs and humans: 10,000 years of interaction*. Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 83–108.
- GRÜNDLING, A., BURRACK, L. S., BOUWER, H. G. A. & HIGGINS, D. E. 2004. *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 12318-12323.
- GRYCZKA, U., SADOWSKA, M., GUZIK, G., STACHOWICZ, W. & LIŚKIEWICZ, G. 2018. Chapter 13: Physical detection methods. *Food Irradiation Technologies: Concepts, Applications and Outcomes*. UK: The Royal Society of Chemistry, pp.280-300.
- GUARIGLIA-OROPEZA, V., ORSI, R. H., GULDIMANN, C., WIEDMANN, M. & BOOR, K. J. 2018. The *Listeria monocytogenes* bile stimulon under acidic conditions is characterized by strain-specific patterns and the upregulation of motility, Cell Wall Modification Functions, and the PrfA Regulon. *Frontiers in Microbiology*, 9.
- HADJILOUKA, A., PARAMITHIOTIS, S. & DROSINOS, E. H. 2014. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and occurrence of listeriosis from Ready-to-Eat fresh fruits and vegetables. En: HAMBRICK, E. C. (ed.) *Listeria monocytogenes: Food Sources, Prevalence and Management Strategies*. Nova Science Publishers, Incorporated, pp.283-296.
- HANSON, D. J., RENTFROW, G., SCHILLING, M. W., MIKEL, W. B., STALDER, K. J. & BERRY, N. L. 2015. US Products-Dry-Cured Hams. En: TOLDRÁ, F., HUI, Y. H., ASTIASARÁN, I., SEBRANEK, J. G. & TALON, R. (eds.) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. UK: John Wiley & Sons, Ltd, pp.347-354.
- HEALTH CANADA. 2011. Policy on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods (DF-FSNP 0071) F. D. Bureau of Microbial Hazards, Health Products and Food Branch (2011), p. 74.
- HECKER, M., PANÉ-FARRÉ, J. & UWE, V. 2007. SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61, 215-236.
- HEREU, A., BOVER-CID, S., GARRIGA, M. & AYMERICH, T. 2012. High hydrostatic pressure and biopreservation of dry-cured ham to meet the Food Safety Objectives for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 107-112.
- HOELZER, K., POUILLOT, R., DENNIS, S., GALLAGHER, D. & KAUSE, J. 2015. 7 - Update on *Listeria monocytogenes*: reducing cross-contamination in food retail operations. En: SOFOS, J. (ed.) *Advances in Microbial Food Safety*. Oxford: Woodhead Publishing, pp.149-194.
- HOF, H. 2003. History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35, 199-202.
- HONIKEL, K.-O. 2008. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78, 68-76.

HOORFAR, J., COOK, N., MALORNY, B., WAGNER, M., DE MEDICI, D., ABDULMAWJOOD, A. & FACH, P. 2003. Making Internal Amplification Control Mandatory for Diagnostic PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 5835-5835.

HORBETT, T. A. 2018. Fibrinogen adsorption to biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106, 2777-2788.

HOZ, L., CAMBERO, M. I., CABEZA, M. C., HERRERO, A. M. & ORDÓÑEZ, J. A. 2008. Elimination of *Listeria monocytogenes* from Vacuum-Packed Dry-Cured Ham by E-beam Radiation. *Journal of Food Protection*, 71, 2001-2006.

HUANG, M., ZHANG, M. & BHANDARI, B. 2019. Recent development in the application of alternative sterilization technologies to prepared dishes: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 1188-1196.

HUGAS, M., GARRIGA, M. & MONFORT, J. M. 2002. New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science*, 62, 359-371.

HUI, T., ZHANG, Y., JAMALI, M. A. & PENG, Z. 2017. Incorporation of pig back fat in restructured dry cured ham to facilitate the release of unsaturated fatty acids and generation of volatile compounds. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119, 1600025.

HUNT, K., BLANC, M., ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. & JORDAN, K. 2018. Challenge studies to determine the ability of foods to support the growth of *Listeria monocytogenes*. *Pathogens*, 7, 80.

HURTADO, S., DAGÀ, I., ESPIGULÉ, E., PARÉS, D., SAGUER, E., TOLDRÀ, M. & CARRETERO, C. 2011. Use of porcine blood plasma in “phosphate-free frankfurters”. *Procedia Food Science*, 1, 477-482.

IAEA - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. 2002. Dosimetry for food irradiation: Sanitary, Phytosanitary and Other Applications. Technical Reports Series No. 409. Vienna.

IAEA - INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. 2015. Manual of good practice in food Irradiation: sanitary, phytosanitary and other applications. Technical Reports. Series No. 481. Vienna.

ICMSF - INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. 2002. *Listeria monocytogenes* in cooked sausage (frankfurters). En: Tompkin, R. B., Garam, L., Roberts, T. A., Buchanan, R. L., Schothorst, M., DAHMS, V.S. & COLE, M. B. (eds.), *Microorganisms in foods 7: Microbiological testing in food safety management*. New York: Kluwer Academic Plenum Publishers & Hall. pp. 313–332

ICNIRP - INTERNATIONAL COMMISSION ON NON-IONIZING RADIATION PROTECTION. 2020. Principles for non-ionizing radiation protection. *Health Physics*, 118: 477-482.

ILLESCAS, J. L., FERRER, S. & BACHO, O. 2012. *Porcino, guía práctica*, Madrid, Mundi Prensa.

IMLAY, J. A. 2002. How oxygen damages microbes: Oxygen tolerance and obligate anaerobiosis. *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp.111-153.

INAMURA, P. Y., KRAIDE, F. H., DRUMOND, W. S., DE LIMA, N. B., MOURA, E. A. B. & DEL MASTRO, N. L. 2013. Ionizing radiation influence on the morphological and thermal characteristics of a biocomposite prepared with gelatin and Brazil nut wastes as fiber source. *Radiation Physics and Chemistry*, 84, 66-69.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. 2005. Sensory Analysis. Methodology. General guidance. ISO-DP 6658. Geneve (Switzerland), International Organization for Standardization.

IVANEK, R., GRÖHN, Y. T., TAUER, L. W. & WIEDMANN, M. 2005. The cost and benefit of *Listeria monocytogenes* food safety measures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 513-523.

IVY, R. A., WIEDMANN, M. & BOOR, K. J. 2012. *Listeria monocytogenes* grown at 7° C shows reduced acid survival and an altered transcriptional response to acid shock compared to *Listeria monocytogenes* grown at 37° C. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 3824-3836.

JACZYNSKI, J. & PARK, J. W. 2003. Microbial inactivation and electron penetration in surimi seafood during electron beam processing. *Journal of Food Science*, 68, 1788-1792.

JAMES, S. J. & JAMES, C. 2014. CUTTING AND BONING | Hot Boning of Meat. En: DIKEMAN, M. & DEVINE, C. (eds.) *Encyclopedia of Meat Sciences*, segunda edición. Oxford: Academic Press, pp.453-457.

JAY, J., M., LOESSNER, M. J. & GOLDEN, D. A. 2005. *Modern food microbiology*, séptima edición. Nueva York (Estados Unidos): Springer,

JIMÉNEZ-COLMENERO, F., VENTANAS, J. & TOLDRÁ, F. 2010. Nutritional composition of dry-cured ham and its role in a healthy diet. *Meat Science*, 84, 585-593.

JIRA, W. & SCHWÄGELE, F. 2017. A sensitive HPLC-MS/MS method for the simultaneous detection of microbial transglutaminase, and bovine and porcine fibrinogen/thrombin in restructured meat. *Food Chemistry*, 237, 841-848.

JIRA, W., SADEGHI-MEHR, A., BRÜGGEMANN, D. A. & SCHWÄGELE, F. 2017. Production of dry-cured formed ham with different concentrations of microbial transglutaminase: Mass spectrometric analysis and sensory evaluation. *Meat Science*, 129, 81-87.

JO, C., KANG, H., LEE, N. Y., KWON, J. H. & BYUN, M. W. 2005. Pectin- and gelatin-based film: effect of gamma irradiation on the mechanical properties and biodegradation. *Radiation Physics and Chemistry*, 72, 745-750.

JOANES, D. N. 1985. On a rank sum test due to kramer. *Journal of Food Science*, 50, 1442-1444.

JORDAN, K., LEONG, D. & ÁLVAREZ ORDÓÑEZ, A. 2015. Sampling and laboratory analysis. *Listeria monocytogenes* in the food processing environment. Cham: Springer International Publishing, pp.45-60.

JUNEJA, V. K., HUANG, L. & YAN, X. 2012. Intrinsic and extrinsic parameters for microbial growth and heat inactivation. En: SUN, D. W. (ed.) *Handbook of Food Safety Engineering*. West Sussex (UK): John Wiley & Sons, pp. 79-91.

KARATZAS, K. A. G. & BENNIK, M. H. J. 2002. Characterization of a *Listeria monocytogenes* Scott A isolate with high tolerance towards high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3183-3189.

KAZMIERCZAK, M. J., MITHOE, S. C., BOOR, K. J. & WIEDMANN, M. 2003. *Listeria monocytogenes* σ^B Regulates Stress Response and Virulence Functions. *Journal of Bacteriology*, 185, 5722-5734.

KAZMIERCZAK, M. J., WIEDMANN, M. & BOOR, K. J. 2006. Contributions of *Listeria monocytogenes* σ^B and PrfA to expression of virulence and stress response genes during extra- and intracellular growth. *Microbiology*, 152, 1827-1838.

- KEMPNER, E. S. 2001. Effects of high-energy electrons and gamma rays directly on protein molecules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90, 1637-1646.
- KIM, H., MARQUIS, H. & BOOR, K. J. 2005. σ^B contributes to *Listeria monocytogenes* invasion by controlling expression of *inlA* and *inlB*. *Microbiology*, 151, 3215-3222.
- KIM, I. S., JO, C., LEE, K. H., LEE, E. J., AHN, D. U. & KANG, S. N. 2012. Effects of low-level gamma irradiation on the characteristics of fermented pork sausage during storage. *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 466-472.
- KIM, J., MOREIRA, R. & CASTELL-PEREZ, E. 2010. Simulation of pathogen inactivation in whole and fresh-cut cantaloupe (*Cucumis melo*) using electron beam treatment. *Journal of Food Engineering*, 97, 425-433.
- KIM, J., MOREIRA, R. G. & CASTELL-PEREZ, E. 2011. Optimizing irradiation treatment of shell eggs using simulation. *Journal of Food Science*, 76, E173-E177.
- KIM, J., MOREIRA, R. G. & CASTELL-PEREZ, M. E. 2008. Validation of irradiation of broccoli with a 10MeV electron beam accelerator. *Journal of Food Engineering*, 86, 595-603.
- KIM, J., MOREIRA, R. G., HUANG, Y. & CASTELL-PEREZ, M. E. 2007. 3-D dose distributions for optimum radiation treatment planning of complex foods. *Journal of Food Engineering*, 79, 312-321.
- KIM, J., MOREIRA, R. G., RIVADENEIRA, R. & CASTELL-PEREZ, M. E. 2006a. Monte Carlo-based food irradiation simulator. *Journal of Food Process Engineering*, 29, 72-88.
- KIM, J., RIVADENEIRA, R. G., CASTELL-PEREZ, M. E. & MOREIRA, R. G. 2006b. Development and validation of a methodology for dose calculation in electron beam irradiation of complex-shaped foods. *Journal of Food Engineering*, 74, 359-369.
- KONG, Q., YAN, W., YUE, L., CHEN, Z., WANG, H., QI, W. & HE, X. 2017. Volatile compounds and odor traits of dry-cured ham (*Prosciutto crudo*) irradiated by electron beam and gamma rays. *Radiation Physics and Chemistry*, 130, 265-272.
- KRAMER, R. M., SHENDE, V. R., MOTL, N., PACE, C. N. & SCHOLTZ, J. M. 2012. Toward a molecular understanding of protein solubility: increased negative surface charge correlates with increased solubility. *Biophysical journal*, 102, 1907-1915.
- 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.
- KUDRA, L. L., SEBRANEK, J. G., DICKSON, J. S., LARSON, E. M., MENDONCA, A. F., PRUSA, K. J., CORDRAY, J. C., JACKSON-DAVIS, A. & LU, Z. 2012. Control of *Listeria monocytogene* son frankfurters and cooked pork chops by irradiation combined with modified atmosphere packaging. *Journal of Food Protection*, 75, 1063-1070.
- KVISTHOLM JENSEN, A., NIELSEN, E. M., BJÖRKMAN, J. T., JENSEN, T., MÜLLER, L., PERSSON, S., BJERAGER, G., PERGE, A., KRAUSE, T. G., KIIL, K., SØRENSEN, G., ANDERSEN, J. K., MØLBAK, K. & ETHELBERG, S. 2016. Whole-genome Sequencing Used to investigate a nationwide outbreak of Listeriosis caused by ready-to-eat delicatessen meat, Denmark, 2014. *Clinical Infectious Diseases*, 63, 64-70.
- LACROIX, M., LE, T. C., OUATTARA, B., YU, H., LETENDRE, M., SABATO, S. F., MATEESCU, M. A. & PATTERSON, G. 2002. Use of γ -irradiation to produce films from whey, casein and soya proteins: structure and functionals characteristics. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 827-832.

- LAKICEVIC, B. & NASTASIJEVIC, I. 2017. *Listeria monocytogenes* in retail establishments: Contamination routes and control strategies. *Food Reviews International*, 33, 247-269.
- LALANDE, M., SCHWOB, L., VIZCAINO, V., CHIROT, F., DUGOURD, P., SCHLATHÖLTER, T. & POULLY, J.-C. 2019. Direct radiation effects on the structure and stability of collagen and other proteins. *ChemBioChem*, 20, 2972-2980.
- LAMONT, R. F., SOBEL, J., MAZAKI-TOVI, S., KUSANOVIC, J. P., VAISBUCH, E., KIM, S. K., ULDBJERG, N. & ROMERO, R. 2011. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. *Journal of Perinatal Medicine*, 39, 227.
- LARSON, G. & FULLER, D. Q. 2014. The evolution of animal domestication. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45, 115-136.
- LECUIT, M. 2007. Human listeriosis and animal models. *Microbes and Infection*, 9, 1216-1225.
- LEE, J.-W., KIM, J.-H., YOON, Y., JO, C. & M-W, B. 2013. Potential Applications of Ionizing Radiation. En: FAN, X. & SOMMERS, C. H. (eds.) *Food Irradiation Research and Technology*, segunda edición. West Sussex (UK): John Wiley & Sons, pp.385-406.
- LEE, S. L., LEE, M. S. & SONG, K. B. 2005. Effect of gamma-irradiation on the physicochemical properties of gluten films. *Food Chemistry*, 92, 621-625.
- LEE, S., LEE, S. & SONG, K. B. 2003. Effect of gamma-irradiation on the physicochemical properties of porcine and bovine blood plasma proteins. *Food Chemistry*, 82, 521-526.
- LEROY, F., GEYZEN, A., JANSSENS, M., DE VUYST, L. & SCHOLLIERS, P. 2013. Meat fermentation at the crossroads of innovation and tradition: A historical outlook. *Trends in Food Science & Technology*, 31, 130-137.
- LI, C., HE, L., MA, S., WU, W., YANG, H., SUN, X., PENG, A., WANG, L., JIN, G., ZHANG, J., JIN, Y. & MA, M. 2018. Effect of irradiation modification on conformation and gelation properties of pork myofibrillar and sarcoplasmic protein. *Food Hydrocolloids*, 84, 181-192.
- LI, X. & FARID, M. 2016. A review on recent development in non-conventional food sterilization technologies. *Journal of Food Engineering*, 182, 33-45.
- LIANOU, A., PANAGOU, E. Z. & NYCHAS, G.-J. E. 2017. Chapter 17 - Meat Safety—I Foodborne Pathogens and Other Biological Issues. En: TOLDRÁ, F. (ed.) *Lawrie's Meat Science*, octava edición. Cambridge (USA): Woodhead Publishing, pp.521-552.
- LINKE, K., RÜCKERL, I., BRUGGER, K., KARPISKOVA, R., WALLAND, J., MURIKLINGER, S., TICHY, A., WAGNER, M. & STESSL, B. 2014. Reservoirs of *Listeria* species in three environmental ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 5583-5592.
- LIU, Y., ORSI, R. H., BOOR, K. J., WIEDMANN, M. & GUARIGLIA-OROPEZA, V. 2017. Home Alone: Elimination of all but one alternative Sigma Factor in *Listeria monocytogenes* allows prediction of new roles for σ^b . *Frontiers in Microbiology*, 8.
- LOEPFE, C., RAIMANN, E., STEPHAN, R. & TASARA, T. 2010. Reduced host cell invasiveness and oxidative stress tolerance in double and triple *csp* gene family deletion mutants of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, 775-783.
- LORBER, B. 2007. Listeriosis. En: GOLDFINE, H. & SHEN, H. (eds.) *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and host response*. Boston: Springer, pp.13-32.
- LORENZO, J. M. & CARBALLO, J. 2015. Changes in physico-chemical properties and volatile compounds throughout the manufacturing process of dry-cured foal loin. *Meat Science*, 99, 44-51.

- LOSANTOS, A., SANABRIA, C., CORNEJO, I. & CARRASCOSA, A. V. 2000. Characterization of *Enterobacteriaceae* strains isolated from spoiled dry-cured hams. *Food Microbiology*, 17, 505-512.
- LUNDÉN, J. M., AUTIO, T. J. & KORKEALA, H. J. 2002. Transfer of persistent *Listeria monocytogenes* contamination between food-processing plants associated with a dicing machine. *Journal of Food Protection*, 65, 1129-1133.
- LUNGU, B., RICKE, S. C. & JOHNSON, M. G. 2009. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: A review. *Anaerobe*, 15, 7-17.
- MACKINNON, M. 2001. High on the hog: linking zooarchaeological, literary, and artistic data for pig breeds in Roman Italy. *American Journal of Archaeology*, 105, 649-673.
- MAHTO, R., GHOSH, S., DAS, M. K. & DAS, M. 2015. Effect of gamma irradiation and frozen storage on the quality of fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and tiger prawn (*Penaeus monodon*). *LWT - Food Science and Technology*, 61, 573-582.
- MAKARITI, I. P., PRINTEZI, A., KAPETANAKOU, A. E., ZEAKI, N. & SKANDAMIS, P. N. 2015. Investigating boundaries of survival, growth and expression of genes associated with stress and virulence of *Listeria monocytogenes* in response to acid and osmotic stress. *Food Microbiology*, 45, 231-244.
- MAKSAN, M. T. & BREČIĆ, R. 2019. PGI Dalmatian Ham in Croatia. En: ARFINI F. & V., B. (eds.) *Sustainability of European Food Quality Schemes*. Springer, Cham, pp.305-317.
- MALLEY, T. J., BUTTS, J. & WIEDMANN, M. 2015. Seek and destroy process: *Listeria monocytogenes* process controls in the ready-to-eat meat and poultry industry. *Journal of Food Protection*, 78, 436-445.
- MAPA. 2020. Denominaciones de origen protegidas (DOP) e Indicaciones geográficas protegidas (IGP) agroalimentarias.. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/relacion25022020-dopsigpsetgsestadotramitanteueconmodifpliegos_tcm30-426476.pdf . [Visitado el 15 de marzo de 2020].
- MAROM, N. & BAR-OZ, G. 2013. The prey pathway: a regional history of cattle (*Bos taurus*) and pig (*Sus scrofa*) domestication in the Northern Jordan Valley, Israel. *PLOS ONE*, 8, e55958.
- MARTÍN, A., ASENSIO, M. A., BERMÚDEZ, M. A. E., CÓRDOBA, M. A. G., ARANDA, E. & CÓRDOBA, J. J. 2002. Proteolytic activity of *Penicillium chrysogenum* and *Debaryomyces hansenii* during controlled ripening of pork loins. *Meat Science*, 62, 129-137.
- MARTÍN, B., PERICH, A., GÓMEZ, D., YANGÜELA, J., RODRÍGUEZ, A., GARRIGA, M. & AYMERICH, T. 2014. Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. *Food Microbiology*, 44, 119-127.
- MARTÍNEZ-ONANDI, N., RIVAS-CAÑEDO, A., NUÑEZ, M. & PICON, A. 2016a. Effect of chemical composition and high pressure processing on the volatile fraction of Serrano dry-cured ham. *Meat Science*, 111, 130-138.
- MARTÍNEZ-ONANDI, N., SÁNCHEZ, C., NUÑEZ, M. & PICON, A. 2019. Microbiota of Iberian dry-cured ham as influenced by chemical composition, high pressure processing and prolonged refrigerated storage. *Food Microbiology*, 80, 62-69.
- MARUŠIĆ, N., PETROVIĆ, M., VIDAČEK, S., PETRAK, T. & MEDIĆ, H. 2011. Characterization of traditional Istrian dry-cured ham by means of physical and chemical analyses and volatile compounds. *Meat Science*, 88, 786-790.

- MARUŠIĆ, N., VIDAČEK, S., JANČI, T., PETRAK, T. & MEDIC, H. 2014. Determination of volatile compounds and quality parameters of traditional Istrian dry-cured ham. *Meat Science*, 96, 1409-1416.
- MATARAGAS, M., ROVETTO, F., BELLIO, A., ALESSANDRIA, V., RANTSIOU, K., DECASTELLI, L. & COCOLIN, L. 2015. Differential gene expression profiling of *Listeria monocytogenes* in Cacciatore and Felino salami to reveal potential stress resistance biomarkers. *Food Microbiology*, 46, 408-417.
- MAURY, M. M., CHENAL-FRANCISQUE, V., BRACQ-DIEYE, H., HAN, L., LECLERCQ, A., VALES, G., MOURA, A., GOUIN, E., SCORTTI, M., DISSON, O., VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. & LECUIT, M. 2017. Spontaneous loss of virulence in natural populations of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 85, e00541-17.
- MEDINA, M., CABEZA, M. C., BRAVO, D., CAMBERO, I., MONTIEL, R., ORDÓÑEZ, J. A., NUÑEZ, M. & 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.
- MEHTA, K. & O'HARA, K. 2006. Dosimetry for food processing and research applications. En: FAN, X. & SOMMERS, C. H. (eds.) *Food Irradiation Research and Technology*. Blackwell Publishing Professional, pp.105-126.
- MELONI, D. 2015. Presence of *Listeria monocytogenes* in Mediterranean-Style Dry Fermented Sausages. *Foods*, 4, 34-50.
- MENA, C., ALMEIDA, G., CARNEIRO, L., TEIXEIRA, P., HOGG, T. & GIBBS, P. A. 2004. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, 21, 213-216.
- MENDONCA, A. F., ROMERO, M. G., LIHONO, M. A., NANNAPANENI, R. & JOHNSON, M. G. 2004. Radiation resistance and virulence of *Listeria monocytogenes* scott a following starvation in physiological saline. *Journal of Food Protection*, 67, 470-4.
- MENÉNDEZ, R. A., RENDUELES, E., SANZ, J. J., SANTOS, J. A. & GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. C. 2018. Physicochemical and microbiological characteristics of diverse Spanish cured meat products. *CyTA - Journal of Food*, 16, 199-204.
- MERCASA. 2019. Alimentación española 2019. Carnes y productos cárnicos. Disponible en: <https://xn--alimentacionenespaa2019-9hc.es/wp-content/uploads/2019/11/Carnes.pdf>
- MESÍAS FJ, PULIDO F, ESCRIBANO M, GASPAR P, PULIDO ÁF, ESCRIBANO A, RODRÍGUEZ-LEDESMA A. 2013. Evaluation of new packaging formats for dry-cured meat products using conjoint analysis: an application to dry-cured Iberian ham. *Journal of Sensory Studies* 28, 238-247.
- MESÍAS, F. J., GASPAR, P., PULIDO, Á. F., ESCRIBANO, M. & PULIDO, F. 2009. Consumers' preferences for Iberian dry-cured ham and the influence of mast feeding: An application of conjoint analysis in Spain. *Meat Science*, 83, 684-690.
- MILLER, R. B. 2005. *Electronic irradiation of foods: an introduction to the technology*, Nueva York, Springer US.
- MILLER, R. B. 2018. Chapter 4 Electron Beam and X-ray equipment for food irradiation applications. En: FERREIRA, I., ANTONIO, A. & CABO VERDE, S. (eds), *Food Irradiation Technologies: Concepts, Applications and Outcomes*. UK: The Royal Society of Chemistry, pp.51-65.

MINER M.D., PORT G.C., FREITAG N.E. 2007. Regulation of *Listeria monocytogenes* virulence genes. En: GOLDFINE, H., SHEN, H. (eds), *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and host response*. Boston (USA): Springer, pp. 138-158.

MIYAHARA, M., SAITO, A., KAMIMURA, T., NAGASAWA, T., ITO, H., TOYODA, M., 2002. Hydrocarbon productions in hexane solutions of fatty acid methyl esters irradiated with gamma rays. *Journal of Health Science*, 48, 418-426.

MODI, V. K., MAHENDRAKAR, N. S., NARASIMHA RAO, D. & SACHINDRA, N. M. 2004. Quality of buffalo meat burger containing legume flours as binders. *Meat Science*, 66, 143-149.

MOHM - MINISTRY OF HEALTH MALAYSIA. 2011. Regulation 13, Food Irradiation Regulations 2011. PU(A) 143/2011.

MOLIN, S. & TOLKER-NIELSEN, T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 255-261.

MONTANARI, C., GATTO, V., TORRIANI, S., BARBIERI, F., BARGOSSO, E., LANCIOTTI, R., GRAZIA, L., MAGNANI, R., TABANELLI, G. & GARDINI, F. 2018. Effects of the diameter on physico-chemical, microbiological and volatile profile in dry fermented sausages produced with two different starter cultures. *Food Bioscience*, 22, 9-18.

MONTIEL, R., PEIROTÉN, Á., ORTIZ, S., BRAVO, D., GAYA, P., MARTÍNEZ-SUÁREZ, J. V., TAPIADOR, J., NUÑEZ, M. & MEDINA, M. 2020. Inactivation of *Listeria monocytogenes* during dry-cured ham processing. *International Journal of Food Microbiology*, 318, 108469.

MONTIEL, R., QUESILLE-VILLALOBOS, A., ALESSANDRIA, V., MEDINA, M., COCOLIN, L. S. & RANTSIOU, K. 2019. Antilisterial Effect and Influence on *Listeria monocytogenes* gene expression of enterocin or *Enterococcus faecalis* in sliced dry-cured ham stored at 7°C. *Journal of Food Protection*, 82, 1598-1606.

MONTVILLE, T. J. & MATTHEWS, K. R. 2013. Physiology, Growth, and Inhibition of Microbes in Foods. En: DOYLE, M. P. & BUCHANAN, R. L. (eds.) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington, D.C: ASM Press, pp.3-18.

MONTVILLE, T. J., MATTHEWS, K. R. & KNIEL, K. E. 2012. *Food microbiology: an introduction*, tercera edición. Washington: ASM Press.

MORA, L., CALVO, L., ESCUDERO, E. & TOLDRÁ, F. 2016. Differences in pig genotypes influence the generation of peptides in dry-cured ham processing. *Food Research International*, 86, 74-82.

MORA, L., SENTANDREU, M. A., KOISTINEN, K. M., FRASER, P. D., TOLDRÁ, F. & BRAMLEY, P. M. 2009. Naturally generated small peptides derived from myofibrillar proteins in Serrano dry-cured ham. *J Agric Food Chem*, 57, 3228-34.

MORA, L., TOLDRÁ-REIG, F., REIG, M., TOLDRÁ, F. 2019. Meat by-products: new insights into potential technical and health applications. En: HAYES M (ed.) *Novel Proteins for Food, Pharmaceuticals, and Agriculture: sources, applications, and advances*. Nueva York: John Wiley & Sons, pp. 101-116.

MORALES, P., CALZADA, J. & NUÑEZ, M. 2006. Effect of high-pressure treatment on the survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in sliced vacuum-packaged Iberian and Serrano cured hams. *J Food Prot*, 69, 2539-43.

MORALES-PARTERA, Á. M., CARDOSO-TOSET, F., JURADO-MARTOS, F., ASTORGA, R. J., HUERTA, B., LUQUE, I., TARRADAS, C. & GÓMEZ-LAGUNA, J. 2017.

Survival of selected foodborne pathogens on dry cured pork loins. *International Journal of Food Microbiology*, 258, 68-72.

MORALES-PARTERA, A. M., CARDOSO-TOSET, F., LUQUE, I., ASTORGA, R. J., MALDONADO, A., HERRERA-LEÓN, S., HERNÁNDEZ, M., GÓMEZ-LAGUNA, J. & TARRADAS, C. 2018. Prevalence and diversity of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and *Listeria monocytogenes* in two free-range pig slaughterhouses. *Food Control*, 92, 208-215.

MORGANTI, M., SCALTRITI, E., COZZOLINO, P., BOLZONI, L., CASADEI, G., PIERANTONI, M., FONI, E. & PONGOLINI, S. 2016. Processing-dependent and clonal contamination patterns of *Listeria monocytogenes* in the cured ham food chain revealed by genetic analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 822-831.

MUJAHID, S., ORSI, R. H., VANGAY, P., BOOR, K. J. & WIEDMANN, M. 2013. Refinement of the *Listeria monocytogenes* σ^B regulon through quantitative proteomic analysis. *Microbiology*, 159, 1109-1119.

MUJUMDAR, A. S. 2015. Principles, classification, and selection of dryers. En: MUJUMDAR, A. S. (ed.) *Handbook of Industrial Drying*, cuarta edición. Boca Raton: CRS Press. pp 3- 30.

NARVÁEZ-RIVAS, M., GALLARDO, E., RÍOS, J. & LEÓN-CAMACHO, M. 2010. A tentative characterization of volatile compounds from Iberian Dry-Cured Ham according to different anatomical locations. A detailed study. *Grasas y Aceites*, 61, 369-377.

NERI, D., ANTOCI, S., IANNETTI, L., CIORBA, A. B., D'AURELIO, R., DEL MATTO, I., DI LEONARDO, M., GIOVANNINI, A., PRENCIPE, V. A., POMILIO, F., SANTARELLI, G. A. & MIGLIORATI, G. 2019. EU and US control measures on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in certain ready-to-eat meat products: An equivalence study. *Food Control*, 96, 98-103.

NICAOGÁIN, K. & O'BYRNE, C. P. 2016. The role of stress and stress adaptations in determining the fate of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* in the Food Chain. *Frontiers in Microbiology*, 7.

NIGHTINGALE, K. K., SCHUKKEN, Y. H., NIGHTINGALE, C. R., FORTES, E. D., HO, A. J., HER, Z., GROHN, Y. T., MCDONOUGH, P. L. & WIEDMANN, M. 2004. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4458-4467.

NISHIHARA, J. 2020. Chapter 12 - Safety of irradiated food. En: ANDERSEN, V. (ed.) *Genetically Modified and Irradiated Food*. Oxford (UK): Academic Press, pp.259-267.

O'BYRNE, C. P. & KARATZAS, K. A. G. 2008. The role of sigma B (sigma B) in the stress adaptations of *Listeria monocytogenes*: overlaps between stress adaptation and virulence. *Advances in Applied Microbiology*, 65, 115-140.

O'BRYAN, C. A., CRANDALL, P. G., RICKE, S. C. & OLSON, D. G. 2008. Impact of Irradiation on the Safety and Quality of Poultry and Meat Products: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 442-457.

OCKERMAN, H. W., BASU, L. & TOLDRÁ, F. 2017. Chapter 22 - Edible by-products. En: TOLDRÁ, F. (ed.) *Lawrie's Meat Science*, octava edición. Cambridge (USA): Woodhead Publishing, pp.679-696.

OFORI, J. A. & HSIEH, Y. P. 2016. The use of blood and derived products as food additives. En: EL-SAMRAGY, Y. (ed.) *Food additive*. ITexLi, pp.229-256.

OLANYA, O. M., HOSHIDE, A. K., IJABADENIYI, O. A., UKUKU, D. O., MUKHOPADHYAY, S., NIEMIRA, B. A. & AYENI, O. 2019. Cost estimation of listeriosis

(*Listeria monocytogenes*) occurrence in South Africa in 2017 and its food safety implications. Food Control, 102, 231-239.

OLESEN, I., VOGENSEN, F. K. & JESPERSEN, L. 2009. Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stress. Foodborne Pathogens and Disease, 6, 669-80.

OLIVER, H. F., ORSI, R. H., WIEDMANN, M. & BOOR, K. J. 2010. *Listeria monocytogenes* σ^B has a small core regulon and a conserved role in virulence but makes differential contributions to stress tolerance across a diverse collection of strains. Applied and Environmental Microbiology, 76, 4216-4232.

OLLINGER, J., BOWEN, B., WIEDMANN, M., BOOR, K. J. & BERGHOLZ, T. M. 2009. *Listeria monocytogenes* σ^B modulates PrfA-mediated virulence factor expression. Infection and Immunity, 77, 2113-2124.

ORSI, R. H. & WIEDMANN, M. 2016. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. Applied Microbiology and Biotechnology, 100, 5273-5287.

ORSI, R. H., BAKKER, H. C. D. & WIEDMANN, M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. International Journal of Medical Microbiology, 301, 79-96.

ORTEGA, J. & ARIZA, M. F. 2012. El mecanismo de muerte celular programada y su importancia en el proceso de maduración de la carne bovina. Revista de Medicina Veterinaria, 23, 83-96.

ORTIZ, A., TEJERINA, D., DÍAZ-CARO, C., ELGHANNAM, A., GARCÍA-TORRES, S., MESÍAS, F. J., TRUJILLO, J. & CRESPO-CEBADA, E. 2020. Is packaging affecting consumers' preferences for meat products? A study of modified atmosphere packaging and vacuum packaging in Iberian dry-cured ham. Journal of Sensory Studies, 35, e12575.

ORTIZ, S., LOPEZ, V., VILLATORO, D., LOPEZ, P., DAVILA, J. C. & MARTINEZ-SUAREZ, J. N. 2010. A 3-Year Surveillance of the Genetic Diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig slaughterhouse and processing plant. Foodborne Pathogens and Disease, 7, 1177-1184.

OUATTARA, B., CANH, L. T., VACHON, C., MATEESCU, M. A. & LACROIX, M. 2002. Use of γ -irradiation cross-linking to improve the water vapor permeability and the chemical stability of milk protein films. Radiation Physics and Chemistry, 63, 821-825.

PAINTER J, SLUTSKER L. 2007. Listeriosis in humans. En: RYSER, E.T, & MARTH, E. H. (eds), *Listeria, listeriosis, and food safety* (tercera edición). Boca Raton (Estados Unidos): CRC press, pp. 85-110.

PARK, J.-N., SONG, B.-S., KIM, J.-H., CHOI, J.-I., SUNG, N.-Y., HAN, I.-J. & LEE, J.-W. 2012. Sterilization of ready-to-cook Bibimbap by combined treatment with gamma irradiation for space food. Radiation Physics and Chemistry, 81, 1125-1127.

PARRA, V., VIGUERA, J., SÁNCHEZ, J., PEINADO, J., ESPÁRRAGO, F., GUTIERREZ, J. I. & ANDRÉS, A. I. 2010. Modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period chilled storage of dry-cured Iberian ham. Meat Science, 84, 760-768.

PARRA, V., VIGUERA, J., SÁNCHEZ, J., PEINADO, J., ESPÁRRAGO, F., GUTIERREZ, J. I. & ANDRÉS, A. I. 2012. Effect of exposure to light on physico-chemical quality attributes of sliced dry-cured Iberian ham under different packaging systems. Meat Science, 90, 236-243.

PATTERSON, M. 1989. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to irradiation on poultry meat and in phosphate-buffered saline. Letters in Applied Microbiology, 8, 181-184.

- PEGG, R.B, HONIKEL, K.O. 2015. Principles of curing. En: TOLDRA, F., HUI, Y.H. (eds), *Handbook of fermented meat and poultry*, segunda edición, UK, Willey Blackwell, pp 19-30.
- PEGG, R.B. & SHAHIDI, F. 2000. Nitrite curing of meat. The N-nitrosamine problem and nitrite alternatives. Connecticut (USA), Food & Nutrition Press, Inc. 268 pp.
- PÉREZ-JUAN, M., FLORES, M. & TOLDRA, F. 2006. Generation of volatile flavour compounds as affected by the chemical composition of different dry-cured ham sections. *European Food Research and Technology*, 222, 658-666.
- PÉREZ-SANTAESCOLÁSTICA, C., CARBALLO, J., FULLADOSA, E., GARCIA-PEREZ, J. V., BENEDITO, J. & LORENZO, J. M. 2018. Effect of proteolysis index level on instrumental adhesiveness, free amino acids content and volatile compounds profile of dry-cured ham. *Food Research International*, 107, 559-566.
- PEROMINGO, B., ANDRADE, M. J., DELGADO, J., SÁNCHEZ-MONTERO, L. & NÚÑEZ, F. 2019. Biocontrol of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus* by native *Debaryomyces hansenii* in dry-cured meat products. *Food Microbiology*, 82, 269-276.
- PEROMINGO, B., NÚÑEZ, F., RODRÍGUEZ, A., ALÍA, A. & ANDRADE, M. J. 2018. Potential of yeasts isolated from dry-cured ham to control ochratoxin A production in meat models. *International Journal of Food Microbiology*, 268, 73-80.
- PETRIČEVIĆ, S., MARUŠIĆ RADOVČIĆ, N., LUKIĆ, K., LISTEŠ, E. & MEDIĆ, H. 2018. Differentiation of dry-cured hams from different processing methods by means of volatile compounds, physico-chemical and sensory analysis. *Meat Science*, 137, 217-227.
- PETROVA, I., AASEN, I. M., RUSTAD, T. & EIKEVIK, T. M. 2015. Manufacture of dry-cured ham: a review. Part 1. Biochemical changes during the technological process. *European Food Research and Technology*, 241, 587-599.
- PHAN-THANH, L., MAHOUI, F. & ALIGÉ, S. 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 121-126.
- PILGRIM, S., KOLB-MÄURER, A., GENTSCHKE, I., GOEBEL, W. & KUHN, M. 2003. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. *Infection and Immunity*, 71, 3473-3484.
- PILLAI, S. D. & SHAYANFAR, S. 2017. Electron Beam Technology and Other Irradiation Technology Applications in the Food Industry. *Topics in Current Chemistry*, 375, 6.
- PILLAI, S.D., SHAYANFAR, S. 2015. Introduction to electron beam pasteurization in food processing. En: PILLAI, S.D., SHAYANFAR S. (eds), *Electron beam pasteurization and complementary food processing technologies*. Cambridge: Woodhead Publishing publications, pp 3-9.
- PIZARRO-CERDÁ J & COSSART, P. 2019. *Listeria monocytogenes*: cell biology of invasion and intracellular growth. En: FISCHETTI, V. A., NOVICK, R. P., FERRETTI, J. J., PORTNOY, D. A., BRAUNSTEIN, M. & ROOD, J. I. (eds.) *Gram-Positive Pathogens*, tercera edición. Washington: American Society for Microbiology press, pp.851-863.
- PIZARRO-CERDÁ, J., KÜHBACHER, A. & COSSART, P. 2012. Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: An updated view. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2.
- POMBINHO, R., VIEIRA, A., CAMEJO, A., ARCHAMBAUD, C., COSSART, P., SOUSA, S. & CABANES, D. 2020. Virulence gene repression promotes *Listeria monocytogenes* systemic infection. *Gut Microbes*, 11, 868-881.
- POPESKO, P. 2010. Atlas de anatomía topográfica de los animales domésticos. Tomo III: Pelvis y miembros. 610 pp.

PORTOCARRERO, S. M., NEWMAN, M. & MIKEL, B. 2002. Reduction of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli* O157:H7 during processing of country-cured hams. *Journal of Food Science*, 67, 1892-1898.

POUILLOT, R., KLONTZ, K. C., CHEN, Y., BURALL, L. S., MACARISIN, D., DOYLE, M., BALLY, K. M., STRAIN, E., DATTA, A. R., HAMMACK, T. S. & VAN DOREN, J. M. 2016. Infectious dose of *Listeria monocytogenes* in outbreak linked to ice cream, United States, 2015. *Emerg Infect Dis*, 22, 2113-2119.

PRADHAN, A. K., IVANEK, R., GROHN, Y. T., BUKOWSKI, R. & WIEDMANN, M. 2011. Comparison of Public Health Impact of *Listeria monocytogenes* product-to-product and environment-to-product contamination of deli meats at retail. *Journal of Food Protection*, 74, 1860-1868.

PRAKASH, A. 2016. Particular applications of food irradiation fresh produce. *Radiation Physics and Chemistry*, 129, 50-52.

PRAKASH, A. 2020. Chapter 9 - What is the benefit of irradiation compared to other methods of food preservation? En: ANDERSEN, V. (ed.) *Genetically Modified and Irradiated Food*. Oxford: Academic Press, pp.217-231.

PREMI, M. & KHAN, K. A. 2018. Irradiation technology: processing of fruits and vegetables. En: SEHRAWAT, R., KHAN, K., GOYAL, M. & PAUL, P. (eds.) *Technological interventions in the processing of fruits and vegetables*, primera edición. New York: Apple Academic Press, Inc, pp.209-226.

PRENCIPE, V. A., RIZZI, V., ACCIARI, V., IANNETTI, L., GIOVANNINI, A., SERRAINO, A., CALDERONE, D., ROSSI, A., MORELLI, D., MARINO, L., MIGLIORATI, G. & CAPOALE, V. 2012. *Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain. *Food Control*, 25, 150-158.

PUCCIARELLI, M. G., BIERNE, H. & PORTILLO, F. G. 2007. The Cell Wall of *Listeria monocytogenes* and its Role in Pathogenicity. En: Goldfine, H. & Shen, H. (eds.) *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and Host Response*. Boston, MA.: Springer, Boston, MA, pp.80-110.

PUGLIESE, C., SIRTORI, F., ACCIAIOLI, A., BOZZI, R., CAMPODONI, G. & FRANCI, O. 2013. Quality of fresh and seasoned fat of Cinta Senese pigs as affected by fattening with chestnut. *Meat Science*, 93, 92-97.

PUGLIESE, C., SIRTORI, F., CALAMAI, L. & FRANCI, O. 2010. The evolution of volatile compounds profile of “Toscano” dry-cured ham during ripening as revealed by SPME-GC-MS approach. *Journal of Mass Spectrometry*, 45, 1056-1064.

PUSHKAREVA, V. I. & ERMOLAEVA, S. A. 2010. *Listeria monocytogenes* virulence factor Listeriolysin O favors bacterial growth in co-culture with the ciliate *Tetrahymena pyriformis*, causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts. *BMC Microbiology*, 10, 26.

QIN, Y., JIANG, J., ZHAO, L., ZHANG, J. & WANG, F. 2018. Chapter 13 - Applications of Alginate as a Functional Food Ingredient. En: GRUMEZESCU, A. M. & HOLBAN, A. M. (eds.) *Biopolymers for Food Design*. London (UK): Academic Press, pp.409-429.

RADOSHEVICH, L. & COSSART, P. 2018. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 32-46.

RAENGPRADUB, S., WIEDMANN, M. & BOOR, K. J. 2008. Comparative Analysis of the σ^B -Dependent Stress Responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 158-171.

RAGON, M., WIRTH, T., HOLLANDT, F., LAVENIR, R., LECUIT, M., LE MONNIER, A. & BRISSE, S. 2008. A New Perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. PLOS Pathogens, 4, e1000146.

RAJABIAN, T., GAVICHERLA, B., HEISIG, M., MÜLLER-ALTROCK, S., GOEBEL, W., GRAY-OWEN, S. D. & IRETON, K. 2009. The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of *Listeria*. Nature Cell Biology, 11, 1212-1218.

RANTSIOU, K., MATARAGAS, M., ALESSANDRIA, V. & COCOLIN, L. 2012. Expression of virulence genes of *Listeria monocytogenes* in food. Journal of Food Safety, 32, 161-168.

RAVINDRAN, R. & JAISWAL, A. K. 2019. Wholesomeness and safety aspects of irradiated foods. Food Chemistry, 285, 363-368.

Real Decreto 1469/2007, de 2 de noviembre, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta y la caña de lomo ibéricos. BOE-A-2007-19073. BOE, 264:45087-45104.

REPÚBLICA DE SINGAPUR. 2020. Agri-Food and Veterinary Authority of Singapore. Food Regulations, Part 3, Irradiated Food. Disponible en: <https://sso.agc.gov.sg/SL/SFA1973-RG1#pr38>

REYNOLDS, A. E., HARRISON, M. A., ROSE-MORROW, R. & LYON, C. E. 2001. Validation of Dry Cured Ham Process for Control of Pathogens. Journal of Food Science, 66, 1373-1379.

RICCI, A., ALLENDE, A., BOLTON, D., CHEMALY, M., DAVIES, R., FERNÁNDEZ ESCÁMEZ, P. S., GIRONES, R., HERMAN, L., KOUTSOUMANIS, K., NØRRUNG, B., ROBERTSON, L., RU, G., SANAA, M., SIMMONS, M., SKANDAMIS, P., SNARY, E., SPEYBROECK, N., TER KUILE, B., THRELFALL, J., WAHLSTRÖM, H., TAKKINEN, J., WAGNER, M., ARCELLA, D., DA SILVA FELICIO, M. T., GEORGIADIS, M., MESSENS, W. & LINDQVIST, R. 2018. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. EFSA Journal, 16, e05134.

RIGANAKOS, K.A. 2010. Food irradiation techniques. En: ARVANITOYANNIS I.S. (ed.), Irradiation of food commodities: techniques, applications, detection, legislation, safety and consumer opinion. Massachusetts: Academic Press, 23-42 pp.

ROBERTS, P. B. 2014. Food irradiation is safe: Half a century of studies. Radiation Physics and Chemistry, 105, 78-82.

ROBERTS, P. B. 2016. Food irradiation: Standards, regulations and world-wide trade. Radiation Physics and Chemistry, 129, 30-34.

ROCOURT, J., BUCHRIESER, C. 2007. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. En: RYSER, E.T & MARTH, E. H. (eds), *Listeria, listeriosis, and food safety*, tercera edición. Boca Raton (Estados Unidos): CRC press, pp. 1-20.

RODRIGUES, P. & VENÂNCIO, A. 2018. Chapter 15 Biological Techniques. En: FERREIRA, I., ANTONIO, A. & CABO VERDE, S., (eds), *Food irradiation technologies: Concepts, Applications and Outcomes*. UK: The Royal Society of Chemistry, pp.314-336.

RODRÍGUEZ, P. 2018. La exportación de jamón curado en España. Distribución y Consumo, 2, 18-24.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., HERNÁNDEZ, M., SCORTTI, M., ESTEVE, T., VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. & PLA, M. 2004. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and AmpliFluor technology. Appl Environ Microbiol, 70, 1366-77.

- ROLHION, N. & COSSART, P. 2017. How the study of *Listeria monocytogenes* has led to new concepts in biology. *Future Microbiology*, 12, 621-638.
- ROMERO DE ÁVILA, M. D., HOZ, L., ORDÓÑEZ, J. A. & CAMBERO, M. I. 2014a. Dry-cured ham restructured with fibrin. *Food Chemistry*, 159, 519-528.
- ROMERO DE ÁVILA, M. D., ORDÓÑEZ, J. A., DE LA HOZ, L., HERRERO, A. M. & CAMBERO, M. I. 2010. Microbial transglutaminase for cold-set binding of unsalted/salted pork models and restructured dry ham. *Meat Science*, 84, 747-754.
- ROMERO DE ÁVILA, M. D., ORDÓÑEZ, J. A., ESCUDERO, R. & CAMBERO, M. I. 2014b. The suitability of plasma powder for cold-set binding of pork and restructured dry ham. *Meat Science*, 98, 709-717.
- ROMERO DE ÁVILA, M.D. 2013. Empleo de sistemas de cohesión en frío para la elaboración de jamón deshuesado curado. Tesis para optar el grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- RUIZ, J., VENTANAS, J. & CAVA, R. 2001. New Device for Direct Extraction of Volatiles in Solid Samples Using SPME. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5115-5121.
- RYSER, E. T. & BUCHANAN, R. L. 2013. *Listeria monocytogenes*. En: DOYLE, M. P. & BUCHANAN, R. L. (eds.) *Food Microbiology*. Washington, D.C.: ASM Press, pp.503-545.
- SABATO, S. F., NAKAMURAKARE, N. & SOBRAL, P. J. A. 2007. Mechanical and thermal properties of irradiated films based on Tilapia (*Oreochromis niloticus*) proteins. *Radiation Physics and Chemistry*, 76, 1862-1865.
- SADEGHI-MEHR, A., LAUTENSCHLAEGER, R. & DRUSCH, S. 2016. Behavior of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* throughout the manufacture and shelf-life of dry-cured formed ham. *Food Control*, 64, 22-28.
- SALVÁ, B. K., FERNÁNDEZ-DIEZ, A., RAMOS, D. D., CARO, I. & MATEO, J. 2012. Chemical composition of alpaca (*Vicugna pacos*) charqui. *Food Chemistry*, 130, 329-334.
- SÁNCHEZ-MOLINERO, F. & ARNAU, J. 2008. Effect of the inoculation of a starter culture and vacuum packaging during the resting stage on sensory traits of dry-cured ham. *Meat Science*, 80, 1074-1080.
- SANTHI, D., KALAIKANNAN, A., MALAIRAJ, P. & ARUN PRABHU, S. 2017. Application of microbial transglutaminase in meat foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 2071-2076.
- SATIN, M. 2002. Use of irradiation for microbial decontamination of meat: situation and perspectives. *Meat Science*, 62, 277-283.
- SCALLAN, E., HOEKSTRA, R. M., ANGULO, F. J., TAUXE, R. V., WIDDOWSON, M. A., ROY, S. L., JONES, J. L. & GRIFFIN, P. M. 2011. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7-15.
- SCHMID, B., KLUMPP, J., RAIMANN, E., LOESSNER, M. J., STEPHAN, R. & TASARA, T. 2009. Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 1621-1627.
- SELGAS, M. D., GARCÍA, M. L. & CALVO, M. M. 2009. Effects of irradiation and storage on the physico-chemical and sensory properties of hamburgers enriched with lycopene. *International Journal of Food Science & Technology*, 44, 1983-1989.
- SERDAROĞLU, M., YILDIZ-TURP, G. & ABRODÍMOV, K. 2005. Quality of low-fat meatballs containing Legume flours as extenders. *Meat Science*, 70, 99-105.

- SERRA-CASTELLÓ, C., JOFRÉ, A., GARRIGA, M. & BOVER-CID, S. 2020. Modeling and designing a *Listeria monocytogenes* control strategy for dry-cured ham taking advantage of water activity and storage temperature. *Meat Science*, 165, 108131.
- SIMÕES, M., SIMÕES, L. C. & VIEIRA, M. J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 573-583.
- SIRTORI, F., DIMAURO, C., BOZZI, R., AQUILANI, C., FRANCI, O., CALAMAI, L., PEZZATI, A. & PUGLIESE, C. 2020. Evolution of volatile compounds and physical, chemical and sensory characteristics of Toscano PDO ham from fresh to dry-cured product. *European Food Research and Technology*, 246, 409-424.
- SLADE, D. & RADMAN, M. 2011. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75, 133-191.
- SOMMERS C.H., DELINCÉE H., SMITH J. S., MARCHIONI E. 2013. Toxicological safety of irradiated foods. En: FAN, X. & SOMMERS, C.H. (eds.), *Food irradiation research and technology*, segunda edición. West Sussex (UK): John Wiley & Sons, 53-74 pp.
- SOMMERS, C. H., MACKAY, W.J., 2013. Irradiation of ready-to-eat meat products. En: FAN, X., SOMMERS, C. H. (eds), *Food irradiation research and technology*, segunda edición. John Wiley & Sons, Iowa (USA), pp. 197-208.
- SOMMERS, C., FAN, X., NIEMIRA, B. A. & SOKORAI, K. 2003. Radiation (Gamma) Resistance and Postirradiation Growth of *Listeria monocytogenes* suspended in beef bologna containing sodium diacetate and potassium lactate. *Journal of Food Protection*, 66, 2051-2056.
- SONG, H. P., KIM, B., JUNG, S., CHOE, J. H., YUN, H., KIM, Y. J., & JO, C. 2009. Effect of gamma and electron beam irradiation on the survival of pathogens inoculated into salted, seasoned, and fermented oyster. *LWT - Food Science and Technology*, 42 (8), 1320-1324.
- 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. & MARCHIONI, E. 2014. A critical review on toxicological safety of 2-alkylcyclobutanones. *Radiation Physics and Chemistry*, 103, 188-193.
- SORAPUKDEE, S. & TANGWATCHARIN, P. 2018. Quality of steak restructured from beef trimmings containing microbial transglutaminase and impacted by freezing and grading by fat level. *Asian-Australas Journal of Animal Science*, 31, 129-137.
- STADER, C., JUDAS, M. & JIRA, W. 2019. A rapid UHPLC-MS/MS screening method for the detection of the addition of porcine blood plasma to emulsion-type pork sausages. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411, 6697-6709.
- STANKUS, T. 2016. Ham. *Journal of Agricultural & Food Information*, 17, 174-199.
- STEFANOVA, R., VASILEV, N. V. & SPASSOV, S. L. 2010. Irradiation of Food, Current Legislation Framework, and Detection of Irradiated Foods. *Food Analytical Methods*, 3, 225-252.
- STOLLEWERK, K., JOFRÉ, A., COMAPOSADA, J., ARNAU, J. & GARRIGA, M. 2012. The effect of NaCl-free processing and high pressure on the fate of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* on sliced smoked dry-cured ham. *Meat Science*, 90, 472-477.
- STOLLEWERK, K., JOFRÉ, A., COMAPOSADA, J., ARNAU, J. & GARRIGA, M. 2014. NaCl-free processing, acidification, smoking and high pressure: Effects on growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in QDS processed® dry-cured ham. *Food Control*, 35, 56-64.
- STRAWN, L. K., FORTES, E. D., BIHN, E. A., NIGHTINGALE, K. K., GRÖHN, Y. T., WOROBO, R. W., WIEDMANN, M. & BERGHOLZ, P. W. 2013. Landscape and meteorological factors affecting prevalence of three food-borne pathogens in fruit and vegetable farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 588-600.

- SWAMINATHAN, B. & GERNER-SMIDT, P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9, 1236-1243.
- TACK, D. M., RAY, L., GRIFFIN, P. M., CIESLAK, P. R., DUNN, J., RISSMAN, T., JERVIS, R., LATHROP, S., MUSE, A., DUWELL, M., SMITH, K., TOBIN-D'ANGELO, M., VUGIA, D. J., ZABLOTSKY KUFEL, J., WOLPERT, B. J., TAUXE, R. & PAYNE, D. C. 2020. Preliminary incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food - foodborne diseases active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2016-2019. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 69, 509-514.
- TAHERGORABI, R., JACZYNSKI, J. & MATAK, K. E. 2014. Electron beam inactivation of foodborne pathogens with an emphasis on *Salmonella*. En: BHAT, R. & GÓMEZ-LÓPEZ, V. M. (eds.) *Practical Food Safety*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., pp.451-470.
- TAHERGORABI, R., MATAK, K. E. & JACZYNSKI, J. 2012. Application of electron beam to inactivate *Salmonella* in food: Recent developments. *Food Research International*, 45, 685-694.
- TAKAHASHI, H., KURAMOTO, S., MIYA, S. & KIMURA, B. 2011. Desiccation survival of *Listeria monocytogenes* and other potential foodborne pathogens on stainless steel surfaces is affected by different food soils. *Food Control*, 22, 633-637.
- THOMAS, M. K., VRIEZEN, R., FARBER, J. M., CURRIE, A., SCHLECH, W. & FAZIL, A. 2015. Economic cost of a *Listeria monocytogenes* outbreak in Canada, 2008. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12, 966-971.
- TIAN, X., LI, Z. J., CHAO, Y. Z., WU, Z. Q., ZHOU, M. X., XIAO, S. T., ZENG, J. & ZHE, J. 2020. Evaluation by electronic tongue and headspace-GC-IMS analyses of the flavor compounds in dry-cured pork with different salt content. *Food Research International*, 137, 109456.
- TOLDRÁ F. 2004. Dry-cured ham. En: HUI Y.H., MEUNIER-GODDIK L., HANSEN A.S., JOSEPHSEN J., NIP W.K., STANFIELD P.S., TOLDRÁ F. (eds.), *Handbook of food and beverage fermentation technology*, Marcel-Dekker Inc., New York, pp. 369-384.
- TOLDRÁ, F. & ARISTOY C. 2010. Dry-cured ham. En: TOLDRÁ, F. (ed.) *Handbook of meat processing*. Iowa. Willey-Blackwell. pp. 351-362.
- TOLDRÁ, F. & BARAT, J.M. 2018. Salt reduction on processed meat. En: TOLDRÁ, F., NOLLET, L.M., *Advances technologies for meat processing*, segunda edición. Boca Raton (Estados Unidos): CRC press, pp 443-460.
- TOLDRÁ, F. 2002. Dry-cured meat products. Connecticut (Estados Unidos), Food & Nutrition Press.
- TOLDRÁ, F. 2006. The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends in Food Science & Technology*, 17, 164-168.
- TOLDRÁ, F. 2011. Improving the sensory quality of cured and fermented meat products. En: KERRY, J. P. AND KERRY, J. F. (eds), *Processed meats improving safety, nutrition and quality*. Cambridge (UK): Woodhead Publishing, pp 508-526.
- TOLDRÁ, F. 2012. Dry-cured ham. En: HUI, Y. H. (ed.) *Handbook of animal-based fermented food and beverage technology*, segunda edición. Boca Raton (Estados Unidos): CRC press, pp 549-564.
- TOLDRÁ, F. 2016. Ham: Dry-cured Ham. En: CABALLERO, B., FINGLAS, P. M. & TOLDRÁ, F. (eds.) *Encyclopedia of Food and Health*, vol. 3. Oxford: Academic Press, pp.307-310.
- TOLDRÁ, F., ARISTOY, M.A. & FLORES, M. 2009. Relevance of nitrate and nitrite in dry-cured ham and their effects on aroma development. *Grasa Aceite* 60,291–296

TOLDRÁ, F., MORA, L. & REIG, M. 2016. New insights into meat by-product utilization. *Meat Science*, 120, 54-59.

TOLDRÁ, F. & REIG, M., 2015. Biochemistry of muscle and fat. En: TOLDRÁ, F., HUI, Y.H., ASTIASARAN, I., SEBRANEK, J.G., TALON, R. (eds.), *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, segunda edición. Blackwell Pub, Ames, Iowa, USA, pp. 49-54.

TOLDRÁ, M., LYNCH, S. A., COUTURE, R. & ÁLVAREZ, C. 2019. Chapter 5 - Blood Proteins as Functional Ingredients. En: GALANAKIS, C. M. (ed.) *Sustainable Meat Production and Processing*. Cambridge (Inglaterra): Academic Press, pp.85-101.

TOLEDANO, A. M., JORDANO, R., MEDINA, L. M. & LÓPEZ-MENDOZA, M. C. 2019. Behavior and effect of combined starter cultures on microbiological and physicochemical characteristics of dry-cured ham. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 122-131.

TOLEDO-ARANA, A., DUSSURGET, O., NIKITAS, G., SESTO, N., GUET-REVILLET, H., BALESTRINO, D., LOH, E., GRIPENLAND, J., TIENSUU, T., VAITKEVICIUS, K., BARTHELEMY, M., VERGASSOLA, M., NAHORI, M. A., SOUBIGOU, G., RÉGNAULT, B., COPPÉE, J. Y., LECUIT, M., JOHANSSON, J. & COSSART, P. 2009. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature*, 459, 950-6.

TOMÁSEVIC, I. 2015. Intense light pulses upset the sensory quality of meat products. *Tehn. mesa* 56 (1): 1-7.

TSUTSUMI, T., TODORIKI, S., NEI, D., ISHII, R., WATANABE, T. & MATSUDA, R. 2011. Detection of irradiated food using 2-Alkylcyclobutanones as markers: verification of the european committee standardization method EN1785 for the detection of irradiated food containing lipids. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 52, 321-329.

UNIÓN EUROPEA. 1999a. 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: 16-23.

UNIÓN EUROPEA. 1999b. 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.

UNIÓN EUROPEA. 2009. Lista de los alimentos o ingredientes alimentarios que los Estados miembros autorizan a tratar con radiación ionizante del 24.11.2009. *Diario Oficial de la Unión Europea* C283:5.

USDA/FDA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE/FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2018. 21 CFR 179 Code of Federal Regulations. Title 21 Food and Drugs, Chapter 1 Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Part 179—Irradiation in the production, processing, and handling of food, Sections 179.21, 179.25 y 179.26. Washington, DC: US Government Printing Office. Visitado el 26 de junio del 2020. Disponible en: https://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=&SID=ab5a0912d43e60f35cf70d28ca0f91b8&mc=true&n=pt21.3.179&r=PART&ty=HTML#se21.3.179_121 [Visitado el 26 de junio del 2020].

USDA/FSIS - THE FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE OF THE UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 2011. New Jersey firm recalls imported ham products due to potential *Listeria* contamination. Recall Release FSIS-RC-045-2011. Disponible en: https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/fsis-archives-content/internet/main/topics/recalls-and-public-health-alerts/recall-case-archive/archives/ct_index262a [Visitado el 26 de junio del 2020].

USDA/FSIS - THE FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE OF THE UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. 2005. Food standards and labelling policy book. Disponible en: <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7c48be3e-e516-4ccf-a2d5-b95a128f04ae/Labeling-Policy-Book.pdf?MOD=AJPERES> [Visitado el 26 de junio del 2020].

VAN DER VEEN, S., MOEZELAAR, R., ABEE, T. & WELLS-BENNIK, M. H. J. 2008. The growth limits of a large number of *Listeria monocytogenes* strains at combinations of stresses show serotype- and niche-specific traits. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 1246-1258.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A., KUHN, M., BERCHE, P., CHAKRABORTY, T., DOMÍNGUEZ-BERNAL, G., GOEBEL, W., GONZÁLEZ-ZORN, B., WEHLAND, J. & KREFT, J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 584-640.

VELASCO, R., ORDÓÑEZ, J. A., CABEZA, M. C., DE LA 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.

VELGE, P. & ROCHE, S. M. 2010. Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: a result of the evolution between saprophytism and virulence? *Future Microbiology*, 5, 1799-1821.

VENTANAS, J. 2006. El jamón ibérico. De la dehesa al paladar, Madrid, Ed. Mundi-Prensa.

VENTANAS, J., & CAVA, R. 2001. Dinámica y control del proceso de secado del jamón ibérico en secaderos y bodegas naturales y cámaras climatizadas. En: Ventanas, J. (ed.). *Tecnología del jamón ibérico*. Madrid: Ediciones Mundi Prensa S.A., pp. 255-292.

VENUGOPAL, V., DOKE, S. N. & THOMAS, P. 1999. Radiation processing to improve the quality of fishery products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39, 391-440.

VERA, A., GONZÁLEZ, G., DOMÍNGUEZ, M. & BELLO, H. 2013. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Revista chilena de infectología*, 30, 407-416.

VERMASSEN, A., DORDET-FRISONI, E., DE LA FOYE, A., MICHEAU, P., LAROUTE, V., LEROY, S. & TALON, R. 2016. Adaptation of *Staphylococcus xylosus* to nutrients and osmotic stress in a salted meat model. *Frontiers in Microbiology*, 7.

VIGNE, J.-D., ZAZZO, A., SALIÈGE, J.-F., POPLIN, F., GUILAINE, J. & SIMMONS, A. 2009. Pre-Neolithic wild boar management and introduction to Cyprus more than 11,400 years ago. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 16135-16138.

VILAR, I., GARCÍA FONTÁN, M. C., PRIETO, B., TORNADIJO, M. E. & CARBALLO, J. 2000. A survey on the microbiological changes during the manufacture of dry-cured lacón, a Spanish traditional meat product. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 1018-1026.

VOYSEY, P. & BETT, S. R. 2017. In defense of the european 100 CFU of *Listeria monocytogenes*/g in Ready-to-Eat Foods. En: GURTLE, J., DOYLE, M. & KORNACKI, J. (eds.) *Foodborne Pathogens. Food Microbiology and Food Safety*. Cham: Springer International Publishing, pp.375-392.

WAGNER, M. & MCLAUCHLIN, J. 2008. Biology. En: LIU, D. (ed.) *Handbook of Listeria monocytogenes*. Boca Raton (Estados Unidos): CRC press, pp. 3-26.

WAŁECKA-ZACHARSKA, E., KOSEK-PASZKOWSKA, K., BANIA, J., KARPÍŠKOVÁ, R. & STEFANIAK, T. 2013. Salt stress-induced invasiveness of major *Listeria monocytogenes* serotypes. *Letters in Applied Microbiology*, 56, 216-221.

- WAMBURA, P. & VERGHESE, M. 2011. Effect of pulsed ultraviolet light on quality of sliced ham. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 2173-2179.
- WARD, T. J., DUCEY, T. F., USGAARD, T., DUNN, K. A. & BIELAWSKI, J. P. 2008. Multilocus Genotyping Assays for Single Nucleotide Polymorphism-Based Subtyping of *Listeria monocytogenes* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 7629-7642.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2018a. Listeriosis – Key facts. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>. [Visitado el 5 de julio de 2020].
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2018b. Listeriosis – South Africa. Disponible en: <https://www.who.int/csr/don/28-march-2018-listeriosis-south-africa/en/>. [Visitado el 5 de julio de 2020].
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2019. Listeriosis – España. Disponible en: <https://www.who.int/csr/don/16-september-2019-listeriosis-spain/es/>. [Visitado el 5 de julio de 2020]
- WOOD, O. B. & BRUHN, C. M. 2000. Position of the American Dietetic Association: food irradiation. *Journal of the American Dietetic Association*, 100, 246-53.
- WOODSIDE, J.V., 2015. Nutritional aspects of irradiated food. *Stewart Postharvest Review*, 3, 1-6.
- XU, H., LEE, H.-Y. & AHN, J. 2011. Characteristics of biofilm formation by selected foodborne pathogens. *Journal of Food Safety*, 31, 91-97.
- YIM, D.-G., JO, C., KIM HYUN, C., SEO KANG, S. & NAM, K.-C. 2016. Application of electron-beam irradiation combined with aging for improvement of microbiological and physicochemical quality of beef loin. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36, 215-222.
- YOON, K. S. 2003. Effect of gamma irradiation on the texture and microstructure of chicken breast meat. *Meat Science*, 63, 273-277.
- YUN, H., HAENG LEE, K., JUNG LEE, H., WOON LEE, J., UK AHN, D. & JO, C. 2012. Effect of high-dose irradiation on quality characteristics of ready-to-eat chicken breast. *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 1107-1110.
- ZACHMANN, K. 2011. Atoms for peace and radiation for safety – how to build trust in irradiated foods in Cold War Europe and beyond. *History and Technology*, 27, 65-90.
- ZADRAVEC, M., VAHČIĆ, N., BRNIĆ, D., MARKOV, K., FRECE, J., BECK, R., LEŠIĆ, T. & PLEADIN, J. 2020. A study of surface moulds and mycotoxins in Croatian traditional dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 317, 108459.
- ZAGOREC, M. & CHAMPOMIER-VERGÈS, M.-C. 2017. Chapter 6 - Meat Microbiology and Spoilage. En: TOLDRÁ, F. (ed.) *Lawrie's Meat Science*, octava edición. Cambridge (USA): Woodhead Publishing, pp.187-203.
- ZANARDI, E., BATTAGLIA, A., GHIDINI, S., CONTER, M., BADIANI, A. & IANIERI, A. 2009. Lipid oxidation of irradiated pork products. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 1301-1307.
- ZANARDI, E., CALIGIANI, A. & NOVELLI, E. 2018. New insights to detect irradiated food: an overview. *Food Analytical Methods*, 11, 224-235.
- ZHANG, J., YI, Y., PAN, D., ZHOU, G., WANG, Y., DANG, Y., HE, J., LI, G. & CAO, J. 2019. ¹H NMR-based metabolomics profiling and taste of boneless dry-cured hams during processing. *Food Research International*, 122, 114-122.

ZHANG, Q., FENG, Y., DENG, L., FENG, F., WANG, L., ZHOU, Q. & LUO, Q. 2011. SigB plays a major role in *Listeria monocytogenes* tolerance to bile stress. International Journal of Food Microbiology, 145, 238-243.

ZHAO, Y., SUN, N., LI, Y., CHENG, S., JIANG, C. & LIN, S. 2017. Effects of electron beam irradiation (EBI) on structure characteristics and thermal properties of walnut protein flour. Food Research International, 100, 850-857.

ZHOU, G. H. & ZHAO, G. M. 2007. Biochemical changes during processing of traditional Jinhua ham. Meat Science, 77, 114-20.

ZHOU, G.-H. & ZHAO, G.-M. 2012. History and heritage of Jinhua ham. Animal Frontiers, 2, 62-67.

ZHU, M. J., MENDONCA, A., ISMAIL, H. A. & AHN, D. U. 2009. Fate of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat turkey breast rolls formulated with antimicrobials following electron-beam irradiation. Poultry Science, 88, 205-213.

ZUBER, I., LAKICEVIC, B., PIETZKA, A., MILANOV, D., DJORDJEVIC, V., KARABASIL, N., TEODOROVIC, V., RUPPITSCH, W. & DIMITRIJEVIC, M. 2019. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from a small-scale meat processor in Montenegro, 2011–2014. Food Microbiology, 79, 116-122.