

Volumen 9. N. Extraordinario
Febrero 1993
ISSN 02 13-4101

Microbiología

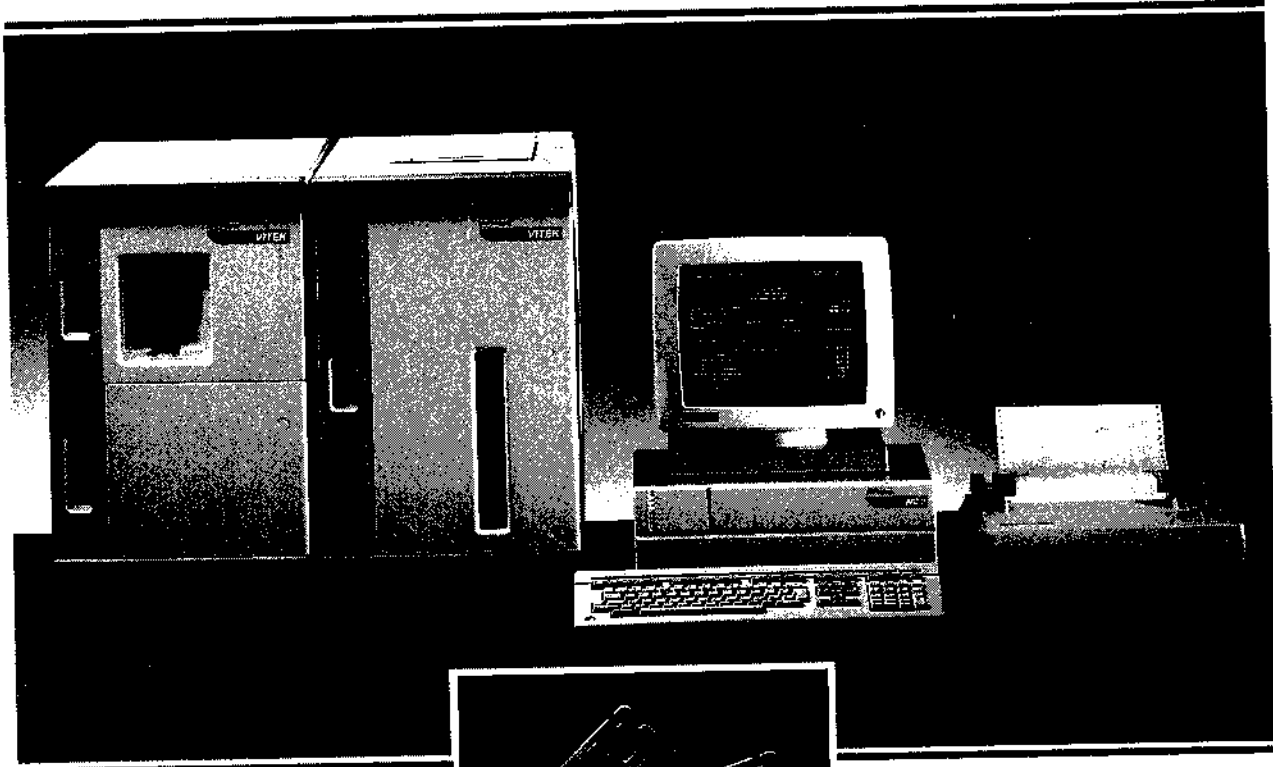
**VOLUMEN MONOGRAFICO
DE ALIMENTOS**

SEM

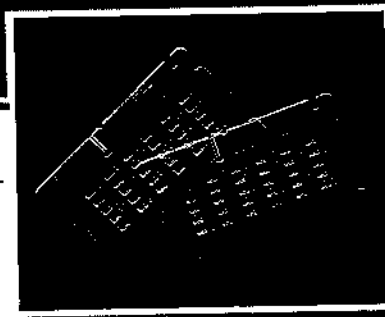
BIOMÉRIEUX: LOS SISTEMAS ...

VITEK

La nueva generación de automáticos en bacteriología



El principio de análisis de VITEK es el estudio de la **cinética** del crecimiento bacteriano en presencia de substratos específicos o antibióticos: los resultados se obtienen en un promedio de **4-6 horas**.



Gestión completa de los resultados

El programa estadístico IMS proporciona la gestión de los resultados administrativos y bacteriológicos de los pacientes, y permite realizar los estudios epidemiológicos.

Gestión completa del análisis

La tarjeta VITEK soporte original de la reacción, permite la **automatización completa** del análisis, de la incubación y la edición de los resultados sin ninguna manipulación.

Los sistemas VITEK se pueden conectar mono o **bidireccionalmente**.

Las tarjetas VITEK ofrecen una amplia gama de tests:
Identificación: 350 especies
Enterobacterias, Gram (-) no fermentadores,
Estafilococos, Streptococos, Neisseria, Anaerobios,
Levaduras, Bacillus...

Antibiograma

Gran variedad de tarjetas que se adaptan a los distintos tipos de gérmenes y a la localización de la infección.
"Screening" de los gérmenes urinarios,...



bioMérieux

69280 Marcy-l'Étoile, Francia. Tel. 78 87 20 00 / Télex 330967
España: Manuel Tovar, 24, 28034 Madrid. Tel. (91) 358 11 42 / Télex 46620
Otras filiales en Alemania, Bélgica, Holanda, Italia, Japón, Portugal, Reino Unido, Suiza.

**SECRETARIA ADMINISTRATIVA
DE LA SEM**

Hortaleza, 104, 2.º izda.

Teléfono 308 23 22.

Fax: 308 25 11.

Horario: de lunes a viernes, 9,30-14,30 horas.

MICROBIOLOGIA SEM

Publicación de la Sociedad Española de Microbiología

Consejo Editorial (Editorial Board)	Especialidades (Special fields)
Juan Antonio Ordóñez, Departamento de Higiene y Microbiología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid.	Editor-Coordenador (Editor-in-chief)
Salomón Bartnicki-García, Department of Plant Pathology, University of California, Riverside, CA 92521 USA.	Micología (Mycology)
José Claudio Pérez Díaz, Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, 28035 Madrid.	Microbiología Clínica (Medical Microbiology)
Víctor Campos, Facultad de Ciencias Básicas y Matemáticas, Universidad Católica, Avda. Brasil, 2950. Valparaíso, Chile.	Microbiología ambiental (Environmental Microbiology)
Esteban Domingo, Instituto de Biología Molecular, CSIC/UAM, Cantoblanco, 28049 Madrid.	Virología (Virology)
J. M. López Pila, Institut für Wasser-, Boden- und Lufthygiene des Bundesgesundheitsamtes, Corrensplatz 1. D 1000 Berlin 33 (Dahlem).	
Mariano Esteban, Dep. Biochemistry, Box B, Downstate Medical Center, 450 Clarkson Avenue, Brooklyn, NY 12203, USA	Virología e Inmunología (Virology and Immunology)
Jordi Barbé, Departamento de Genética y Microbiología, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona.	Genética Microbiana (Microbial Genetics)
Moselio Schaechter, Dpt. of Molec. Biology and Microbiology Tufts Medical School, 136 Harrison Avenue, Tufts University, Boston, MA 02111, USA.	
Ricardo Guerrero, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Zona Universitaria de Pedralbes, Universidad de Barcelona, 08028 Barcelona.	Ecología Microbiana (Microbial Ecology)
Germán Larriba, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Extremadura, Badajoz.	Bioquímica y Fisiología Microbianas (Microbial Biochemistry and Physiology)
Enrico Cabit, National Institutes of Health, Blag 10 Room 9H-11 Bethesda, MD 20892, USA.	Morfología y Ultraestructura (Morphology and Ultrastructure)
Manuel Benjamín Manzanal, Departamento Interfacultativo de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.	Microbiología Industrial (Industrial Microbiology)
Paloma Liras, Areas de Microbiología, Departamento de Ecología, Genética y Microbiología, Universidad de León. 24071 León.	
M.ª Luisa García López, Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León.	Microbiología de los Alimentos (Food Microbiology)
D. A. A. Mossel, Eijkman Foundation for Medical Research, P.O. Box 6024, 3503 PA Utrecht, The Netherlands.	
Antonio Ventosa, Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla.	Taxonomía Bacteriana (Bacterial Taxonomy)
Hans Trüper, Institut für Mikrobiologie & Biotechnologie Rheinische Friedrich-Wilhelms, Universität Bonn, Meckenheimer Allee, 168, D-5300 Bonn I.	

Dirección: Sociedad Española de Microbiología. Hortaleza, 104.
28004 Madrid (España). Tel. (91) 261 98 00. Ext. 211.
Aparecen dos números al año (1993), que se integran en un volumen.
Precio de suscripción anual. Año 1993: España, 7.200 ptas. (IVA incluido);
Europa, 85 \$; resto países, 96 \$.

FOTOCOMPOSICION: Lasercom, S. A.
IMPRIME: Graesal, Madrid.
DEPOSITO LEGAL: M-30455-1985.



EDITORIAL GARSÍ, S.A.

Edita: EDITORIAL GARSÍ, S. A. Publicidad: Sociedad para la
Publicidad Especializada (SPE, S. L.). Londres, 17. 28028
Madrid. Teléfono (91) 726 08 00. Delegación Barcelona: Nu-
manca, 85-87. 08029 Barcelona. Teléfono (93) 415 45 44. Telé-
fono para cambios de domicilio y suscripciones: (91) 726 08 00.

Miembro de la
**asociación española
de prensa técnica**

Sección española de la
Federación Internacional
de la Prensa Periódica



Guidelines to authors

«Microbiología» (Published by the Spanish Society for Microbiology) publishes original research papers, research Notes and occasionally reviews covering all aspects of Microbiology. All submissions should be written in Spanish or in English. The decision to accept manuscripts is made by the Editorial Board.

Submission of a paper to this Journal is understood to imply that it has not previously been published and that it is not being considered for publication elsewhere. Consent is given for reproduction of this Journal if accredited as the source.

ORGANIZATION AND FORMAT OF THE MANUSCRIPTS. Type every portion of the manuscript double-space with a wide margin at the left on UNE A-4 format sheets. Only one side of the sheet should be used and the pages should be numbered sequentially. Papers must be restricted to a maximum of 15 printed pages including figures and tables (this corresponds to approximately 25 typewritten pages).

The front page should include title, name(s) of the author(s), institution affiliation(s) and complete address(es). Three to five keywords would also be included.

Papers should be divided into: Abstracts in English and in Spanish (not exceeding 250 words). Introduction. Materials and Methods. Results. Discussion. Acknowledgements and References. Results and Discussion can be combined.

Abbreviations and symbols should follow the recommendation of the IUPAC-IUB Commission and the Metric System is to be used throughout.

Cite each listed reference by numbers in the text. References should be numbered and arranged in alphabetical order as indicated in the following examples:

Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Seeberg, E., Nissez-Meyer, J. and Stricke, P. (1976), *den V* gene of bacteriophage T4 determines a DNA glucosylate specific for pyrimidine dimers in DNA. *J. Virol.* 35, 790-797.

Tomasz, A. (1984). Building and breaking in the cell wall of bacteria - The role for autolysins. *In: C. Nombela* (ed.) *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*, pp. 3-12. Elsevier Science Pub. B. V. Amsterdam.

References to thesis, manuscripts not accepted for publication or Meetings should be indicated in the text as follows: (García, P. *et al.* 1985, in preparation), (Smith, T. 1985. Ph. D. thesis, University of Colorado, Colorado) or (Suárez, A. y González, F. 1975). V Congr. Nac. Microbiol, p. 1845).

Only those photographs which are strictly necessary for the understanding of the paper should be submitted. Photoprints must be of sufficient quality to ensure good reproduction. There should be numbered on the back and identified with the first author's name written in pencil. Legends for line drawings and photoprints must be typed double-space on a separate sheet. The size of the photographs should not exceed the printing area (13 × 20 cm). All elements in the drawing should be prepared to withstand reductions. Drawings and line figures should be drawn in black ink on tracing paper and should be prepared as indicated for the photographs. Colored illustrations are not accepted.

Tables should be compiled on separate sheets with a descriptive title and numbered independently of the figures using Arabic numerals.

Please indicate with a soft pencil the approximate location of tables and figures in the left margin of the page.

NOTES. Notes should be restricted to 6 typewritten pages and are intended to present experimental observations and descriptions of techniques or methodological changes of interest. They should be written according to the guidelines given for papers, but without the heading divisions, and their abstracts should not exceed 50 words. Figures and tables should be restricted to a maximum of 2 figures and 1 table or vice versa.

MINIREVIEWS. Minireviews articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write them. However, if some authors are interested in publishing minireviews, these will be submitted for publication. They should not be longer than approx. *twenty* double-spaced typewritten pages *including* the space needed for figures and tables.

PROOFS. On acceptance of the paper, one galley proof will be sent to the nominated author to check for typesetting accuracy. The corrected proofs should be duly returned within one week's time. If delays were observed, the proofs will be corrected by the editorial staff and published. Broader changes implying recomposition of the text will be at the author's expense. Twenty-five offprints of each paper are supplied free of charge. Additional reprints will be billed at cost price if requested upon returning the corrected galley proofs.

Contributions, in duplicate, may be sent to the Chief Editor or to the editor whose special field is the most closely related to the subject matter.

Normas para los autores

«Microbiología» (Publicación de la SEM) acepta trabajos y Notas de investigación originales dentro del campo de la Microbiología y, ocasionalmente, artículos de revisión. Textos en castellano o en inglés. La aceptación corresponde al Consejo Editorial.

Sólo se admitirán trabajos inéditos que no estén pendientes de publicación en cualquier otra revista. Los originales publicados en «Microbiología» podrán ser reproducidos siempre que se indique su origen.

PRESENTACION DE LOS MANUSCRITOS. Los trabajos, por duplicado, estarán escritos a máquina, a doble espacio, en hojas UNE A-4 por una sola cara, numeradas correlativamente y con un amplio margen en la parte izquierda y no deberán exceder de 15 páginas impresas incluyendo tablas y figuras (lo que corresponde aproximadamente a 25 hojas mecanografiadas).

Los trabajos incluirán una primera página en la que se indicará por este orden: Título del trabajo, nombre y apellido del autor o autores, centro en el que se ha realizado el trabajo y dirección completa del mismo, así como de tres a cinco palabras clave. En los artículos en castellano se deberá incluir una versión inglesa del título.

Los trabajos constarán de: Resúmenes en inglés y en castellano (de no más de 250 palabras), Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos y Bibliografía. Las secciones de Resultados y Discusión se podrán fusionar en una sola.

Las abreviaturas deberán seguir las recomendaciones de la Comisión IUPAC-IUB sobre nomenclatura bioquímica. Las unidades de medida serán las correspondientes al Sistema Métrico Decimal.

La bibliografía será citada en el texto mediante números y se preparará numerada y en orden alfabético de acuerdo con los ejemplos que se ofrecen a continuación:

Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

Seeberg, E., Nissee-Meyer, J. and Strike, P. (1976). *den V* gene of bacteriophage T4 determines a DNA glycosylase specific for pyrimidine dimers in DNA. *J. Virol.* **35**, 790-797.

Tomasz, A. (1984). Building and breaking in the cell wall of bacteria - The role for autolysins. *In: C. Nombela* (ed.) *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*. pp. 3-12. Elsevier Science Pub. B. V. Amsterdam.

Las referencias a tesis doctorales, manuscritos no aceptados a comunicaciones presentadas a Congresos, deben incluirse en el texto del trabajo de acuerdo con los siguientes ejemplos: (García, P. *et al.* 1985 in preparation), (Smith, T. 1985. Ph. D. Thesis, University of Colorado, Colorado)_ or (Suárez, A. y González, F. 1975. Res. V. Congr. Nac. Microbiol. p. 1845).

Las fotografías, que deberán estar preparadas para su reproducción directa, se limitarán a las estrictamente necesarias para la comprensión del trabajo y serán de calidad suficiente para asegurar una buena reproducción. Deberán estar numeradas al dorso indicando el apellido del primer autor a lápiz. Los textos de las mismas irán mecanografiados a doble espacio y en hoja aparte. En los trabajos en castellano las figuras incluirán asimismo un texto en inglés. El tamaño de las fotografías no excederá de 13 x 20 cm. Las dimensiones de los rótulos deberán ser las adecuadas para ser legibles en caso de que se reduzca la fotografía. La presentación de dibujos en tinta china y papel vegetal seguirá las mismas normas. No se admitirán fotografías en color.

Las tablas se enviarán en hojas aparte, numeradas independientemente de las figuras, con números arábigos y deberán llevar el correspondiente título explicativo.

Los autores deberán indicar a lápiz en el margen la situación aproximada en donde deben aparecer las tablas y las figuras.

NOTAS. Las Notas, que no deberán exceder de seis páginas mecanografiadas, incluyendo figuras y tablas, tienen por objeto la presentación de observaciones experimentales, descripción de técnicas o modificaciones metodológicas de interés. Su redacción se efectuará ateniéndose a las Normas previamente descritas para los trabajos, pero suprimiendo las divisiones con encabezamiento y con resúmenes no superiores a 50 palabras. Sólo incluirán, como máximo, dos figuras y una tabla, o viceversa.

ARTICULOS DE REVISION. Los artículos de revisión versarán sobre temas de microbiología de gran interés, y su redacción se solicitará a especialistas. Sin embargo, si algún autor está interesado en publicar artículos de revisión, éstos tendrán que ser supervisados. Los manuscritos deberán comprender aproximadamente de 12 a 20 páginas (incluidas figuras y tablas) mecanografiadas a doble espacio.

PRUEBAS. Los autores recibirán pruebas que deberán devolver en plazo no superior a una semana. Transcurrido dicho plazo sin devolución de las pruebas, éstas serán corregidas por la revista y publicado el trabajo. Las correcciones se limitarán a errores tipográficos, gramaticales o de datos incorrectos. Modificaciones más importantes que impliquen recomposición del texto, deberán ser abonadas por el autor. Se enviarán 25 separatas gratuitas por artículo; si se desearan más, deberá indicarse por escrito cuando se devuelvan las pruebas corregidas. Las separatas adicionales serán facturadas a precio de coste.

Dos copias de cada manuscrito se enviarán al editor-coordinador o al editor de la especialidad más relacionada con el contenido del trabajo.

CONTENTS

	Page
Technology of the dry-cured ham production. <i>Arnau, J.</i>	3
Microbial interactions in Spanish dry-cured hams. <i>Hernández, E. (*) and Huerta, T.</i>	10
Degradative pathways for lipids and proteins along the ripening of dry-cured hams. <i>López Bote, C. (*), Córdoba, J. J. and Antequera, T.</i>	20
Biochemical and microbiological events of Parma ham production technology. <i>Chizzolini, R. (*), and Novelli, E.</i>	26
Utilization of lactic acid bacteria in the control of pathogenic organisms in foods. <i>Hernández, P. E. (*), Rodríguez, J. M., Cintas, L. M., Moreira, W. L., Sobrino, O. J., Fernández, M. F. and Sanz B.</i>	37
Incidence, behaviour and control of <i>Aeromonas hydrophila</i> in meat and milky products. <i>García-López, M. L. (*), Otero, A., García-Fernández, M. C. and Santos, J. A.</i>	49
Incidence and control of <i>Campylobacter</i> in foods. <i>Hernández Haba, J.</i>	57
The use of molecular biology techniques to control aflatoxin contamination. <i>Sanchis, V.</i>	69
The use of molecular techniques in the characterization of wine yeast strains during the fermentation process. <i>Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramón, D.</i>	76
Genetic manipulation of fungic enzymes synthesis of use in food industries. <i>González, R., Pérez-González, J. A., Ventura, L., Sánchez, P., Sanz, P., Fernández Espinar, M. T., Vallés, S., Piñaga, F. and Ramón, D.</i>	83
Predictive modelling of growth, survival and inactivation of pathogenic and spoilage organisms in food. <i>Roberts, T. A.</i>	93
Computer hardware and software in food microbiology: Applications in the microorganisms identification. <i>Prieto Maradona, M.</i>	96
Design of experiments and data analysis of food microbiology. <i>Carbonell, E. A.</i>	104

(*) Corresponding author.

INDICE

	Página
Tecnología de elaboración del jamón. <i>Arnau, J.</i>	3
Evolución de los parámetros microbiológicos del jamón curado. <i>Hernández, E. (*) y Huerta, T.</i>	10
Procesos degradativos de lípidos y proteínas durante la maduración del jamón. <i>López Bote, C. (*), Córdoba, J. J. y Antequera, T.</i>	20
Procesos bioquímicos y microbiológicos en la tecnología de la elaboración del jamón de Parma. <i>Chizzolini, R. (*) y Novelli, E.</i>	26
Utilización de bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos. <i>Hernández, P. E. (*), Rodríguez, J. M., Cintas, L. M., Moreira, W. L., Sobrino, O. J., Fernández, M. F. y Sanz B.</i>	37
Incidencia, comportamiento y control de <i>Aeromonas hydrophila</i> en productos cárnicos y lácteos. <i>García-López, M. L. (*), Otero, A., García-Fernández, M. C. y Santos, J. A.</i>	49
Incidencia y control de <i>Campylobacter</i> en alimentos. <i>Hernández Haba, J.</i>	57
Aplicaciones de las técnicas de biología molecular para el control de la contaminación por aflatoxinas. <i>Sanchis, V.</i>	69
Utilización de técnicas moleculares en la caracterización de levaduras vínicas y estudio del proceso de vinificación. <i>Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. y Ramón, D.</i>	76
Manipulación genética de la síntesis de enzimas fúngicas de uso en industrias de alimentos. <i>González, R., Pérez-González, J. A., Ventura, L., Sánchez, P., Sanz, P., Fernández Espinar, M. T., Vallés, S., Piñaga, F. y Ramón, D.</i>	83
Diseño para la predicción del crecimiento, supervivencia e inactivación de órganos. <i>Roberts, T. A.</i>	93
La informática en microbiología de alimentos: Aplicaciones en la identificación de microorganismos. <i>Prieto Maradona, M.</i>	96
Diseño de experimentos y tratamiento de datos en microbiología de alimentos. <i>Carbonell, E. A.</i>	104

(*) A quien debe dirigirse la correspondencia.

**EL JAMON CURADO:
ASPECTOS TECNOLOGICOS,
MICROBIOLOGICOS
Y BIOQUIMICOS**

Tecnología de elaboración del jamón curado

J. Arnau

Centro de Tecnología de la Carne (IRTA). Granja Camps i Armet. 17121 Monells (Gerona).

Summary

The main factors to be considered in the preservation of hams are: pH level, temperature and level of water activity. There are four different stages in the process of curing. (1) Selection of the raw material: the longer the time of curing, the higher the percentage of marbled fat has to be (to control the drying process). The temperature within the ham should be kept between 1 and 3° C. (2) In the salting stage, nitrifiers are added and the hams are either coated with salt for 1 day per kg of ham, or a specific quantity of salt is applied in a massager or a tumbler. (3) In the post-salting stage, hams are kept below 5° C for at least one month. During this stage salt diffuses throughout the ham. Some dehydration, and selection of bacteria occurs. On the outside of the ham fungi will grow, while inside *Micrococcaceae* are the dominant flora. Finally the hams pass to a drying-maturing stage. As the level of water activity falls, the temperature is increased, causing proteolysis and lipolysis, which are important for the development of texture and flavour of the ham.

Key words: dry cured ham, technology, quality of the meat, salt cured, dry cured.

Resumen

Los principales factores que intervienen en la conservación del jamón curado son el pH, la temperatura y la actividad de agua. El proceso de elaboración consta de diversas fases: 1) selección de la materia prima: cuanto más se desea prolongar el proceso de curación, mayor es la cantidad de grasa infiltrada que se precisa para regular el proceso de secado. La temperatura del jamón debe mantenerse entre 1 y 3° C; 2) en el período de salado se añaden nitrificantes y los jamones son cubiertos con sal durante un día por kilogramo de jamón o se añade una cantidad específica de sal en una masajeadora o bombo de salado; 3) en el período de postsalado los jamones se mantienen a una temperatura inferior a 5° C durante un período mínimo de un mes. Durante esta etapa la sal se difunde por todo el jamón, produciéndose una ligera deshidratación y selección bacteriana. En el exterior del jamón se produce un crecimiento de hongos, mientras que en el interior las *Micrococcaceae* pasan a ser la flora dominante, y 4) los jamones pasan después a una etapa de secado-maduración. A medida que disminuye la actividad de agua aumenta la temperatura, produciéndose una proteólisis y lipólisis que son importantes para el desarrollo de la textura, aroma y sabor del jamón curado.

Introducción

El proceso de elaboración del jamón curado tiene 2 objetivos fundamentales: el primero es lograr una estabilización, de manera que el producto pueda mantenerse a temperatura ambiente sin peligro para la salud del consumidor ni riesgo de alteración; el segundo consiste en desarrollar las características sensoriales por las que es apreciado el jamón curado. Los principales factores que intervienen en la conservación del jamón curado son el pH, la temperatura y la actividad del agua (7). Las etapas del proceso de elaboración son selección de la materia prima, salado, reposo y secado-maduración.

Selección de la materia prima

Efecto de la calidad de la carne

Uno de los problemas más importantes de la calidad de la carne a nivel industrial es la presencia de carnes PSE y DFD. Las carnes PSE presentan más pérdidas por goteo y menor rendimiento al final del proceso (9). Para la elaboración de jamón curado deben evitarse los jamones DFD (pH > 6,2 en el músculo *Semimembranosus*), puesto que en ellos el riesgo de deterioro es mayor y junto con la contaminación microbiana determinan en gran medida el porcentaje de «cala» en los procesos industriales de fabricación (5). Los jamones DFD tienen una elevada adhesividad y pastosidad (2, 6), lo cual origina problemas de loncheado y una valoración negativa de la textura por los consumidores. Los jamones DFD están más arrugados en la superficie, presentan mayor número de precipitados de fosfatos y mayor brillo del corte (2), lo cual produce una sensación de carne poco curada. Estos jamones al estar más arrugados presentan una mayor superficie de deshidratación, lo cual compensa en parte su menor velocidad de deshidratación respecto a los jamones normales. En los jamones DFD la concentración de nitrógeno no proteico y tirosina libre es inferior a los jamones normales; por otra parte, al estar el pH alejado del punto isoeléctrico de la tirosina (pI = 5,63), se ve favorecida la solubilización de ésta y se observa una menor presencia de pintas blancas y velo blanco (1).

Medidas de calidad de carne

Como medidas objetivas de la calidad de la carne, para seleccionar los jamones DFD pueden usarse el pH a las 24 horas post mortem o la fibra óptica (FOP). Las medidas deben efectuarse en el músculo *Semimembranosus*, evitando siempre efectuarlas en otros músculos que normalmente presentan un pH₂₄ elevado como, por ejemplo, el músculo *Gracilis* y el *Recto femoral*, entre otros (1). El color evaluado por una persona entrenada permite distinguir alrededor de un 90 % de los jamones DFD (12).

Problemática industrial que genera la carne DFD

En nuestro país el uso de jamones con pH > 6,2 es problemático, puesto que muchas empresas reciben los jamones congelados o fabrican solamente jamón curado y, por tanto, no tienen una salida para este tipo de jamones. Una posible solución es realizar en primer lugar un muestreo aleatorio para detectar los proveedores que presentan un mayor porcentaje de jamones DFD, los cuales deberían ser eliminados en la medida de lo posible. En segundo lugar se puede efectuar una clasificación separando los jamones con pH > 6,2 si se realiza un control de pH a la entrada

de fábrica o realizar un control visual por personal especializado que permita detectar un porcentaje elevado de jamones DFD. Estos jamones deberían someterse a una etapa de reposo más prolongada que en los jamones normales, lo cual disminuiría notablemente el número de bajas. Las empresas que fabrican simultáneamente jamón cocido y jamón curado deberían destinar los jamones DFD para la fabricación de jamón cocido, ya que la carne DFD posee una mayor CRA, lo cual es muy ventajoso, especialmente en el jamón cocido sin fosfatos añadidos.

De acuerdo con los resultados de Newton y Gill (10) en carne fresca, la adición de dextrosa antes del apilado del jamón puede disminuir la posibilidad de que los microorganismos ataquen a los aminoácidos y desarrollen aromas pútridos que hacen al jamón incomedible.

Efecto de los factores genéticos

Los cerdos blancos están constituidos fundamentalmente por cruces de razas Large White y Landrace, o Landrace y Duroc en la línea femenina; en la línea masculina existe la tendencia a utilizar machos finalizadores híbridos Large White X Pietrain y en el caso de productos de calidad híbridos Large White X Duroc. Como finalizadores musculados se usan también machos Landrace Belga (Tibau, comunicación personal).

Para la elaboración de jamón curado de calidad se precisa una cierta cantidad de grasa infiltrada que regule el proceso de deshidratación. En los jamones muy magros el proceso de deshidratación tiene lugar muy rápidamente, produciéndose con frecuencia problemas de acortezamiento que ocasionan defectos de aroma y sabor. Los jamones muy conformados no deberían ser utilizados para la fabricación de jamón curado, ya que en ellos la distancia a recorrer por la sal hacia el interior y del agua hacia el exterior es elevada, lo cual favorece los fenómenos de proteólisis, ocasionando una mayor presencia de pintas blancas, velo blanco y textura pastosa, que es rechazada por los consumidores (2, 11). Los problemas de desgarros en la articulación coxofemoral son más frecuentes en los cerdos conformados y magros debido a la mayor velocidad de deshidratación superficial y a la menor resistencia de la articulación coxofemoral a las tensiones del secado (2). Así pues, es recomendable agrupar los jamones por peso, cantidad de grasa y conformación para tener una materia prima de partida lo más uniforme posible.

Importancia de la temperatura de la materia prima

La refrigeración de los jamones después del sacrificio debe producirse de la forma más rápida posible hasta situarse entre 1 y 3° C en el momento de salado. Deben evitarse temperaturas superiores, puesto que el riesgo de deterioro aumenta, y temperaturas inferiores, puesto que se dificulta la entrada de la sal y nitrificantes.

En los jamones congelados la penetración de la sal tiene lugar de forma más rápida que en los no congelados, con lo cual el proceso de estabilización del jamón se ve acelerado. Se observa en ellos un mayor número de pintas blancas debido a que el proceso de congelación-descongelación produce rotura de las membranas, las cuales pueden actuar como núcleos de cristalización, al mismo tiempo la velocidad de migración de la tirosina se verá favorecida, con lo cual el crecimiento cristalino es más rápido (1).

Salado

En la etapa de salado se pretende conseguir que el jamón adquiera la cantidad de sal y nitrificantes suficientes para que sea estable microbiológicamente, tenga un sabor ligeramente salado,

textura y color adecuados. Los jamones pueden ser microbiológicamente estables usando únicamente sal, aunque la acción de ésta se ve favorecida si se añaden nitratos y nitritos (7). De hecho, en el jamón de Parma los nitratos y nitritos juegan un papel menor.

En España el salado de los jamones se realiza actualmente usando fundamentalmente dos tecnologías:

- Apilado de los jamones recubiertos de sal.
- Cantidad fija de sal por kilogramo de jamón mediante uso de bombos de salado o masajeadoras.

El apilado que se hacía tradicionalmente en el suelo de la cámara de salado tiende actualmente a usar recipientes de acero inoxidable que son más higiénicos, evacúan bien la salmuera de exudado y aprovechan mejor el espacio de la cámara, facilitando a su vez el transporte mecánico de los contenedores y un salado más uniforme.

En el segundo caso se añade una cantidad fija de sal, alargándose en este caso el proceso de salado hasta que cada jamón adquiera la cantidad deseada. La cantidad de sal a añadir es variable según si se deja o no evacuar el agua exudada por los jamones. En este caso el salado suele efectuarse en dos fases, para lo cual se usan masajeadoras o bombos de salado.

Las masajeadoras, los bombos de salado y la inyección de salmuera en los puntos problemáticos suelen usarse para acelerar la penetración de la sal y así asegurar la estabilidad del jamón. La merma en la etapa de salado suele oscilar entre el 3 y el 7%. Si se tiene en cuenta la sal absorbida, la cantidad total de agua perdida es del 7 al 10%.

En el jamón de Parma el salado tiene una duración de un mes a una temperatura de 0-4° C y una humedad relativa del 75 al 90%. En este tipo de salado la humedad relativa es muy importante para la penetración de la sal, ya que cuanto mayor es aquélla más fácilmente penetra la sal en el interior del jamón, pero también se elimina el agua con mayor dificultad, y debe, por tanto, buscarse un compromiso. A este tipo de jamón se le aplica durante el salado una cantidad importante de sal en la cabeza del fémur, posibilitándose una difusión longitudinal de la misma. Después de una semana se saca la sal gruesa y se pone una sal más fina. Al cabo de un mes los jamones son cepillados y permanecen 2 meses más a una temperatura de 1-4° C y una humedad relativa del 70-80%. El contenido en sal al final del salado en el exterior es del 5-6% y en el interior del 2-3%.

El factor principal que regula la velocidad de penetración de la sal es el tiempo de solubilización de la sal en la superficie de la carne, lo cual explica que la sal húmeda penetre más rápidamente que la seca y que en los jamones congelados la penetración de la sal sea más rápida debido en parte al exudado que se observa en su superficie.

En los jamones la sal penetra casi exclusivamente por la parte magra y es necesario que se funda alrededor del hueso. La cantidad de sal al principio del proceso es mucho más elevada en las zonas superficiales que en las profundas, invirtiéndose la situación posteriormente, a medida que se va secando el jamón. La explicación debe buscarse en la tendencia natural que existe a igualarse los potenciales químicos entre las diferentes zonas del jamón. Por tanto, la tendencia será a que se iguale la relación sal/agua entre las diferentes zonas del jamón (factor termodinámico), en la medida que sea posible, durante el tiempo de fabricación, siempre y cuando no se vea dificultada por la distancia entre zonas o la presencia de barreras de grasa, hueso y tejido conjuntivo (factor cinético) (1).

En la mayoría de los jamones centroeuropeos el deshuesado y despiece se efectúa antes del salado, con lo cual la penetración de la sal es mucho más rápida; también se usa con frecuencia el salado en salmuera.

En la sal destinada a salazón se tolera hasta un 2% sobre producto seco de sales de magnesio calculadas como MgO que contribuyen a mantener la humedad de la sal (4).

Reposo

Después del salado, los jamones son lavados para eliminar el exceso de sal exterior y en algunos casos se aplican conservantes de tratamiento superficial (3) para evitar un crecimiento excesivo de *Micrococcaceae* en la superficie del jamón, que daría lugar a la formación de un limo denominado «remelo».

La finalidad principal de la etapa de reposo es conseguir un reparto de la sal por todo el jamón, al mismo tiempo que se logra una ligera deshidratación; el jamón queda cubierto por una capa de hongos y en el interior las *Micrococcaceae* pasan a ser la flora dominante. Al final de esta etapa el jamón suele tener una merma que oscila entre el 10 y el 15 %.

La temperatura de esta fase es inferior a los 5° C y la humedad relativa es variable en función del secadero, velocidad del aire, carga, etc. El coeficiente de carga óptimo está alrededor de 100 a 120 kg/m³ (13). Para tener un secado regular, la cantidad de agua que se evapora debe estar compensada por la difusión de agua del interior del jamón al exterior del mismo. En caso contrario pueden presentarse dos problemas que pueden ser el origen de otros: el encostrado y el remelo. El encostrado se produce cuando la velocidad de evaporación es superior a la velocidad de difusión, produciendo un secado excesivo de la superficie del jamón, que dificulta el secado posterior. El remelo tiene lugar cuando se produce una condensación superficial o bien el agua que se difunde hacia la superficie es superior a la capacidad de evaporación del aire. Esta humedad superficial favorece el crecimiento de *Micrococcaceae*, la migración a la superficie y posterior cristalización de fosfato dibásico de sodio que está presente de forma natural en el jamón. Al producirse el secado del jamón esta capa mineral favorece el encostrado. El fosfato dibásico de sodio se forma principalmente a bajas temperaturas en las zonas de pH elevado (corteza, músculo gracilis...), con concentración elevada de NaCl, elevada relación fosfato/agua y humedad superficial elevada (1).

La duración de la etapa de reposo es variable, pero debe ser como mínimo de un mes. Cuanto más larga es esta etapa, menos problemas de cala se presentan en el producto acabado. En el jamón de Parma y en el jamón de cerdo ibérico el reposo es prolongado, pudiendo llegar hasta los 3 meses en el primer caso debido a la baja concentración de sal y al gran tamaño de los jamones, y en el segundo a la lentitud en la penetración de la sal ocasionada por el elevado porcentaje de grasa intramuscular e intermuscular.

Ahumado

En algunos países europeos (Alemania, Bélgica) los jamones son ahumados con la siguiente finalidad:

- Obtención de un color, sabor y aroma ahumado.
- Acción antioxidante y conservadora (8).

Secado-maduración

En el secado el jamón se deshidrata y prosiguen los fenómenos de proteólisis y lipólisis que condicionan el aroma. Dicha etapa en jamones españoles tiene lugar inicialmente a una temperatura inferior a 15° C, aumentando posteriormente de forma paulatina. En el caso del jamón de cerdo ibérico, al aumentar la temperatura, se funde la grasa, dando lugar al sudado del jamón. La evolución de la temperatura en la etapa de secado debe estar ligada a la actividad de agua en los distintos puntos del jamón. En aquellos jamones que posean una baja concentración de sal la temperatura deberá ser suave para evitar problemas de cala, texturas pastosas y precipitados de tirosina.

Es importante tener una buena distribución de los jamones en los carros y en los secaderos, de forma que el proceso de deshidratación sea lo más uniforme posible; de esta forma evitaremos problemas de falta de homogeneidad de secado y defectos de textura, sabor y aroma debidos a un secado defectuoso.

La velocidad de deshidratación debe controlarse a lo largo del proceso, ya que si es muy lenta en los primeros estadios da lugar a la presencia de un limo superficial (remelo) y si es muy rápida produce un endurecimiento superficial que frena la deshidratación posterior o bien facilita la formación de grietas o cavidades en la zona de la articulación coxofemoral que sirven de refugio a los ácaros y presentan con frecuencia olores anómalos (coquera).

El jamón de Parma se lava al cabo de 3 meses con agua caliente y se almacena 6 días a unos 20° C, lo cual permite aromatizar el jamón y detectar posibles defectos de fabricación. La etapa de secado transcurre a una temperatura de unos 15° C. Después de 7-8 meses se frena el secado del jamón mediante la aplicación de una capa de grasa con harina, pimienta y sal. En general los jamones pueden venderse después de un período de 12 meses.

Antes de la comercialización los jamones son pinchados en determinados puntos mediante un hueso, al objeto de eliminar aquellos que presenten olores anormales (cala) y, por tanto, no puedan ser consumidos. Las zonas de calado suelen ser las que normalmente presentan más problemas: intersticios del hueso coxal, arteria femoral y codillo.

Un porcentaje importante de jamones curados es comercializado deshuesado y envasado al vacío. El proceso de deshuesado puede llevarse a cabo de formas diversas:

- Deshuesado del jamón al final del proceso y posterior envasado al vacío.
- Deshuesado durante el secado, efectuando después un baño con película plástica protectora para facilitar el secado del jamón de una forma más rápida y uniforme. En este caso el deshuesado debe efectuarse cuando la sal se ha repartido de forma uniforme en el jamón.
- Deshuesado parcial antes del salado y se finaliza en el secado, usando también película plástica protectora.
- Deshuesado total antes del salado.

La comercialización del jamón envasado al vacío presenta ventajas de aprovechamiento de la pieza, facilidad de loncheado, evita el secado excesivo durante el almacenaje y los problemas de parásitos. Posteriormente el jamón puede ser prensado y moldeado para obtener una mejor presentación comercial.

Bibliografía

1. Arnau, J. (1991). Contribución a la calidad tecnológica del jamón curado elaborado por procesos acelerados. Tesis. Universidad Autónoma de Barcelona.
2. Arnau, J., Guerrero, L., Maneja, E. and Gou, P. (1992). Effect of pH and genetics on texture characteristics of dry cured ham. 38th ICoMST 2, 229.
3. BOE (9-3-1985). Lista positiva de aditivos para uso en la elaboración de salazones cárnicas curadas o no 59, 6022.
4. BOE (1-6-1983). Reglamentación técnico-sanitaria para la obtención, circulación y venta de la sal y salmueras comestibles.
5. Guerrero, L., Arnau, J. und Garriga, M. (1991). Rohschinkenherstellung: Rohstoff-Qualitätskontrolle als Massnahme zur Minderung der Verluste. Fleischwirtsch. 71 (9), 962.
6. Guerrero, L., Arnau, J., Maneja, E. and Gou P. (1992). Influence of the pH of meat on certain sensorial characteristics of dry cured ham. Advances in Sensory Food Science. Rose Marie Pangborn Memorial Symposium. Järvenpää. Finlandia. B. V. 82.
7. Leistner, L. (1985). Allgemeines über Rohwurst und Rohschinken. In: Mikrobiologie und Qualität von Rohwurst und Röhschinken. Bundesanstalt für Fleischforschung. Kulmbach.
8. Lengs, J. (1986). Meat processing: cured products. 32nd Europ. Meet. Meat Res. Wrks. Ghent. pp. 289.

-
9. Maggi, E., Bracchi, P. G. e Nardelli, S. (1987). Condizione PSE-III: Utilizzazione alimentare della carne, direttamente e dopo trasformazione. *Ind. Aliment.* **254**, 1012.
 10. Newton, K. G. and Gill, C. O. (1981). The microbiology of DFD fresh meat: A review. *Meat Sci.* **5** (3), 223.
 11. Parolari, G., Rivaldi, P., Leonelli, C., Bellatti, M. e Bovis, N. (1988). Colore e consistenza del prosciutto crudo in rapporto alla materia prima e alla tecnica di stagionatura. *Ind. Conserve* **63**, 45.
 12. Poma, J. (1980). Etude de quelques facteurs influençant la fabrication des jambons secs. *VPC* **1** (5), 21.
 13. Poma, J. (1992). La phase de repos dans la fabrication du jambon sec. *VPC* **13** (2), 55.

Evolución de los parámetros microbiológicos del jamón curado

Enrique Hernández¹* y Tomás Huerta²

¹ Departamento de Biotecnología. ETSIA. Universidad Politécnica. Camino Vera, s/n. 46022 Valencia.

² Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Valencia.
46100 Burjassot (Valencia).

Summary

The main microbiological and physico-chemical parameters in dry-salted ham previously selected were determined along the elaboration process. All determinations were performed at 2 levels: surface and internal. All bacterial groups showed a similar behaviour, increasing along the first stages up to the third month of drying, then decreasing to numbers similar to the initial ones. Only the halotolerants maintained fairly high numbers during last stages. Some groups were almost absent at internal levels. The hazardous bacteria showed different behaviour: whereas the faecal streptococci were fairly abundant during the whole study, coliforms almost disappeared at the final stages.

During the elaboration process at different stages of ripening they were analysed in order to know the moulds population at surface level. *Aspergillus* and *Penicillium* were the dominant genera. The latter, mainly represented by 10 species, dominated during the first stages of elaboration. *Aspergillus* was present throughout the whole making process. The *glaucus* group was clearly dominant at the final stages due to the low a_w values together with the high NaCl percentages. *Aspergillus halophilicus* was the most abundant species identified (18%) and the most frequently isolated at the final stages.

Key words: dry-cured ham, microbial populations, physico-chemical parameters.

Resumen

Durante el proceso industrial de elaboración de jamones de largo curado se han estudiado los parámetros físico-químicos y microbiológicos más representativos. Todas las determinaciones se realizaron en 2 niveles: superficial e interno. Todos los grupos microbianos determinados muestran una evolución similar, incrementándose durante las primeras etapas hasta el tercer mes de secado, disminuyendo hasta cifras similares a las iniciales. Solamente el grupo halotolerante alcanza y mantiene cifras elevadas durante las etapas finales del proceso. Algunos grupos presentan valores muy bajos a nivel interno. Los microorganismos relacionados con la salud muestran diferentes evoluciones. Los enterococos fueron abundantes en todo el proceso, mientras que el grupo coliforme desaparece en las etapas medias del secado.

(*) A quien debe dirigirse la correspondencia.

Igualmente a lo largo de todo el proceso de elaboración se ha analizado la micoflora. Los géneros dominantes son *Aspergillus* y *Penicillium*. Los demás sólo están representados por pocas especies (10), predominando en las etapas iniciales. *Aspergillus* está presente en todo el proceso de elaboración. El grupo *glaucus* es el mayoritario en las últimas etapas del curado debido a los bajos valores de la a_w y elevado contenido en NaCl. *Aspergillus halophilicus* es la especie mayoritaria (18%) y la predominante en estas etapas finales.

Introducción

Uno de los procedimientos ampliamente utilizados para la conservación durante largo tiempo de la carne y derivados cárnicos es el salado y posterior deshidratación. Son numerosos los derivados del cerdo que se someten a este tratamiento, mostrando características diferentes que dependen del proceso utilizado y de la región de elaboración. Entre éstos podemos citar a embutidos secos (salami, coppa, Danewurst, Rohwurst), bacon y jamones curados (Country Style hams, Italian hams). En España se encuentran gran cantidad de derivados del cerdo curados (salchichón, fuet, chorizo) y de entre ellos los jamones se consideran como un producto de alta calidad y de un considerable valor económico.

El jamón se puede considerar como una pieza del cerdo comprendida por los músculos y huesos de la extremidad posterior. En España se consumen aproximadamente 20 millones de jamones al año, que corresponden a un 32% del total de los derivados cárnicos curados, siendo el 50% de los jamones frescos los que se someten a salazón. Los cerdos sacrificados corresponden a 2 tipos: blanco e ibérico. Actualmente el cerdo blanco y sus híbridos representan el 95% de los sacrificados.

El proceso de elaboración del jamón presenta una serie de particularidades que condicionan los variados tipos de jamones producidos. Sin embargo, el proceso de elaboración está basado en el mismo principio. En los estados iniciales el cloruro sódico es el ingrediente mayoritariamente empleado, conjuntamente a otras sales, como son nitratos, nitritos y azúcares. El tipo y cantidades conjuntamente con el proceso industrial condicionan la gran variedad de jamones.

Tipos de jamones

Dentro de la geografía española encontramos grandes variedades de jamones, que se pueden clasificar en:

Jamones procedentes de cerdos blancos. Híbridos de las razas Pietrain, Landrace, Large White, Duroc o mezclas de ambas: jamón de Trévez (Granada), jamón de Teruel, jamón de Burgos, jamón andorrano, jamón riojano, jamón murciano.

Jamones procedentes de cerdos negros de raza Retinta ibérica o variantes de ella. Jamón ibérico (Huelva, Badajoz, Salamanca), jamón de Montánchez (Cáceres), jamón de Piornal (Cáceres), jamón de Avila.

Estos jamones presentan variaciones marcadas, tanto en el aspecto externo como en el organoléptico. El aspecto externo varía con el corte del pernil y el proceso de preparación. Los jamones de raza ibérica presentan pata o pezuña y en los de raza blanca suele estar cortada a la altura del corvejón. Las características organolépticas vienen determinadas por la raza, alimentación del cerdo, proceso de salazón y por las condiciones industriales del secado.

Proceso de elaboración

Una vez que los jamones han sido separados de la canal y han sufrido el «rigor mortis», se someten a la fase de presalado.

Se clasifican por tamaño y se seleccionan aquellos jamones que presentan un pH comprendido entre 5,6 a 6,2. Un ligero masaje desde la extremidad posterior hacia la parte magra elimina la mayor cantidad de sangre extravasada que podría favorecer el desarrollo posterior de microorganismos causantes de alteraciones. Este presalado se realiza en cámaras a bajas temperaturas próximas a la sala de salado.

Salado

Se realiza preferentemente con sal marina gruesa adicionada o no de sales curantes, preferentemente nitrato sódico o potásico y nitrito sódico. La inclusión de nitratos (0,8 %) frente a nitritos se prefiere en aquellos jamones que van a sufrir un curado microbiano, ya que la flora microbiana presente en el jamón reducirá aquéllos. El salado puede constar de un fregado con las sales curantes y posterior apilado, alternando capa de sal con jamones en cámaras a 1-3° C con humedades relativas de hasta el 99 %. El tiempo de salado fluctúa de 2 a 3 días por kilo de peso, aunque la tendencia actual es de hasta 1 día por kilo de peso.

Reposo

Finalizado el salado, los jamones se trasladan a la sala de reposo, donde tras un ligero desalado superficial, mediante agua por aspersión, son colgados de la extremidad posterior separados unos de otros. Las condiciones generales del reposo son: temperatura de 1 a 3° C; humedades fluctuantes con tendencia a la reducción desde el 95 al 80 %, con un tiempo que oscila entre 35 a 42 días. Durante esta etapa se consigue que la sal introducida durante el salado se uniformice en el seno del jamón, así como una ligera reducción de la actividad acuosa del producto. Un buen reposo asegura una marcada viabilidad del producto por inhibición de la flora microbiana presente en los paquetes musculares internos.

Curado-secado

Tras el reposo, los jamones, lavados o no, se trasladan al secadero, donde sufren la deshidratación con unas condiciones que están en dependencia con el tiempo de curado a que se someten los jamones. Así existen jamones de curado rápido (4 a 7 meses de secado, reducción de peso de un 25 %) y jamones de largo curado (12-24 meses en cerdo blanco y hasta 36 meses en cerdo ibérico, con mermas de hasta 45 %). La temperatura en los primeros meses del secado es baja, 8 a 10° C, aumentando paulatinamente en las etapas finales, pudiendo alcanzar hasta 30° C. La humedad es fluctuante, aunque preferentemente es elevada, 80 a 60 % en el final del proceso de deshidratación.

Las características de la materia prima, así como las particularidades de cada elaboración, condicionan la implantación y evolución de los distintos grupos microbianos. Para este estudio se ha seleccionado una empresa de la Comunidad Valenciana, donde se han seleccionado 1.600 jamones con las siguientes características: peso entre $8,9 \pm 0,5$ kg; pH, 5,8 a 6,0, y temperatura, $4,8 \pm 0,5$ ° C. De todos ellos, 26 jamones han sido sometidos a controles físico-químicos y microbiológicos.

TABLA 1
VALORES MEDIOS DE LOS PARAMETROS FISICO-QUIMICOS DEL JAMON DURANTE
LA ELABORACION. LOS VALORES SON MEDIAS DE LAS MUESTRAS
CORRESPONDIENTES A 5 JAMONES

Sg	Días	pH		T		Humedad %		Sal %		Nitratos ppm		Nitritos ppm		a _w		l.w.
		S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	S	I	
		I ^a	0	5,83	6,11	4,9	4,6	76,36	74,54	0,2	0,2	—	—	—	—	
II	3	6,04	6,10	3,2	3,1	69,36	74,19	5,26	0,56	301,04	26,65	5,76	5,10	0,919	0,955	-1,97
	12	5,95	6,20	3,0	3,0	65,25	73,89	9,11	0,79	249,43	63,82	20,03	6,60	0,880	0,953	-4,30
III	21	6,31	6,10	2,8	3,0	64,30	71,91	7,16	1,72	231,79	77,27	26,76	18,17	0,898	0,946	-6,60
	35	6,17	6,20	2,9	3,0	61,12	69,85	6,10	2,36	190,80	83,10	30,19	19,12	0,905	0,940	-9,31
IV	15	5,96	6,18	7,7	7,9	59,16	66,71	7,21	3,61	186,60	80,12	60,16	30,10	0,892	0,930	-11,43
	30	6,05	6,12	7,9	8,0	55,36	64,31	7,75	4,36	190,10	86,42	63,72	31,17	0,880	0,922	-15,83
	60	6,00	6,20	9,3	9,2	53,16	62,08	7,90	5,12	180,49	95,65	43,20	30,08	0,875	0,914	-21,36
	90	6,10	6,20	12,1	12,0	50,33	61,39	7,70	5,51	183,46	84,10	38,67	24,18	0,872	0,911	-25,56
	120	6,20	6,30	14,2	14,0	49,78	58,18	7,31	5,33	178,66	75,78	25,77	14,66	0,876	0,909	-29,06
	180	6,10	6,20	16,3	16,2	46,71	56,39	7,70	5,57	183,13	88,75	19,83	14,12	0,865	0,906	-32,69
	240	5,90	5,90	15,7	16,0	43,60	54,39	7,87	6,15	190,26	96,80	12,03	10,10	0,855	0,897	-35,59
	300	5,80	5,90	16,0	15,9	41,70	49,73	7,12	6,30	153,96	98,90	7,12	8,12	0,861	0,889	-37,70
	360	5,80	5,90	18,0	17,7	40,80	46,66	7,21	6,41	160,03	101,16	5,94	5,80	0,857	0,882	-41,33
\bar{X}		6,01	6,11	9,5	9,5	55,51	63,15	6,82	3,85	184,26	75,61	25,62	15,68	0,886	0,925	-19,48
SD		0,15	0,13	5,7	5,6	10,85	9,23	2,13	2,30	65,49	28,74	19,99	10,14	0,031	0,031	4,25

Sg: Etapa. T: Temperatura. a_w: Actividad de agua. l.w.: Merma. S: Superficial. I: Interno. I^a: Presalado. II: Salado. III: Reposo. IV: Curado. \bar{X} : Media. SD: Desviación típica.

cos a lo largo del proceso de elaboración. Se han estudiado 2 niveles: superficial entre 0,2 y 0,4 cm de la superficie e interno entre 5 y 8 cm de la superficie, eliminando la fracción grasa (8).

Parámetros físico-químicos

En la Tabla 1 se exponen los resultados de los diferentes parámetros físico-químicos. El pH tiene una marcada influencia en la posterior evolución del producto. Valores entre 5,5 y 6,0 son considerados óptimos; por el contrario, valores superiores a 6,0 pueden tener desagradables consecuencias no sólo desde el punto de vista organoléptico, sino en el microbiológico.

En nuestro estudio (12) sólo el 37,75 % de las muestras presentan un valor de pH antes del salado adecuado. Por el contrario, la temperatura no alcanza valores superiores a 6° C. El pH sufre ligeras variaciones a lo largo de la elaboración no sólo a nivel superficial, sino interno, manteniéndose entre 5,8 y 6,2.

Durante el salado, reposo y curado los valores medios de la humedad reflejan una disminución de 5,88, 9,96 y 31,72 %, respectivamente. La reducción final de la humedad alcanza valores entre el 40 y 60 %, considerablemente más elevados que en la mayoría de los jamones italianos (7) y en los jamones americanos (2). El valor del cloruro sódico muestra un constante incremento en la superficie tras el salado hasta cifras de 9,11 %. Esos valores superficiales descienden en el reposo hasta cifras de un 7 %. A nivel interno, el incremento del contenido en sales es moderado, alcanzando en las etapas finales 6,41 %, frente a 7,21 % en la superficie.

La inclusión de 0,8 % de nitratos supone que en la fase de salado el contenido de sales sea

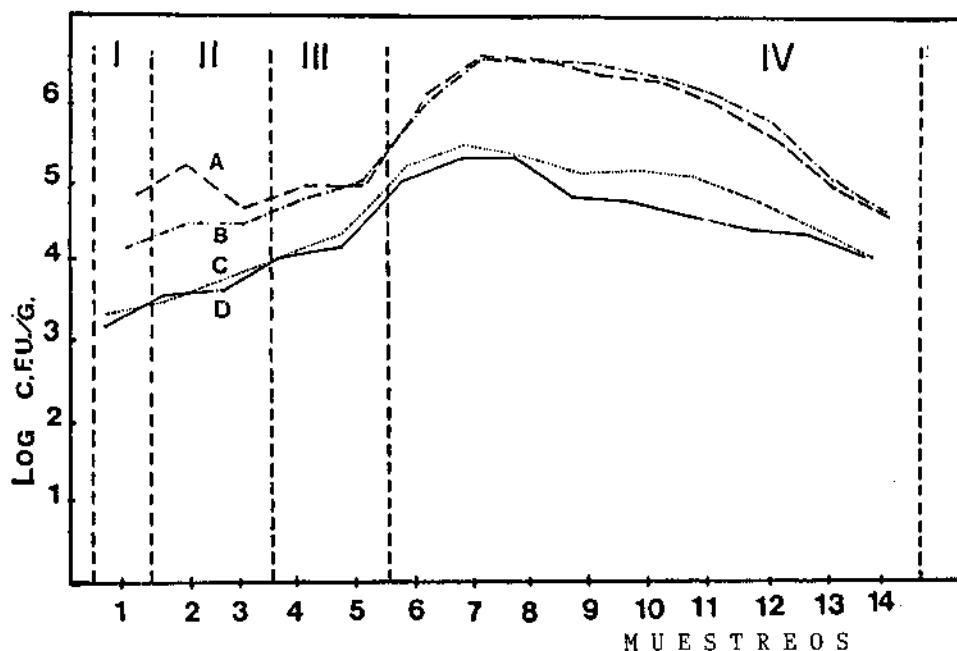


Fig. 1. Recuentos microbianos en jamones durante su elaboración. A: Aerobios totales en superficie. B: Halotolerantes en superficie. C: Halotolerantes en profundidad. D: Aerobios totales en profundidad. I: Presalado. II: Salado. III: Reposo. IV: Curado.

elevado en superficie, oscilando entre 301 ppm al inicio y 160 ppm al final del proceso. Los valores internos alcanzan 26,65 ppm en el salado hasta 101,16 ppm al final del proceso. El contenido en nitritos, presentes por reducción microbiana, muestra una evolución hasta 63,72 ppm en el primer mes de secado, descendiendo hasta valores menores de 6 ppm al final del proceso. La actividad acuosa muestra un claro descenso durante todo el proceso de elaboración. Valores finales de 0,857 y 0,882 son los encontrados en superficie e interior del jamón una vez finalizada su elaboración. Silla *et al.* (21) encuentran valores similares en jamones españoles procedentes de cerdo blanco. La merma de peso alcanza valores de hasta el 40 %, muy superiores a los reseñados en jamones italianos y americanos (14, 22).

Parámetros microbiológicos

Las Figuras 1-3 reflejan las evoluciones de los principales grupos microbianos investigados. Los grupos (aerobios totales, halotolerantes, bacterias ácido-lácticas y levaduras) incrementan su número en la segunda y tercera etapas, alcanzando un máximo al inicio del curado. Desde el cuarto mes de curado reducen su número hasta el final del proceso, con valores muy similares a los del inicio. Los recuentos de aerobios totales y halotolerantes muestran una dinámica similar, aunque en el nivel interno se encuentran rebajados en una unidad logarítmica. En relación a la flora ácido-láctica, las diferencias entre un nivel y otro son de 2 unidades logarítmicas, menores en el nivel interno. Estudios similares en otros países han revelado que las condiciones especiales de este proceso son las responsables del bajo número de bacterias ácido-lácticas en jamones curados; en algunas ocasiones no son detectadas (7, 14). En nuestro estudio, a nivel superficial, el máximo número alcanza entre 5 y 6 unidades logarítmicas, frente a 4 unidades en los trabajos de Cantoni *et al.* (4) y 6 unidades en los trabajos de Baldini *et al.* (1), aunque estos jamones sufrieron altas

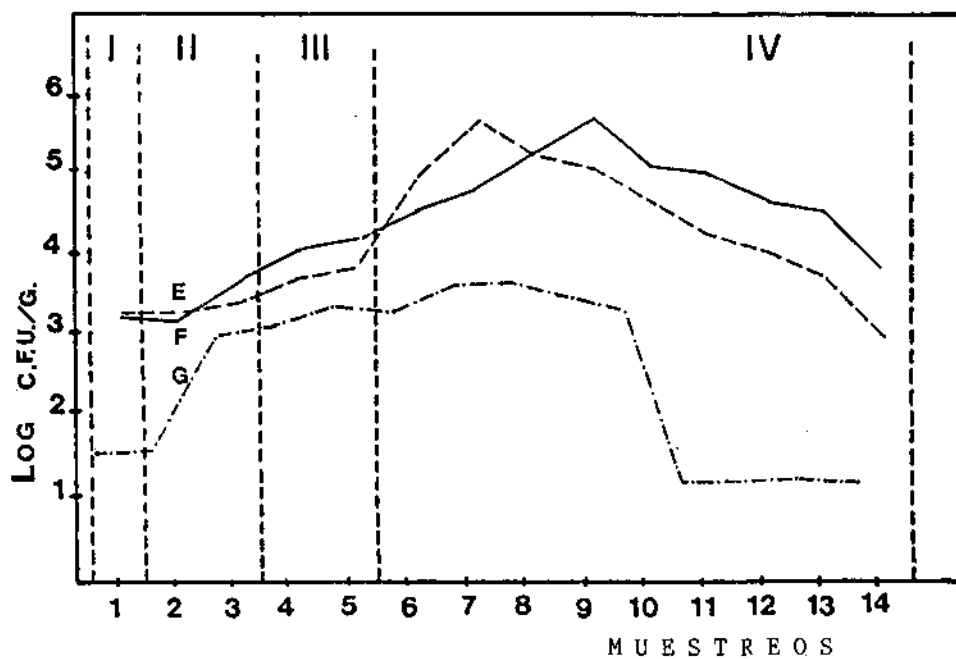


Fig. 2. Recuentos microbianos en jamones durante su elaboración. E: Bacterias lácticas en superficie. F: Levaduras en superficie. G: Bacterias lácticas en profundidad. I: Presalado. II: Salado. III: Reposo. IV: Curado.

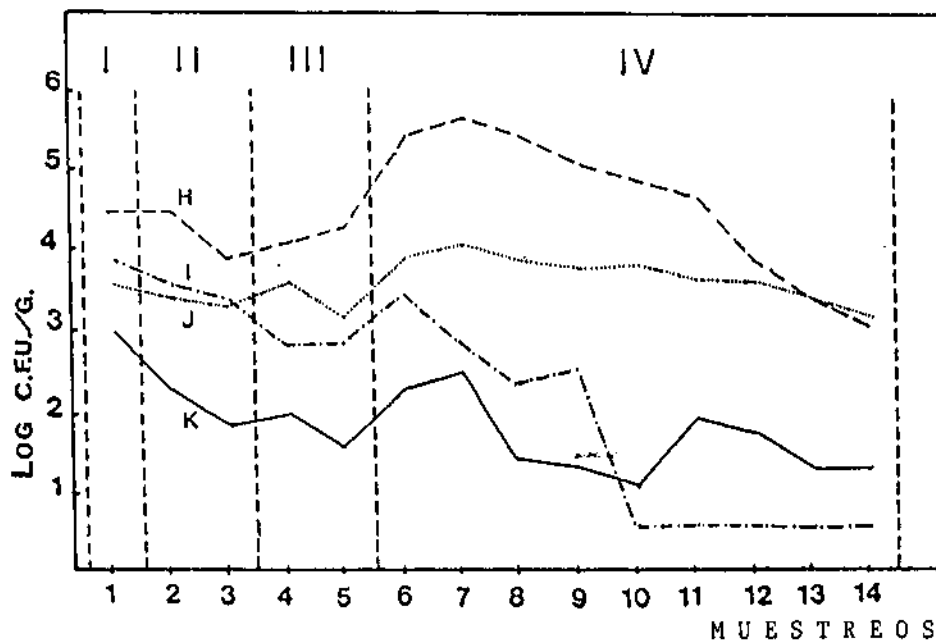


Fig. 3. Recuentos microbianos en jamones durante su elaboración. H: Estreptococos fecales. I: Coliformes. J: *Bacillus cereus*. K: Anaerobios sulfito reductores. I: Presalado. II: Salado. III: Reposo. IV: Curado.

temperaturas durante la fase de reposo. En relación a los jamones españoles, Jociles *et al.* (13) señalan valores de hasta 7 unidades logarítmicas en superficie, que descienden hasta 5 unidades en el noveno mes de secado. Indica su presencia en el interior, aunque en muy bajos números. Francisco *et al.* (6) encuentran niveles no significativos de este grupo de bacterias con valores entre 3 y 5 unidades logarítmicas. El relativo bajo número de este grupo de bacterias a niveles internos indica su bajo protagonismo en la elaboración del jamón, como ha sido apuntado por otros autores (15).

En lo que concierne a las bacterias relacionadas con la salud, no se encuentran asociadas con el jamón curado. De estos grupos microbianos, los coliformes han sido utilizados como indicadores de contaminación fecal y han sido investigados por numerosos investigadores. En nuestro estudio, valores iniciales de 10^4 mo/g descienden rápidamente durante el salado y reposo hasta cifras de 2 unidades logarítmicas. A partir del cuarto mes de curado los valores alcanzan cifras mínimas de 10 mo/g.

Representantes del género *Salmonella* no se han detectado. La razón que apoya su ausencia es que estos microorganismos se ven seriamente afectados por la baja actividad de agua a lo largo del secado y por otras condiciones desfavorables.

En la mayoría de los estudios sobre jamones, estafilococos coagulasa negativos se han detectado tras el secado (6). En nuestras investigaciones (12) no detectamos *Staphylococcus aureus* coagulasa positivos. Todos los identificados corresponden a coagulasa y DNAasa negativos, con un marcado número de micrococos a lo largo de todo el proceso de elaboración.

En relación a los enterococos es conocida su resistencia a gran número de factores, como es el cloruro sódico y las bajas temperaturas. Este grupo de microorganismos son los más abundantes de los relacionados con la salud y de ellos *Enterococcus faecalis* y *E. faecium* están identificados en todas las etapas del proceso, representando un 20 % de los enterococos. Otros autores presentan valores menores en jamones italianos (7).

Las bacterias esporuladas *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus* se detectan en bajo número, entre 10^2 y 10^3 ufc/g a lo largo de todo el proceso. Aunque estos microorganismos son teóricamente más resistentes a las condiciones adversas producidas en el proceso, especialmente la baja actividad de agua, el propio salado y el reposo actúan sobre las formas vegetativas y se reduce y previene su posterior crecimiento y esporulación durante el curado.

Mohos y levaduras

La mayoría de los derivados cárnicos que se someten a un curado permiten el desarrollo de varios grupos de mohos y levaduras a nivel superficial, siendo el objetivo de numerosos estudios (3, 5, 8, 9, 10, 11, 16). El papel de estos microorganismos en el proceso de elaboración ha sido objeto de controversias en base a sus efectos favorables o desfavorables. Algunos autores reflejan que su presencia puede ser beneficiosa en base a que contribuyen a un lento y uniforme curado, actuando como reguladores de la flora microbiana inhibiendo a microorganismos patógenos como el *Staphylococcus aureus* (18, 20). También es posible que su presencia contribuya al desarrollo de adecuadas características organolépticas. No obstante, el hecho de que algunas especies de hongos puedan producir metabolitos fúngicos apoya a que algunos autores consideren su presencia inaceptable (3, 4, 19).

Estudios enfocados a determinar el tipo de mohos son necesarios, así como el conocer las condiciones ecológicas que puedan exaltar o prevenir la producción de toxinas durante el curado. Es por ello necesario el conocer desde el inicio de la elaboración la incidencia de las poblaciones fúngicas en todo el proceso, con el fin de detectar especies toxicogénicas aisladas o en clara competencia ecológica, donde se reducirá enormemente la producción de estos metabolitos secundarios de tan clara incidencia en la salud.

TABLA 2
INCIDENCIA DE LOS MOHOS AISLADOS DE 104 MUESTRAS
DE JAMONES DURANTE LA ELABORACION

Mohos	Muestras positivas	%	Núm. de muestras positivas
<i>Aspergillus</i> spp	59	56,73	37
<i>Penicillium</i> spp	51	49,04	41
<i>Cladosporium herbarum</i>	18	17,30	9
<i>Alternaria tenuis</i>	10	9,61	6
<i>Fusarium moniliforme</i>	9	8,65	4
<i>Geotrichum candidum</i>	7	6,73	3
<i>Rhizopus nigricans</i>	5	4,80	5
<i>Micelia sterilia</i>	7	6,73	—

En relación a las levaduras, señalar que se localizan exclusivamente en el nivel superficial con niveles máximos de $5,10^5$ ufc/g al sexto mes del curado. De las especies identificadas, *Debaromyces hansenii* y *D. kloeckeri* son las más abundantes con marcada actividad lipolítica (11).

En las Tablas 2, 3 y 4 se exponen las incidencias de las diferentes especies localizadas a lo largo de todo el proceso de elaboración.

Los géneros mayoritariamente representados son *Aspergillus* y *Penicillium*, seguidos de *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Geotrichum* y *Rhizopus*. Los 2 primeros están localizados en más del 50% de los jamones muestreados. *Cladosporium* tan sólo en el 18% y los demás entre el 7 y 10%. *Penicillium* y *Aspergillus* han sido aislados en similares estudios (1), con pequeñas diferencias con respecto a su dominancia (3, 5). Así, Leistner y Ayres (16) y Cantoni *et al.* (4) señalan que *Aspergillus* es el género dominante en jamones curados, seguido de *Penicillium*.

En relación al género *Aspergillus*, el grupo *glaucus* es el dominante, con porcentajes del 18, 15 y 12% para las especies *A. halophilicus*, *amstelodami* y *chevalieri*, respectivamente. Las otras especies, a excepción de *A. niger*, nunca alcanzan porcentajes mayores del 10%.

Penicillium exhibe una elevada variabilidad de especies, dominando el grupo asimétrico frente al simétrico, que está representado por *P. purpurogenum* (14% del total de los hongos). En similares trabajos, marcadas diferencias en los porcentajes relativos a este género han sido encontradas. Dragoni *et al.* (5) señala en el 65% de los jamones italianos analizados *P. lanoso-coeruleum* y *P. frequentans*, 2 especies no detectadas por nosotros. Leistner y Ayres (16) encuentran una alta

TABLA 3
ASPERGILLUS SPP. AISLADOS DE LOS JAMONES

Grupo	Especies	Núm. de cepas	% del total de especies
<i>Niger</i>	<i>Niger</i>	6	11,53
<i>Glaucus</i>	<i>Amstelodami</i>	5	15,38
	<i>Chevalieri</i>	4	11,53
	<i>Halophilicus</i>	4	18,26
	<i>Fumigatus</i>	5	7,69
<i>Flavus</i>	<i>Flavus</i>	4	8,65
<i>Ochraceus</i>	<i>Ochraceus</i>	5	9,61
	Non identified	4	10,82

TABLA 4
PENICILLIUM SPP. AISLADOS DE LOS JAMONES

Especies	Núm. de cepas	% del total de especies
<i>Chrysogenum</i>	3	5,76
<i>Expansum</i>	2	3,84
<i>Notatum</i>	8	18,26
<i>Granulatum</i>	2	6,73
<i>Digitatum</i>	5	11,53
<i>Purpurogenum</i>	6	13,46
<i>Steckii</i>	4	8,65
<i>Cyaneofulvum</i>	3	11,53
<i>Corylophilum</i>	4	6,73
<i>Citrinum</i>	4	13,46

incidencia de *P. expansum* y *P. chrysogenum* en el 60 y 30% de los jamones analizados. También *Rhizopus*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Cladosporium* se localizan en niveles bajos en otros trabajos similares (20).

A. niger, *C. herbarum* y *R. nigricans* son especies localizadas en las primeras etapas de la elaboración (salado y reposo). Por el contrario, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *P. chrysogenum* y *P. purpurogenum* dominan en las etapas iniciales del curado. Durante el segundo mes de curado es cuando se detecta la presencia de *A. flavus*, aunque en bajo número e inconstantemente, desapareciendo totalmente durante el inicio del tercer mes de curado. En estudios similares (16) se reseña la presencia abundante de *Penicillium* en las etapas iniciales del curado. A partir del sexto mes las especies de *Aspergillus* del grupo *glaucus* son las dominantes. Este grupo soporta perfectamente las bajas a_w frente a *Penicillium* (16, 17). Además el aumento de la temperatura a partir del sexto mes aún condiciona que sea el género *Aspergillus* el dominante hasta el final del proceso. Hay que indicar que *A. amstelodami*, *A. chevalieri* y *A. halophilicus* son mucho más xerotolerantes que los otros *Aspergillus* detectados. *A. halophilicus*, uno de los más xerófilos y halotolerantes (12%), está obviamente muy influenciado por las condiciones especiales de la elaboración (curado rápido o curado largo). Leistner y Ayres (16) aíslan en las etapas finales de la elaboración de jamones curados americanos *A. ruber*. Por el contrario, en jamones italianos no se señala la presencia de *Aspergillus* xerotolerantes, debido quizá a que no alcanzan valores altos de deshidratación.

Leistner (17) asocia la presencia de *A. ruber* con una buena evolución del proceso de secado, tanto en jamones americanos como españoles. Indica que la presencia de estos *Aspergillus* no incide directamente en las condiciones organolépticas, aunque resalta que estos hongos pueden ser «indicadores» de un buen secado. Emplea el término «Bischof's cape» para reflejar el típico color violáceo presente en los jamones españoles e hipotetiza que este color es debido a *A. ruber* cuando se desarrolla en la superficie de los jamones.

Resulta interesante el reseñar que nunca hemos detectado *A. ruber* y que posiblemente se trate de otro *Aspergillus*. Además es conocido por los industriales españoles del sector que desde 1985 el mencionado color violáceo de los jamones, tanto blancos como ibéricos, ha desaparecido coincidiendo con la drástica y efectiva prohibición del ácido bórico como aditivo en los jamones.

Nosotros hemos demostrado que la presencia de ácido bórico está correlacionada con el color violeta y que realmente se trata del hongo *Aspergillus halophilicus*, dominante en las etapas finales del jamón curado (9).

Al estudiar este hongo se encuentra que además produce una marcada actividad DNásica, lipolítica y proteolítica en el 100% de los aislados, contribuyendo a eliminar microorganismos pa-

tógenos y favoreciendo las características organolépticas del producto (10). No queda muy lejana la hipótesis de que en un tiempo cercano se hable de inóculos comerciales de este hongo, que además de los efectos favorables anteriores podría ser un buen «indicador» de la presencia de ácido bórico o sus sales en los jamones.

Bibliografía

1. Baldini, P., Bernardi, E. e Raczynsky, R. (1977). Indagini sul prosciutto tipico de Parma. *Ind. Conser.* **52**, 16-26.
2. Bartholomew, D. and Blumer, T. (1977). Microbial interactions in country-style hams. *J. of Food Sci.* **42**, 498-504.
3. Bullerman, L. B., Hartman, A. and Ayres, J. C. (1969). Aflatoxin production in meats. II Aged dry salamis and aged country cured meats. *Appl. Microbiol.* **18**, 718-722.
4. Cantoni, C., Rossetti, R., Comi, G. e Damiano, E. (1982). Tossicità di insaccati crudi stagionati contaminati da *Aspergillus ochraceus*. *Ind. Alimentari.* **21**, 630-634.
5. Dragoni, I. e Cantoni, C. (1979). Le muffe negli insaccati crudi stagionati. *Ind. Alimentari.* **18**, 281-285.
6. Francisco, J., Gutiérrez, L., Mcnes, I., García, M., Díez, V. y Moreno B. (1981). Flora microbiana del jamón crudo curado. *Anal. Bromatol.* **23**, 259-272.
7. Giolitti, G., Cantoni, C., Bianchi, M. and Renon, P. (1971). Microbiology and chemical changes in raw hams of Italian type. *J. of Appl. Bacteriol.* **34**, 51-61.
8. Huerta, T. (1986). Aspectos físico-químicos y microbiológicos del jamón curado por vía seca. Tesis doctoral. Univer. de Valencia. Valencia.
9. Huerta, T., Sanchís, V., Hernández, J. and Hernández, E. (1987). Mycoflora of dry-salted Spanish ham. *Microbiol. Alimen. Nutr.* **5**, 247-252.
10. Huerta, T., Sanchís, V., Hernández, J. and Hernández, E. (1987). Enzymatic activities and antimicrobial effects of *Aspergillus* and *Penicillium* strains isolated from Spanish dry-cured hams. *Microbiol. Alimen. Nutr.* **5**, 289-294.
11. Huerta, T., Querol, A. and Hernández, J. (1988). Yeasts of dry-cured hams: Quantitative and qualitative aspects. *Microbiol. Alimen. Nutr.* **6**, 227-231.
12. Huerta, T., Hernández, J., Guamis, B. and Hernández, E. (1988). Microbiological and physico-chemical aspects in dry-salted Spanish ham. *Zentralbl. Mikrobiol.* **143**, 475-482.
13. Jociles, A., Herrero H. y Larriba, G. (1983). Evolución de la flora microbiana durante la maduración del jamón ibérico. *Res. IX Cong. Nac. Microbiol.* **469**, 997-998. Valladolid.
14. Kemp, J. and Fox, J. (1985). Effect of needle tenderization on salt absorption, yields, composition of dry-cured hams produced from Parker's style and skinned green hams. *J. of Food Sci.* **50**, 205-209.
15. Kitchell, A. and Shaw, B. (1975). Lactic acid bacteria in fresh and cured meats. *In: C. Cutting and G. Whiting (eds.), Lactic acid bacteria in beverages and foods.* Academic Press. London, pp. 209-220.
16. Leistner, L. and Ayres, J. C. (1968). Molds and meats. *Fleischw* **1**, 62-65.
17. Leistner, L. (1986). Schimmelpilz gereifte lebensmittel. *Fleischw* **66**, 168-173.
18. Mintzlauff, H. J. und Leistner, L. (1972). Untersuchungen zur selektion eines technologisch geeigneten und toxikologisch unbedenklichen schimmelpilz stammes für die roh-wurst-hertellung. *Zbl. Vet. Med.* **19**, 291-300.
19. Moerman, P. C. (1976). Prevenzione della muffa su prodotti carnei. *Ind. Alimentari* **15**, 98-100.
20. Racovita, A. und Racovita, A. (1968). Die biempfung von danewurtz mit schimmelpilzen. *Fleischw* **48**, 893-897.
21. Silla, H., Innerarity, A. y Flores, J. (1985). Características de jamones con cristales de tirosina. *Rev. Agroq. Tecnol. Alim.* **25**, 95-103.
22. Zanzucchi, A. e Molinari, C. (1965). Indagini introductive sul proceso di salagione e stagionatura dei prosciutti. *Ind. Conserv.* **40**, 222-228.

Procesos degradativos de lípidos y proteínas durante la maduración del jamón

C. López Bote*, J. J. Córdoba y T. Antequera

Tecnología e Higiene de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. 10071 Cáceres.

Summary

In the present work we review the main degradative pathways for lipids and proteins along the ripening of dry cured hams, with special emphasis on Iberian pig hams. Maximum proteolytic activity is found around the first stages (salting) and specially at the dryer. Lipolytic activity seems to be also higher in this stage. During the steps that follow the post-salting period the oxidation seems to be activated. The products from proteolytic and lipolytic processes might react among each other during the final steps in the cellar.

Key words: lipids, proteins, dry cured ham.

Resumen

A lo largo del presente trabajo se señalan las principales rutas degradativas de lípidos y proteínas durante la maduración del jamón, con especial atención al jamón de cerdo ibérico. La máxima actividad proteolítica se centra en las primeras fases y sobre todo durante la estancia en secadero. La máxima actividad lipolítica también parece centrarse en el secadero. Los valores utilizados para evaluar la oxidación indican una máxima actividad cuando comienza a ascender la temperatura después de postsalado. Los productos terminales de los procesos degradativos de lípidos y proteínas probablemente sufran reacciones de condensación durante las últimas fases de estancia en bodega.

Introducción

La elaboración de jamón crudo madurado sigue un proceso tecnológico muy peculiar, debido sobre todo al hecho de que la pieza se mantiene intacta a lo largo de todo el proceso, lo que implica una serie de aspectos de consideración que determinan en gran medida los procesos degradativos de lípidos y proteínas, como son: 1) relativa falta de oxígeno en el interior, 2) escasa contaminación microbiana (8) y, sobre todo, 3) la necesidad de que todo el intercambio de masa (agua, sal) se lleve a cabo a través de la superficie y los cambios se introduzcan en el interior de la pieza por difusión.

(*) A quien debe dirigirse la correspondencia.

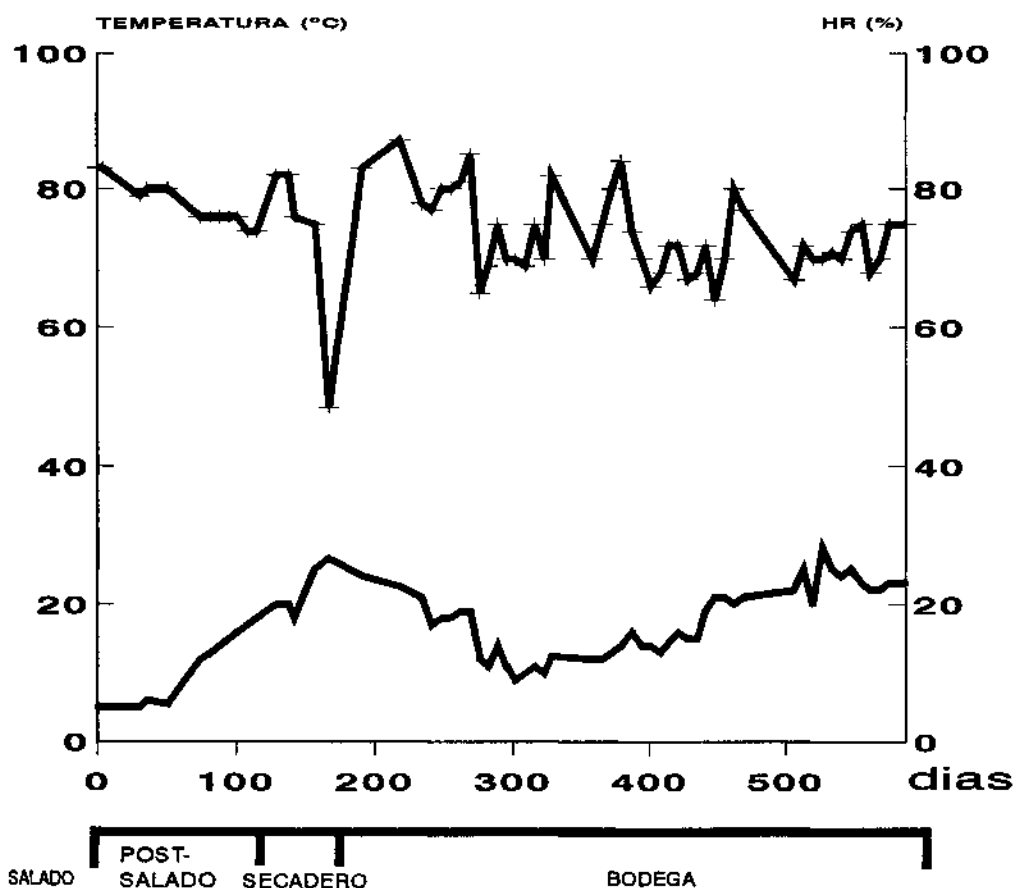


Fig. 1. Evolución de la temperatura y humedad relativa durante el período de maduración de jamones de cerdo ibérico elaborados por el procedimiento tradicional.

Debido al volumen relativamente grande de los perniles, la penetración de las sales, y sobre todo la desecación, se lleva a cabo lentamente y, por tanto, el proceso de elaboración debe prolongarse necesariamente más que en otros productos cárnicos (desde 5 hasta 24 meses). Durante períodos relativamente largos las condiciones en el interior de la pieza mantienen un contenido acuoso elevado y poca concentración de sales.

Al observar el cambio de actividad del agua se puede ver, por ejemplo, que en los músculos superficiales inmediatamente después del postsalado el valor es inferior a 0,90, mientras que en el interior es todavía superior a 0,97. Otro tanto se puede decir si observamos la concentración de ClNa (4).

Además, a diferencia de otros productos cárnicos, en la mayoría de los jamones crudos madurados elaborados en España no se añade nada más que NaCl y sales nitrificantes. La carencia de hidratos de carbono en el interior de las piezas hace que el pH se mantenga relativamente estable a lo largo de todo el proceso de elaboración, con valores próximos a 6.

La interpretación de los fenómenos degradativos de lípidos y proteínas se encuentra muy dificultada, precisamente porque el largo proceso de elaboración impide la monitorización de hechos aislados. Por ello existe una discusión permanentemente abierta sobre el protagonismo que tienen los distintos factores que concurren y su influencia en la calidad del producto final. Entre

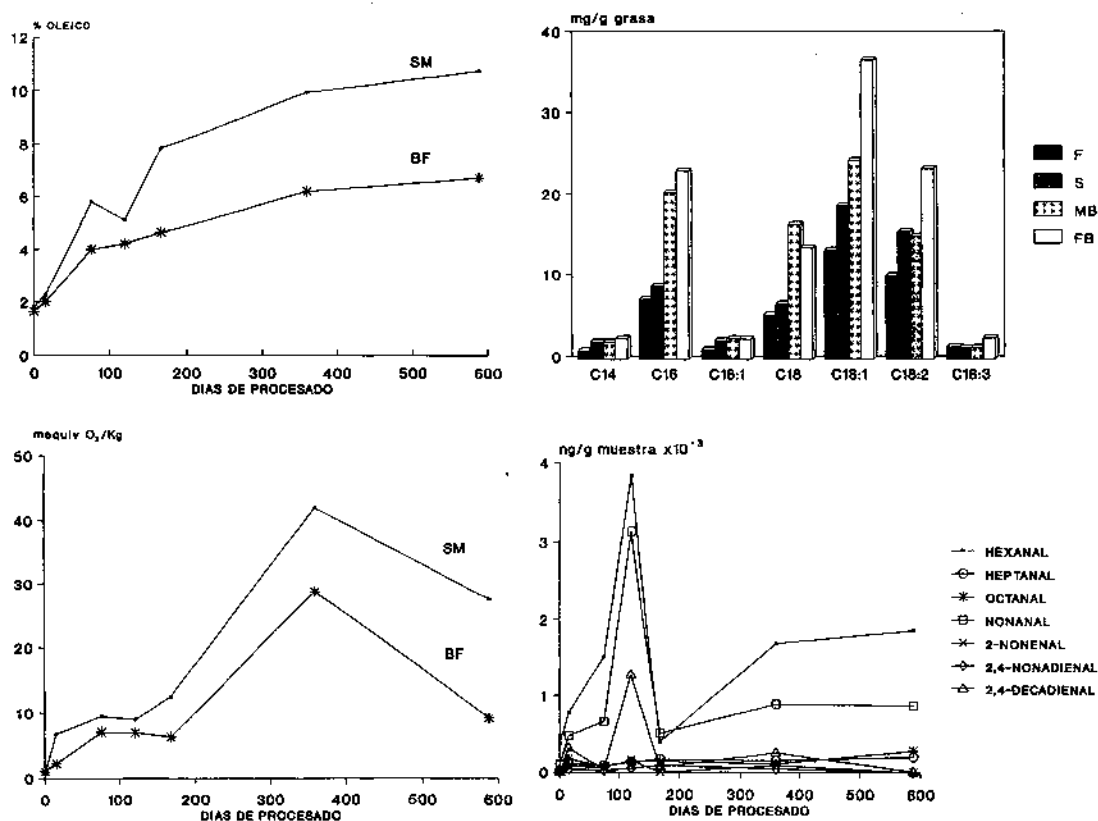


Fig. 2. Procesos degradativos de lípidos a lo largo de la maduración de jamones de cerdo ibérico. Evolución del: A: Grado de acidez expresado como porcentaje de ácidos oleicos. B: Concentración de ácidos grasos libres. C: Índice de peróxidos. D: Concentración de aldehídos en el *Biceps femoris*. (Sm: Semimembranosus. BF: *Biceps femoris*. F: Materia fresca. S: Final de salado. MB: Media bodega. FB: Final de maduración en bodega.)

ellas quizá el debate más generalizado sea la discusión del papel de las reacciones de tipo físico-químico (difusión de oxígeno, migración del agua, oxidación de lípidos o de pigmentos musculares, condensaciones, etc.) frente a la actuación de enzimas endógenas y microbianas a lo largo del procesado.

A todo ello contribuye también la escasez de información científica sobre los fenómenos que tienen lugar.

Nuestro principal interés se ha centrado en el jamón de cerdo ibérico, uno de nuestros productos cárnicos más característicos y de importancia económica creciente (no en vano ya se elaboran más de 1.700.000 piezas al año, frente a los 21.000.000 de piezas de jamón blanco) y que se caracterizan por poseer unas cualidades organolépticas excelentes. Por ello la mayor parte de los datos que se discuten en este trabajo se centran en jamones de cerdo ibérico.

Realmente el sistema de procesado en las primeras etapas no es muy diferente del característico utilizado para jamón blanco, aunque los períodos son más prolongados.

La principal diferencia con otro tipo de jamones, al margen de la propia materia prima, se debe a que en este caso no termina el proceso cuando se consigue la estabilización de la pieza, sino que se prolonga durante 12 ó 18 meses en bodega.

Los datos de temperatura y humedad relativa a lo largo de la maduración se muestran en la Figura 1.

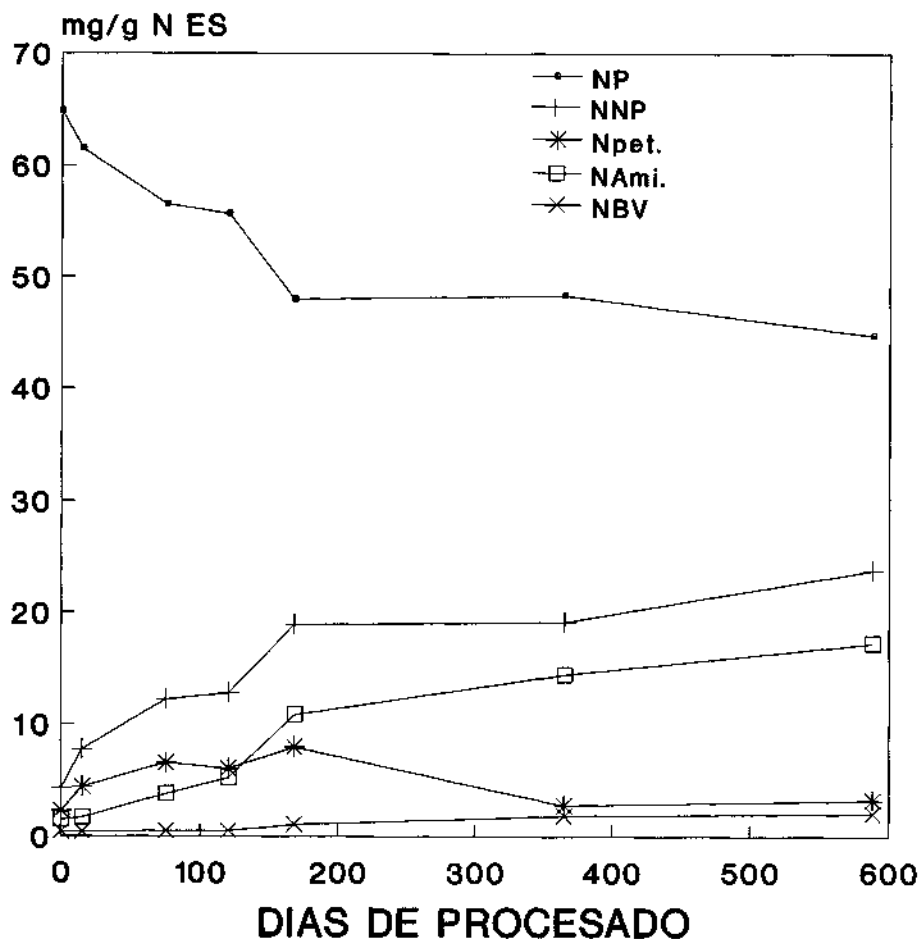


Fig. 3. Evolución de nitrógeno proteico (NP), nitrógeno no proteico (NNP), nitrógeno aminoacídico (NAmi.), nitrógeno peptídico (Npet) y del nitrógeno básico volátil (NBV) a lo largo de la maduración en músculo *Biceps femoris* expresado como miligramos de nitrógeno/g de extracto seco.

Por lo que hace referencia a los procesos degradativos de grasas (Fig. 2), en líneas generales las primeras etapas del proceso de elaboración se caracterizan por una considerable actividad lipolítica, medida por el índice de acidez. En el músculo *Biceps femoris* de cerdos ibéricos la acidez pasa de 1,64 en la materia prima a 3,98 a mitad del postsalado. Los ácidos oleico y linoleico son los principales ácidos grasos insaturados liberados. Cuando la fase de postsalado avanza, concurren una serie de factores que favorecen los procesos oxidativos, por lo que los ácidos grasos antes liberados se convierten en los substratos preferentes de la oxidación, como así lo revelan la estabilización e incluso descenso del índice de acidez y la formación de abundantes aldehídos, donde además predominan los derivados del ácido oleico (C_9 ; C_8 ; C_7) y los del ácido linoleico (C_6 ; $2,4-C_{10}$; $4-C_9$; $2-C_9$).

Sin embargo, la autooxidación entra en una fase de terminación y prácticamente se detiene cuando la temperatura sube y se extreman las condiciones de desecación (7). La evolución del índice de peróxidos revela un aumento en las primeras fases (pasa de 1,05 a 7,09 a mitad del postsalado) y una estabilización posterior, ya que al final del secadero es sólo de 6,34. También la concentración de aldehídos disminuye en secadero.

En los casos en que se prolonga el ciclo con una maduración en bodega, la lipólisis continúa y vuelven a activarse los fenómenos oxidativos. Cuando los jamones llevan 6 meses en bodega el índice de peróxidos alcanza su valor más elevado (28, 72). Todo ello facilita la formación de una gran cantidad de compuestos volátiles (2).

Al final de la estancia en bodega el contenido en carbonilos de nuevo desciende. En este caso parece que se repiten las condiciones antioxidantes del secadero, aunque en esta ocasión la estabilización de la pieza es mucho más acentuada, como lo demuestra la acumulación de ácidos grasos insaturados ($C_{18:1}$ y $C_{18:2}$) y el descenso de los carbonilos. Además de la propia paralización de las reacciones oxidativas, este descenso se puede deber, al menos parcialmente, a reacciones secundarias de los mismos, principalmente de condensación, que conducirían a la formación de aldehídos de Strecker, ésteres, lactonas, etc., cuya presencia ha sido puesta de manifiesto en el producto final (9). Estas reacciones se verían favorecidas por la baja disponibilidad de agua y por el aumento de la temperatura en los 3-4 últimos meses del procesado, debido a que aunque el jamón se encuentre en la bodega, la temperatura sube como consecuencia de la llegada del verano. Por una parte se ha sugerido un papel en la génesis de compuestos con capacidad antioxidante derivados de reacciones tipo Maillard entre compuestos amino de aminoácidos libres y grupos carbonilo de aldehídos, lo que podría explicar la mayor estabilidad de las grasas frente a la oxidación durante las últimas etapas del procesado de jamones madurados en bodega (3). La posible génesis de compuestos con actividad antioxidante por rutas químicas cuestiona el papel que se atribuía a ciertos mohos en la estabilización de las grasas insaturadas en el jamón de cerdo ibérico durante la maduración en bodega.

Las reacciones de condensación también deben desempeñar un papel esencial en el «afinado» final del jamón, a juzgar por la falta de aroma (que los industriales reconocen como «falta de bodega») que acarrea el acortamiento de la maduración de 18 meses a 12 ó 15.

Por lo que respecta a los componentes nitrogenados (Fig. 3), distintos estudios evidencian una importante hidrólisis proteica que se traduce en un fuerte incremento del nitrógeno no proteico (NNP), que llega a representar un 25-27% del nitrógeno total en el producto acabado. La extensión y profundidad de la proteólisis puede seguirse a través de las distintas fracciones del NNP, que revelan la formación de péptidos en las primeras fases y de aminoácidos libres en las finales (sobre todo en las que transcurren a mayor temperatura: secadero y final de bodega). Los aminoácidos libres son el principal producto de la proteólisis (entre el 75-80% del NNP).

Los aminoácidos mayoritarios en el producto final, de acuerdo con estudios de Córdoba *et al.* (4) y De Prado (6), son ácido glutámico, leucina, alanina y lisina. En general la proporción de aminoácidos libres al final de la maduración es similar a la existente en proteínas musculares. No obstante, algunos aminoácidos se encuentran en proporciones diferentes a las existentes en las proteínas del músculo. Entre ellos destacan el ácido aspártico, arginina e histidina, que se encuentran en proporciones superiores en las proteínas musculares o el triptófano, que siendo minoritario en las proteínas del músculo se encuentra en una proporción elevada al final de la maduración. Estas diferencias podrían deberse a la acción de microorganismos que pueden transformar el ácido aspártico en lisina, la arginina en putrescina y el ácido glutámico en prolina o producir algún aminoácido como metabolito final de alguna de sus rutas metabólicas, como es el caso del triptófano (1, 5).

Por otra parte, otros aminoácidos, como isoleucina, valina, fenilalanina, histidina, asparagina y glutamina, cuya concentración incrementa considerablemente en las primeras etapas del procesado, lo hacen sólo de forma moderada en la etapa de bodega. Este fenómeno puede deberse a la posible reacción de estos aminoácidos con aldehídos (vía degradación de Strecker) para formar otros compuestos volátiles (10). En el jamón de cerdo ibérico se han encontrado determinados carbonilos volátiles (3-metilbutanal, 2-metilbutanal, fenilacetaldehído) en los que pueden actuar como precursores algunos aminoácidos libres (9).

Al igual que los aminoácidos libres, las aminas aumentan a lo largo de la maduración, siendo las mayoritarias en el producto acabado la putrescina, histamina y éispermina. No obstante, esta última mostró un descenso considerable a lo largo del proceso madurativo, lo que también puede estar relacionado con la actividad microbiana.

También es interesante señalar que se han encontrado algunos ésteres en la fracción volátil en jamones de cerdos ibéricos, lo que se puede relacionar con cierta actividad microbiana (9).

Los datos existentes referente a los procesos degradativos de lípidos y proteínas a lo largo del proceso de elaboración del jamón muestran distintos argumentos que permiten suponer una actuación microbiana de cierta magnitud, aunque la influencia en la característica del producto final está aún por dilucidarse.

Bibliografía

1. Abdelal, A. T. (1979). Arginine catabolism by microorganism. *Annu. Rev. Microbiol.* **33**, 139-168.
2. Antequera, T. (1990). Evolución del componente lipídico durante la maduración del jamón ibérico. Edit. Servicio Publicaciones de la Universidad de Extremadura. Cáceres.
3. Antequera, T., López-Bote, C., Córdoba, J. J., García, C., Asensio, M. A. and Ventanas, J. (1992). Lipid oxidative changes in the processing of Iberian pig hams. *Food Chemistry* **45**, 105-110.
4. Córdoba, J. J., Antequera, M. T., Ventajas, J., Asensio, M. A., López-Bote, C. y García, C. (1991). Transformaciones de los componentes nitrogenados durante la maduración del jamón de cerdo ibérico. *Cárnica* **2.000** **12**, 54-63.
5. Cuning, R., Glansdorff, N., Pierard, A. and Stalon, V. (1986). Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.* **50**, 314-352.
6. De Prado, C. (1988). Maduración del jamón de cerdo ibérico, fenómenos proteolíticos. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de León.
7. Flores, J., Nieto, P., Bermell, S. y Millares, M. C. (1985). Cambios en los lípidos del jamón durante el proceso de curado lento y rápido, y su relación con la calidad. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* **25**, 117-124.
8. Francisco, J. J., Gutiérrez, L., Menes, I., García, M. L., Dfiez, V. y Moreno, B. (1981). Flora microbiana del jamón crudo curado. *Anal. Bromatol.* **XXXIII-2**, 259-272.
9. García, C., Berdagué, J. J., Antequera, T., López-Bote, C., Córdoba, J. J. and Ventanas, J. (1991). Volatile components of dry cured Iberian ham. *Food Chem.* **41**, 23-32.
10. Ventanas, J., Córdoba, J. J., Antequera, T., López-Bote, C. and Asensio, M. A. (1992). Hydrolysis and Maillard Reactions during ripening of Iberian ham. *J. Food Sci.* **57**, 813-815.

Biochemical and microbiological events of Parma ham production technology

Chizzolini R., Rosa P. and Novelli E.

Instituto di Scienza e Tecnologia degli Alimenti. Facolta' di Medicina Veterinaria. Universita' di Parma. Italy.

Summary

Parma ham technology relies on a few basic points. They are: a fresh meat substantially free of microbial deep contamination, a relatively long phase (up to 100 days) at cold temperatures at the beginning of processing, an uncovered muscular surface as reduced as possible, a long period of maturation. The final product, the matured ham, is the result of a slow process of dehydration which, combined with a limited penetration of salt into the muscles, lowers the water activity to values around 0,90.

Surface bacterial contamination is mainly made up by Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae. Among them *E. agglomerans* and *S. liquefaciens* are able to grow at 2° C and salt concentrations up to 7.5% and can be responsible for taint development. Micrococci penetrate into the meat during salting and can reach values of 10⁶ but decrease substantially towards the end of maturation.

Maturation, from a biochemical point of view, is characterized by hydrolytic phenomena interesting nitrogen compounds and fats. As a result free amino acids, non protein nitrogen, volatile fatty acids and carbonylic molecules are produced. Such products are important for the development of typical organoleptic characters.

Key words: Parma ham, technology, microbiology, biochemistry.

Introduction

Pig raising in the Po valley has been going on for a very long time. Archeological findings have shown that, back in the fifth century B. C., 60% of meat production was made up by pork, followed by sheep, goat and beef. Pigs were slaughtered when they were about 2/3 years old and meat was, to some extent, preserved by salting and/or smoking. Hams were certainly processed as raw, salted and dried-matured products and were subsequently exported in other areas of the ancient world as is shown by the fact that archeological sites are rather poor of hind leg bones.

A few valleys near Parma came out to be very apt to the production of raw matured hams due to their peculiar climate. The orographic structure of such areas is made up by fairly low mountains with shallow valleys forrowed by streams and run by mild winds. Average winter temperatures very rarely go under 0° C and during summer months the vary between 20 and 25° C. Air humidity is generally low, ranging from minimum values around 50%, during late spring and summer, to maximum values just above 80% during winter.

Such climatic conditions made possible the development of an empirical technology based on

winter slaughter which was followed by salting and maturing in natural conditions. The only possible control of temperature and relative humidity could come from cellars.

Pigs were raised, often in a semi-wild condition, and slaughtered at the farm. Small family conducted stock-farms appeared in relatively recent times. They were normally associated with parmesan cheese production as they made use of whey as feed. Animals were relatively old, that is between 18 and 24 months, and with an abundant fat cover.

The intense colour and the high fat content of the muscles, together with the remarkable thickness of subcutaneous fat, certainly played a crucial role in establishing the typical quality features of Parma ham. These were a stable pink colour, obtained without the use of nitrates, and a mild taste. The latter was the result of various factors such as the low salt content and the relatively high residual moisture of the lean on one side and the conspicuous inter and intramuscular fat deposits on the other.

After the second world war the development of intensive agriculture brought about and increase in pig production and the growth of industrial ways of meat processing. In the case of Parma ham, industrial processing. In the case of Parma ham, industrial processing has meant, in the first place, the establishment of artificial means to control temperature and relative humidity in cold and maturing rooms. In this way the fundamental parameters of traditional technology can be more efficiently mastered and production is possible all the year round. The latest evolution has come from the application of robotics to the manual phases of ham processing; i.e. sprinkling of salt, brushing and washing, shifting of pieces, etc.

Parma ham, is a product with a protected denomination of origin. This means that the name «Parma ham» is allowed only for matured hams produced with fresh hams of pigs born, raised and slaughtered in continental Italy, in the observance of the technology set down by the law and matured in a defined district of production. The latter is made up by the area of Parma province placed at the south of via Emilia, at a distance of at least 5 km from it, and circumscribed at the east by the river Enza and at the west by the river Stirone. Production of Parma ham is limited to areas under 900 meters of height above sea level (12).

Technology

Parma ham production begins with the live animals. This is to say that genetics is the first factor which has to be considered. The old local breeds have been definitively abandoned years ago and have been replaced by what are now considered to be traditional breeds. These are the Italian lines of Landrace and Large White. They are characterised by a high resistance to stress, a sound red colour of muscles, a low level of marbling and a fairly thick subcutaneous fat cover. Age at slaughter could vary between 10 and 12 months and liveweight would normally go from 160 kg upwards. Old breeds would not be able to reach such high weights at slaughter.

During the last few years Duroc has sometimes been introduced, as a third line with the aim of improving the performances of Landrace and Large white breeds. At present a considerable effort is being put into adapting what are known as commercial cross-breeds, such as Cotswold, Golland, Dunel, Suffolk, etc., to the needs of Parma ham production as regards lean and fat quality. The law which protects the name of Parma ham leaves to a committee, made up by representatives of the various professions having to do with Parma ham production, to lay down the rules as regards allowed breeds, raising and feeding techniques.

Up to the early sixties, pigs were mainly slaughtered in the premises of the processing factories which, in this way, had to take charge of the entire carcass. Now pigs are slaughtered in big industrial slaughterhouses which provide for the specialized trading of each cut.

Since the very early times, heavy pigs slaughter in Italy has been associated with hot cutting

of the carcasses for reasons which can be easily imagined and which were linked with the fact that pigs were slaughtered at the farm with no refrigeration facilities. Nowadays, hot cutting means that sides are reduced into primal cuts immediately after slaughter, i.e. about 45 minutes post mortem.

The hind limb is separated from the side by cutting the corpus ossii ilium on a line roughly parallel to the sacral vertebrae, half a way between the ala ossii ilium and the acetabulum. The cut is then freed from the trotter, by severing between the first and the second row of tarsal bones, and from the acetabulum («castelletto»), made up by the branches of ilium, pubis and ischium, by cleaving at the foramen obturatum. The caudal end of the ischium, called tuber ischiadicum («anchetta»), is not removed. The hams, after approximately one day of refrigeration and with an internal temperature just over 0° C, are not released for processing as such but are trimmed at the slaughterhouse.

Trimming consists of removing small parts of muscles, skin and fat so to obtain smooth and well connected surfaces. For this reason trimming can be carried out only on refrigerated material. It suits the purpose, also, of shaping the ham according to local tradition, that is in a chicken-thigh style.

The law 13.2.1990 n. 26 (12) states that the ham should be free from faults, should have a round shape and the uncovered muscular surface, at the end of maturing, should not exceed 6 cm starting from the caput femoris.

Approved hams are marked with a fire stamp holding the initials «P. P.» (Prosciutto per Parma) and the code number of the slaughterhouse. Thereafter, the hams are sorted out by weight as requested by the market. Weight classes might vary among slaughterhouses; the most important thresholds, though, are placed one around 10/10.5 kg and a second one around 13.5/14 kg. Hams with a weight lower than 10 kg, after trimming, are not suitable because the law sets at 7 kg the minimum weight of matured hams. Over 13.5 kg, or 14 kg, hams are classified as big and need to be processed in a separate way. The class 10-14 kg is sometimes divided in subclasses, although intermediate partitions of this type are more frequently made at the processing factories. After trimming the hams are dispatched. Frozen pieces are not allowed for Parma ham.

Parma ham processing can be split up in a few main stages, that is: salting, resting and maturing. Each of them is, at present, divided in subphases, which vary among the various plants. An average technology will be briefly reported.

When the hams reach the processing unit a metal seal is applied on the skin over the first line of tarsal bones. The seal has the initials C.P.P. (Consortium of Parma Ham) and the date (month and year) of beginning of processing.

It is now customary in many units to leave the hams in a chilling room for one day, prior to salting, to level off the temperature of all the pieces to values around 4° C. Higher temperatures are an obvious risk for microbiological growth, while lower ones slow down the penetration of salt into the meat.

Before salting takes place, the hams might receive a slight correction of trimming, mainly of the muscles around the caput femoris so to open up the cavity which surrounds the bone. Also, the skin is scraped with a knife to make it more flexible and the muscle mass is squeezed so to get out possible residues of blood existing in femoral and medial circumflex femoral veins.

The hams are now ready for salting which can be carried out by hands or by machine. Even in the latter case, though, salting is perfected by a skilled worker. Salt is sprinkled over the uncovered muscular surfaces and slightly moist salt is rubbed over the skin and the cut surface of the tarsal bones. Special care is taken in filling up the cavity around the caput femoris and near the caudal end of the ischium (anchetta).

In the case of machine handling, a salting line is made up of a machine which squeezes the ham to get out residual blood, a second machine which rubs the skin with cylinders, made by a

stainless steel net and full of salt, and a third machine which sprinkles the entire ham with salt. When the ham leaves the line an operator takes care of filling up with salt the cavities of caput femoris and nearby ischium.

The type of salt normally used is a medium coarse grain marine salt mixed with a limited amount of white salt. The grain is important because it affects its solubility and, consequently, the diffusion rate into the muscles.

Salted hams are introduced into chilling rooms in which the temperature is controlled so that it can vary from a minimum of about 0° C to a maximum of 4° C. In such conditions inside temperature of the ham is approximately the average value between the minimum and the maximum. Such temperatures safeguard against microbiological growth and, at the same time, allow a slow but sufficient salt solubilization and diffusion to inner parts of the hams. Relative humidity of salting rooms is also controlled so that minimum average values do not normally go under 70/75% while maximum values can vary between 85 and 90% depending on processing conditions (type of salt, weight and meat quality of the ham, load of the rooms, chilling capacity, etc.).

Salting rooms work on a cyclic basis: when the chillers operate the temperature is lowered and the relative humidity decreases due to condensing; when the chillers rest the temperature will slowly increase and relative humidity will gradually follow up due to loss of moisture from the hams. In this way hams are gradually dehydrated.

Salting is carried out in two stages. The first one lasts for about one week and is characterized by a relative humidity slightly higher than average so to make salt solubilization easier. At the end of this first week salt is brushed away, the hams are massaged to expel residual fluids from blood vessels and to favour osmotic exchanges.

A new salt cover is, then, laid on the hams. The second stage lasts for 2-3 weeks with an average relative humidity slightly lower so to begin the dehydration process. Salting is now finished. The hams are freed from residual salt, massaged and placed in cold rooms in a hanging position for what is called the resting phase. Weight loss after salting can vary from 3.5 to 5% depending on processing conditions.

Resting is a period in which the hams are stored at refrigeration temperatures to give time for the salt to diffuse uniformly in all the muscles while at the same time water is lost through dehydration and microbial growth is inhibited by the low temperature. Resting, like salting, is divided in two phases. The first one, which lasts for 1 or 2 weeks, is carried out at temperatures varying from 0 to 3 or maximum 4° C and a relative humidity ranging from 60 to 75%. The aim is that of drying out the muscular surface which has remained wet after salting. The second phase lasts for about 3 months at temperatures normally not exceeding 4° C, but which in some cases can reach 5/6° C, and with a relative humidity varying from 70 to 85%. Resting rooms, like salting ones, work on a cyclic basis so to induce a gradual loss of moisture from the muscles.

The end of resting is also the end of what is called the cold phase of Parma ham technology. Salt has diffused into the muscles, water has been drained out to obtain a final weight loss of about 13-15%, water activity has been lowered to levels around 0.95. The A_w value is not low enough to completely inhibit bacterial growth at room temperatures, it is possible, though, to allow gradual and slow temperature increases which are required for a further weight loss and, above all, for the biochemical changes responsible of maturing.

After the first resting stage, or more commonly at the end of resting, it is customary to carry out a small reduction of what remains of the ischium, to enlarge the cavity around the caput femoris and to perform a general trimming of the hams.

During resting the muscular surface of the hams is gradually covered with concretions mainly made by salt crystals originated from drying. The hams are, therefore, washed with lukewarm water so to soften and thoroughly clean muscular surfaces. Subsequently, excessive moisture is eliminated by drying in specifically dedicated rooms for about one week. Working conditions vary

from 25-28° C during the first 8 hours to 20° C, or sometimes 18° C, for the remaining time. Moisture is on average around 60%. In the old days the hams were dried by exposing them to the sun in a clear spring day.

The hams begin now the maturing phase, also called the warm phase, divided in, at least, two stages, like the previous ones. The first one lasts for 2/2.5 months at a temperature of about 16° C and a relative humidity of 70-85%. Afterwards, the temperature is raised to 17-18° C while relative humidity is around 70-80%. Working conditions, though, are not strictly controlled at this stage as the hams are normally put in cellars where temperature and relative humidity are controlled by natural means.

To slow down dehydration, at the end of the first maturing stage, the muscular surface is covered with a paste made up by pork flare fat mixed with salt and pepper. Sometimes flour is also added to the paste to make it more permeable. Weight loss at the end of maturing might vary from 23-24% to 26-27% depending on the type of the ham. Water activity is running at values around 0.90 or lower.

The higher temperature of maturing allows a complex pattern of biochemical reactions to take place, mainly hydrolytic phenomena, which are responsible for the development of the organoleptic properties of the matured ham.

Matured hams are fire stamped with the Parma ham brand after at least 10 months processing for pieces weighing between 7 and 9 kg, after at least 12 months for pieces over 9 kg while pieces under 7 kg cannot be branded. Maturing can continue, though, over 12 months if there are the conditions to do it (big or/and fatty hams, special quality products, etc.).

Microbiology

Parma ham technology does not rely on microbiological fermentations for any of its parts. The cold phase of processing is entirely dedicated to discourage any type of microbiological growth. The warm phase, carried out at temperatures which are gradually increased to not more than 18° C while *Aw* values approach the 0.90 level, is also intended not to allow the growth of microorganisms inside the muscles. Microbiological contamination of fresh meat is, therefore, seen only as a risk for a smooth flow of processing.

Slaughter and cutting of carcasses imply that the surface of meat is contaminated by various types of microflora. In normal conditions, that is in the case of correct procedures performed in compliance of good manufacturing practices, deep meat contamination is very reduced if not completely absent.

This is what has been observed in the case of fresh hams intended for Parma ham production (14). Surface microflora of fresh hams is mainly made up by Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae. The most frequently occurring Enterobacteriaceae are *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia liquefaciens* and *Citrobacter freundii*. Most of the strains belonging to the group of Pseudomonadaceae appear to be made up by *P. putida* and *P. fluorescens*. As for deep contamination, Enterobacteriaceae are normally absent and, in general, the few samples which can sometimes be found contaminated carry a mixed flora at very low levels.

The salting phase not only slows down bacterial growth in general but also causes the reduction of unwanted strains. For instance, the concurrence of low temperatures and high salt concentrations, like the ones which occur on the surface of hams under salt cover, induces a significant decrease of spoiling bacteria such as *E. agglomerans*, *S. liquefaciens* and some *Pseudomonas*. Pathogens, like *Salmonella*, *S. aureus* or sulphite-reducing *Clostridia*, normally absent on fresh meat or present in very low numbers, cannot grow at the cold temperatures of salting and resting and are overgrown by other microorganisms.

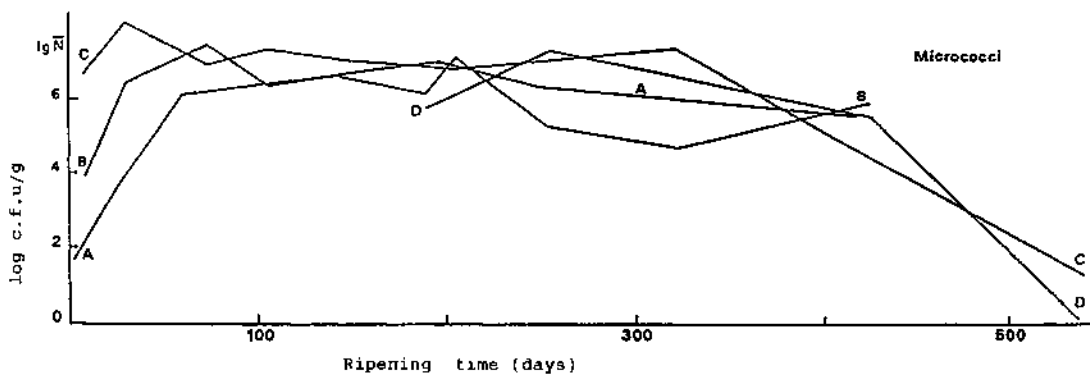


Fig. 1. Changes in the microbial events of micrococci during the Parma ham processing in four different hams (from Ref. 2).

It happens that the interior of muscles, initially sterile or nearly so, is gradually contaminated by a microflora mainly made up by Micrococci (2). The number of such bacteria increases during the cold phases (salting and resting), up to maximum values ranging between 10×5 and 10×6 per gram of tissue, and decreases towards the end of maturing to reach values between 10×2 and 10×4 or sometimes even lower (Fig. 1). The most contaminated area of the hams is always the one which surrounds the femour, a clear evidence of the importance of the femoral veins in the contamination of the hams. The exchanges between inside and outside of water and salt, by the natural ways of blood vessels and connective tissue fasciae, are the means the bacteria can use to penetrate into the meat. The repeated massaging operations facilitate such exchanges.

Bacteria in Parma ham can play a negative role as a consequence of excessive contamination of fresh meat during slaughter or/and of processing deficiencies. In this case diffused or circumscribed putrefaction can occur ending up in taints. The most common circumscribed taints are those which take place near the head of femour, underneath the tuber ischiadicum, along the femour and the tibia. Species which have been found to be associated with taint development are *S. liquefaciens*, *E. agglomerans* and *P. vulgaris*. The first two are able to grow in vitro at 2°C with salt concentrations up to 7.5%. *P. vulgaris*, instead, does not grow at $0-4^\circ \text{C}$ but can survive at such temperatures, with salt concentrations up to 6.5%, if initial contamination is high enough. It might, therefore, be in a condition to develop during the initial stage of maturation (4, 5).

As for the tuber ischiadicum (anchetta) a specific taint can sometimes occur. It is called «phenol» taint from its typical smell and appears to be due to the growth of molds inside and under the bone. This is favoured by the spongy structure of the bone which allows the emplacement of moulds belonging to the genera of *Penicillium*. The species normally found is the *P. commune*. The taint can be prevented if a saturated salt solution is maintained on the anchetta during salting

TABLE I
AVERAGE COMPOSITION OF MATURED PARMA HAMS

	Average	Range
Moisture	60.0	56.6-63.4
Proteins	25.0	22.4-27.6
Salt	5.8	4.4- 7.2
Salt/Moisture $\times 100$	9.7	7.2-12.2
Moisture/Proteins	2.4	2.1- 2.7

TABLE 2
AMINO ACID COMPOSITION AND AVAILABLE LYSINE CONTENT OF PARMA HAM
(% OF PROTEINS)

	F	S		F	S
Isoleucine	4.8	4.5	Arginine	7.3	7.3
Leucine	7.7	7.7	Histidine	5.8	5.9
Lysine	10.8	10.4	Alanine	5.3	5.4
Lysine Dispon.	10.6	10.4	Aspartic acid	8.7	8.8
Methionine	2.7	3.0	Glutamic acid	15.0	15.8
Cystine	1.4	1.4	Glycine	3.8	3.9
Phenylalanine	3.6	3.8	Proline	3.1	3.1
Threonine	4.4	4.6	Serine	4.1	4.0
Thryptophan	1.5	1.5	Tyrosine	3.5	3.5
Valine	4.5	4.5			

F: fresh; S: matured.

and a relative humidity lower than 85% is kept for the resting and maturing phases (Spotti, personal communication).

Molds of various types, mainly *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp and *Mucor* spp, are able to grow on the surface of the hams during maturation. Such a presence, though, is explicitly discouraged by the control of temperature and relative humidity and by hygienic practices. Indeed, it has been shown that the presence of molds of the *Penicillium* and *Mucor* genera, and a relative humidity higher than 85%, create the conditions for the growth of mites belonging to the Acaridae family. Among such mites the presence of *Tyrophagus putrescentiae* on matured hams was in the past considered to be normal but it has recently been greatly reduced by the adoption of a strict control on hygiene and technology (6).

Biochemistry

Parma ham technology, as outlined in the previous sections, requires that salt diffuses deeply into the meat and water is lost to the point that the product is self stable. Table 1 summarizes the main physico-chemical changes occurring. Water content falls to about 60%, proteins reach values around 25%, intramuscular fat is normally around 7% and salt is on average lower than 6%.

The process of maturation, though, is specifically characterised by hydrolytic processes which are responsible for the production of nitrogen compounds of low molecular weight and free fatty acids. Hydrolysis needs temperatures higher than the ones employed for refrigerations and has, indeed, been observed to occur only in the maturing phase (3).

The increase of non protein nitrogen and free amino acids during maturation is one of the first events which has been observed (1). The phenomenon has been ascribed to the proteolytic action of muscular cathepsins (8). Proteins, both sarcoplasmic and myofibrillar, are first denatured during the initial stages of the cold phase, whereas proteolytic breakdown takes place at the higher temperatures of the warm phase (3, 13). In standard conditions free amino acids of matured hams make up about 15% of total amino acids while non protein nitrogen is around 25% (2, 3).

Fat is also subjected to hydrolytic processes as is shown by the increase of the acidity number. The maturing stage is accompanied by an increase of volatile free fatty acids and low molecular weight organic acids in general. The appearance during maturation of carbonylic compounds, such as various aldehydes, ketones and acetyls, has been observed, as well (7).

TABLE 3
DIGESTIBILITY OF PARMA HAMS FREEZE DRIED (L)
AND FREEZE DRIED+ DIALYZED (LD)

	L	LD
F	92.9	102.3
S	91.6	101.5
R	91.5	103.3
MS	86.8	102.9
ST	86.2	101.9

F: fresh; R: rested; MS: half matured; S: matured.

Both the hydrolysis of nitrogen substances and of fatty compounds are important for the development of the typical taste and flavour. Molecules which can be important for this purpose are free amino acids and dipeptides, volatile bases, volatile sulphur compounds, organic acids such as acetic, propionic, butiric, aldehydes, ketones, etc.

In the last decade a few trials have been carried out with the aim of diminishing the salt content of pork products. In the case of Parma ham the adoption of a technology based on lower amounts of salt requires a longer cold phase to inhibit microbial growth until dehydration has reduced water activity to levels similar to those obtained with a higher salt content. It appears, though, that such a technology might result in a less intense proteolysis with negative consequences on the organoleptic characters of the matured hams. A longer warm phase is, therefore, needed to reach a sufficient level of maturation (3).

The influence of long processing technique, such as the one employed for Parma ham, on the nutritional value has also been investigated. It has been shown that vitamins of the B group are untouched by this technology (15). The same has been observed as regards essential amino acids where no changes have been shown, not even as regards the particularly labile ones such as tryptophan, cystine and available lysine (9). With special reference to available lysine, it might well be that the absence of nitrite in the salt employed for Parma ham prevents the proposed reaction between free amino groups and nitrite ions. Such a reaction would justify the decrease in available lysine observed in cured meats. Digestibility studies have been performed *in vitro* with a four enzyme method. Proteins from *Biceps femoris* of matured hams, once freed from low molecular weight compounds (e. i. <14.000 mw), have the same digestibility of proteins from fesh meat (9) (Tables 2 and 3). Such results classify Parma ham processing as one of the mildest techniques available for meat preservation.

To conclude with, colour deserves a specific mention. Typical Parma ham colour can be obtained without the use of nitrate. Old regulations, though, allowed the use of sodium nitrate; the new ones intend to forbid it.

If sodium nitrate is used the process of colour formation would be a standard one. That is; myoglobin (Fe^{++}) is oxidized to nitrosometamyoglobin (Fe^{+++}) and afterwards reduced to nitrosomyoglobin (Fe^{++}). The formation of nitrosometamyoglobin depends on the amount of nitrate added, the diffusion of the compound in the muscles and its conversion to NO. The entire process needs to occur very quickly to take advantage of the residual reducing capacity of the muscle fibers. At the end, the colour will be uniform and stable only if a sufficient quota of myoglobin has been converted to nitrosomyoglobin. In case the amount of nitrate is insufficient, or its diffusion has been too slow so that it has stopped before the entire mass has been permeated, an outer layer of deep red colour will be followed by an inner bulk of pink muscles. With the big traditional hams, therefore, the use of nitrate is not recommended.

If nitrate is not employed, as is the case of most high quality production, the colour of matured hams cannot be due to nitrosocompounds nor to native myoglobin. During salting there is a loss of muscle reducing capacity, as is shown by the decrease of SH groups (32), and myoglobin is irreversibly oxidized (16). It is thought that Parma ham colour might be due to a particular pigment originating from ferric myoglobin in which the water molecule placed at the apex is substituted by a nucleophilic ligand existing in the myoglobin molecule itself. Such a ligand could be a basic amino acid residue of globine while the water molecule would be lost as a consequence of dehydration. The development of the right pink-red colour follows the pace of oxidation linked, in turn, to the inhibition of reducing systems by NaCl. Colour development, therefore, follows the speed of salt diffusion: quicker the latter, prompter the former. Higher temperatures and longer times of maturation promote the formation of the right colour (17).

References

1. Ambanelli, G., Molinari, C. e Pezzani, G. (1969). Ricerche sulla stagionatura del prosciutto di Parma. Nota II: variazioni degli aminoacidi liberi. *Ind. Cons.* **44**, 294-295.
2. Baldini, P., Bernardi, E. P. e Raczynski, R. (1977). Indagini sul prosciutto tipico di Parma: influenza della fase di salagione sull'evoluzione dei parametri chimico-fisici e della popolazione batterica. *Ind. Cons.* **52**, 16-26.
3. Bellatti, M., Dazzi, G., Chizzolini, R., Palmia, F. e Parolari, G. (1983). Modificazioni fisiche e chimiche delle proteine durante la maturazione del prosciutto di Parma. *Ind. Cons.* **58**, 143-146.
4. Campanini, M. e Casolari, A. (1983). Studio sulle caratteristiche termiche dei germi di alterazione dei prosciutti. *Ind. Cons.* **58**, 235-237.
5. Campanini, M., Barbuti, S., Ghisi, M. e Baldini, P. (1985). Accrescimento e/o sopravvivenza a bassa temperatura di enterobatteri isolati da prosciutti crudi alterati. *Ind. Cons.* **60**, 300-303.
6. Cantoni, C., D'Aubert, S. e Giampaolo, L. (1970). L'acaro del prosciutto stagionato. *Ind. Alim.* **9**, n.° 62, 73-78.
7. Cantoni, C., Bianchi, M. A., D'Aubert, S., Renon, P. e Cerutti, F. (1970). Contenuto in acidi grassi volatili, non volatili e composti carbonilici volatili del grasso di copertura di prosciutti freschi e stagionati. *Arch. Vet. Ital.* **21**, 213-225.
8. Cantoni, C., Benatti, R., L'Acqua, V. e D'Aubert, S. (1971). Attività autolitiche e peptidasiche in prosciutti freschi e stagionati. *Ind. Alim.* **11**, n.° 83, 61-64.
9. Chizzolini, R., Dazzi, G., Parolari, G. e Bellatti, M. (1984). Modificazioni fisiche e chimiche delle proteine nella maturazione del prosciutto di Parma. III: Aspetti nutrizionali. *Riv. Soc. Ital. Alim.* **13**, 51-54.
10. Chizzolini, R., Delbono, G., Rosa, P., Novelli, E., Baldini, P., Parolari, P. and Barbuti, S. (1992). Comparative evaluation of hot and cold cutting techniques of heavy pig carcasses in Italy. *Fleischwirt.* (In press.)
11. Decreto Presidente della Repubblica 3.1.1978 n.° 83: Regolamento di esecuzione della Legge 4.7.1970 n.° 506. *Gazzetta Ufficiale* n.° 90, 1978.
12. Legge 13.2.1990 n.° 26: Tutela della denominazione di origine «Prosciutto di Parma». *Gazzetta Ufficiale* n.° 44, 1990.
13. Maggi, E., Bracchi, P. G. and Chizzolini, R. (1977). Molecular weight distribution of soluble polypeptides from the Parma county ham, before, during and after maturation. *Meat Science* **1**, 129-134.
14. Manganeli, E., Camorali, G., Ghisi, M., Campanini, M. and Barbuti, S. (1992). Significance of Gram negative bacteria associated with fresh hams. *Meat Science* (accepted for publication).
15. Minoccheri, F. e Cantoni, C. (1971). Livelli di vitamina B1, B2, B12 in insaccati e prosciutti stagionati. *Ind. Alim.* **10**, n.° 79, 76-78.
16. Parolari, G., Chizzolini, B., Bellatti, M. e Dazzi, G. (1983). Modificazioni fisiche e chimiche delle proteine nella maturazione del prosciutto di Parma. II: Colore. *Ind. Cons.* **58**, 147-149.
17. Parolari, G., Bellatti, M. e Baldini, P. (1984). Caratteristiche organolettiche e stagionatura della carne: influenza del sale, della temperatura e del tempo di stagionatura. *Ind. Cons.* **59**, 199-204.

**PREVENCION DE RIESGOS
MICROBIOLOGICOS
POR ALIMENTOS**

Utilización de bacterias lácticas en el control de microorganismos patógenos de los alimentos

Pablo E. Hernández*, Juan M. Rodríguez, Luis M. Cintas, Wagner L. Moreira, Odón J. Sobrino, María F. Fernández y Bernabé Sanz

*Departamento de Nutrición y Bromatología III. Facultad de Veterinaria.
Universidad Complutense. 28040 Madrid (Spain).*

Summary

The lactic acid bacteria have the potential to inhibit the growth of pathogenic and spoilage bacteria and the possibility exists of using them to improve the hygienic quality and to extend the shelf-life of different foods. Among the many inhibitory substances produced by the lactic acid bacteria, the bacteriocins are of particular interest. It has been the objective of this work to review the bacteriocins produced by lactic acid bacteria from the genera *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Pediococcus*, as well as *Leuconostoc* and *Carnobacterium* to understand their relevant biochemical, immunological and genetic characteristics. The lactic acid bacteria may also express foreign genes codifying metabolites with antimicrobial activities against foodborne pathogens of interest, and this will also permit hypothesize about theoretical and experimental models of microbial antagonism mediated by the lactic acid bacteria.

Key words: lactic acid bacteria, bacteriocins, antagonistic substances.

Resumen

Desde hace tiempo se conoce que las bacterias lácticas poseen el potencial de inhibir en los alimentos el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos, lo que indica la posibilidad de utilizarlas para extender la vida útil e incrementar la calidad higiénica de los alimentos. De los compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas, las bacteriocinas son las más interesantes tecnológicamente. El objetivo de esta revisión consistirá en describir las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas y de analizar su espectro antimicrobiano y características bioquímicas y genéticas más relevantes. Se van a revisar tanto las bacteriocinas producidas por bacterias del género *Lactococcus*, *Lactobacillus* y *Pediococcus* como las de los géneros *Leuconostoc* y *Carnobacterium*. Las bacterias lácticas también pueden vehicular genes heterólogos que les confieran actividades antimicrobianas de interés frente a determinados microorganismos patógenos, lo que permitirá hipotetizar acerca de los diversos modelos teóricos y experimentales de antagonismo microbiano mediado por las bacterias lácticas.

(*) A quien debe dirigirse la correspondencia.

Introducción

Durante cientos de años las bacterias lácticas han desempeñado un papel importante en la obtención y producción de la mayor parte de los alimentos fermentados que actualmente se consumen, entre los que se incluyen el yogur, quesos, embutidos crudos curados, encurtidos y otros. Es de todos conocido que las bacterias lácticas no sólo son interesantes en la industria alimentaria por inducir características organolépticas y estructurales deseables, sino también por inhibir el desarrollo de microorganismos no deseables, alterantes y patógenos, lo que sugiere la posibilidad de utilizarlas para extender la vida útil e incrementar la calidad higiénica de los alimentos. La reducción del pH y la utilización de los carbohidratos disponibles parecen constituir el principal mecanismo de antagonismo microbiano. No obstante, también se conoce que las bacterias lácticas producen, además de los ácidos orgánicos, otras sustancias antagonistas, como son el peróxido de hidrógeno y otros radicales libres, diacetilo, acetaldehído, isómeros D de los aminoácidos y otros metabolitos, como moléculas pequeñas no proteicas y bacteriocinas (33, 34).

De las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas son las más interesantes tecnológicamente, ya que debido a su naturaleza proteica se inactivan por las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal y no parecen ser tóxicas ni inmunógenas en animales de experimentación, lo que las convierte en candidatos adecuados como conservadores de los alimentos. Debido a la preocupación constante que en la sociedad actual plantean los conservadores químicos, las bacterias productoras de bacteriocinas o las bacteriocinas producidas por ellas pueden poseer un papel importante en el procesado y conservación de los alimentos. Tampoco conviene olvidar el efecto nutricional y saludable de la ingestión de bacterias lácticas viables en los consumidores, se ha hipotetizado y algunas veces demostrado que las bacterias lácticas, y sobre todo las del género *Lactobacillus*, incrementan la calidad nutritiva de los alimentos, controlan infecciones intestinales, facilitan la digestión de la lactosa, son antimutagénicas, inhiben el desarrollo de algunos tipos de cáncer y reducen el colesterol sanguíneo (15).

Compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias lácticas

Conviene especificar que el término bacterias lácticas comprende a un número elevado de bacterias grampositivas, cuya característica común es la producción de ácido láctico a partir de carbohidratos. Actualmente el grupo comprende cocos de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* y bacilos del género *Lactobacillus*. Los estreptococos del grupo serológico D de Lancefield se han excluido de las bacterias lácticas, y los del grupo serológico N se han transferido al género *Lactococcus*, mientras que las especies *Lb. divergens* y *Lb. carnis* se han incluido en un nuevo género denominado *Carnobacterium*. Por conveniencia, las especies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetyllactis* y *L. lactis* subsp. *cremoris* se designarán como *L. lactis*, *L. diacetyllactis* y *L. cremoris*, respectivamente.

Aunque ya se ha citado que en esta revisión se prestará una atención especial a la producción por las bacterias lácticas de moléculas pequeñas no proteicas y de bacteriocinas, conviene resaltar que el desarrollo en aerobiosis de las bacterias lácticas conduce a la formación de varios metabolitos del oxígeno, peróxido de hidrógeno, aniones superóxido y radicales libres, que poseen un efecto bacteriostático y bactericida frente a la flora láctica y no láctica. La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos (láctico, acético y fórmico) y del pH es complementaria, mientras la fracción no disociada de los ácidos orgánicos posee la mayor actividad inhibitoria. La actividad antimicrobiana del diacetilo, acetaldehído y de los isómeros D de los aminoácidos es mucho menor y menos significativa que las previamente citadas.

El diacetilo es bacteriostático en las bacterias grampositivas y bactericida en las gramnegativas, aunque la pequeña producción de este compuesto por las bacterias lácticas productoras, así como su potencial mutagénico, dificultan su utilización en la industria alimentaria. La acción antagonista del acetaldehído producido fundamentalmente por *Lb. bulgaricus* se encuentra poco evaluado, mientras que la producción de isómeros D de algunos aminoácidos por las bacterias lácticas es discutible ante la ausencia de una actividad racemasa en las mismas.

Compuestos antimicrobianos no proteicos

Estudios iniciales, realizados años atrás, con el objetivo de clarificar la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas en microorganismos alterantes de los alimentos, indicaron la importancia de algunas moléculas pequeñas no proteicas en dicho cometido. Así, por ejemplo, Pulusani *et al.* (36) citaron la producción por *S. thermophilus* de un compuesto de unos 700 daltons antagonista de bacterias grampositivas y gramnegativas, mientras recientemente Abdel-Bar *et al.* (1) han descrito un compuesto similar en *Lb. bulgaricus*. No obstante, de las sustancias descritas destaca la reuterina producida por *Lb. reuteri* procedente del tracto gastrointestinal de personas y animales. Su actividad antimicrobiana es extraordinariamente amplia, afectando a bacterias grampositivas, gramnegativas, levaduras, mohos y protozoos (47). La reuterina se forma durante la utilización anaerobia del glicerol por *Lb. reuteri* e inhibe la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa involucrada en la síntesis del DNA, lo que determina su amplio espectro antimicrobiano. No obstante, su potencial tóxico no se ha evaluado todavía, aunque por su naturaleza existen dudas razonables acerca de su posible utilidad en la industria alimentaria.

Las bacterias lácticas como productoras de bacteriocinas

Las bacteriocinas se definen como un grupo heterogéneo de proteínas que varían en su espectro antimicrobiano, propiedades bioquímicas, mecanismo de acción y características genéticas (23, 46), lo que conduce a pensar que probablemente su actividad antimicrobiana y estructura proteica son las únicas características comunes de estas sustancias, mientras el término bacteriocinogenidad se emplea para describir la actividad de las bacterias de sintetizar y eliminar al exterior proteínas antagonistas del desarrollo de otros microorganismos. También parece confirmarse que la producción de bacteriocinas por las bacterias lácticas constituye un fenotipo extendido en este grupo microbiano.

Espectro antimicrobiano de las bacteriocinas

La heterogeneidad en el espectro antimicrobiano de las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas condujo a Klaenhammer (23) a dividir las bacteriocinas en 2 clases según su espectro antimicrobiano: a) bacteriocinas activas frente a bacterias taxonómicamente relacionadas, y b) bacteriocinas con un amplio rango de actividad frente a bacterias grampositivas. No obstante, es de destacar que todavía no se conocen bacteriocinas activas frente a bacterias gramnegativas. Puede que estas bacteriocinas se aislen en el futuro de bacterias lácticas de origen no alimentario. Asimismo, aunque las bacterias gramnegativas no son sensibles a la nisina, éstas se sensibilizan tras una permeabilización de su membrana externa con compuestos quelantes, por shock osmótico o por la formación de vesículas membranosas citoplásmicas.

Sensibilidad de las bacteriocinas al calor, acidez y enzimas

Como se desprende de su definición, las bacteriocinas se inactivan, al menos, por una proteasa, entre las que conviene citar las de origen pancreático (tripsina y alfa-quimotripsina) y gástrico (pepsina). La elevada sensibilidad de las bacteriocinas a las enzimas proteolíticas les confiere seguridad de empleo en los alimentos cuando éstos se ingieren por las personas, pero también su posible inactivación por enzimas proteolíticas potencialmente presentes en los mismos substratos alimenticios. Curiosamente, pocos investigadores han descrito la sensibilidad de las bacteriocinas a la renina, lo que sería interesante tecnológicamente. Algunas bacteriocinas son sensibles a enzimas no proteolíticas, como lipasas, amilasas y fosfolipasas, lo que indica la heterogeneidad de las bacteriocinas y la influencia de compuestos no proteicos en su estructura y actividad.

Generalmente las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son termorresistentes, lo que les permite mantener su actividad antimicrobiana tras someterlas a temperaturas similares a las de pasterización y esterilización de la leche. Esto sugiere que su actividad recae en estructuras pequeñas y poco complejas, probablemente sin una estructura terciaria. No obstante, la helveticina J, así como las bacteriocinas de *Lb. casei* y *Lb. delbruecki* subsp. *lactis*, son muy sensibles al calentamiento, lo que sugiere que poseen una estructura proteica más compleja. Asimismo, las bacteriocinas son generalmente estables a un pH ácido o neutro, aunque existen excepciones interesantes. Así, por ejemplo, la solubilidad y estabilidad de la nisina decrece de un pH óptimo de 2 a un pH de 6, lo que supone una desventaja tecnológica importante en la utilización de la nisina como un aditivo en alimentos no ácidos, como los enlatados y derivados lácteos.

Características bioquímicas, inmunológicas y genéticas de las bacteriocinas

Actualmente se dispone de información acerca del aislamiento e identificación de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas, así como de su espectro antimicrobiano. No obstante, aunque se han identificado muchas bacterias lácticas productoras de bacteriocinas, todavía queda por realizar la caracterización bioquímica, inmunológica y genética de la mayor parte de las bacteriocinas producidas por ellas.

La caracterización bioquímica de las bacteriocinas de interés permitirá conocer su comportamiento en diversas situaciones experimentales, la facilidad o dificultad de su purificación y la existencia de secuencias similares a las de otras sustancias antagonistas, así como la posibilidad de fabricar péptidos sintéticos con actividad antimicrobiana. Conviene especificar que la caracterización bioquímica de las bacteriocinas debe incluir su purificación a homogeneidad, composición aminoacídica y secuencia, de lo contrario su caracterización es ineficaz. Asimismo, aunque es difícil generalizar y establecer un método unificado de purificación de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, uno de los que mejores resultados ofrece es el basado en: 1) concentración con sulfato amónico; 2) cromatografía de intercambio iónico; 3) cromatografía de interacción hidrofóbica, y 4) cromatografía en fase reversa. Aunque se conoce poco acerca de las características bioquímicas de las bacteriocinas aisladas, Klaenhammer (23) sugiere su clasificación en 3 grupos: a) proteínas pequeñas resistentes al calor e hidrofóbicas; b) proteínas más grandes sensibles al calor, y c) lantibióticos muy modificados, como la nisina. No obstante, los últimos resultados disponibles sugieren una clasificación de las bacteriocinas en sólo 2 grupos: a) bacteriocinas con aminoácidos no modificados y b) bacteriocinas con aminoácidos modificados.

La caracterización inmunológica de las bacteriocinas permitirá conocer la existencia de regiones de homología con otras producidas por otras bacterias lácticas, la posibilidad de desarrollar métodos inmunoenzimáticos (ELISA) para detectarlas en los sobrenadantes de los medios de cultivo y en los substratos alimenticios de interés, así como la posibilidad de su purificación en un

TABLA 1
BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS DEL GENERO *LACTOCOCCUS*

Bacteriocina	Productor	Localización genética	Tamaño molecular (daltons)	Características bioquímicas	Referencia
Nisina	<i>L. lactis</i>	Cromosoma/ plásmido	3.354	Lantibiótico, 34 aminoácidos	(20)
Lactostrepcinas	<i>L. lactis</i>	ND	ND	8 grupos activos	(24)
Lacticina 481	<i>L. lactis</i>	ND	1.700	Lantibiótico, 21 aminoácidos	(35)
Diplococina	<i>L. cremoris</i>	Plásmido 54 MDa	5.300	51 aminoácidos	(11)
Lactococina A	<i>L. cremoris</i> LMG2130	Plásmido 55 Kb	5.778	54 aminoácidos	(19)
Lactococina A	<i>L. cremoris</i> 9B4	Plásmido 60 Kb	5.778	54 aminoácidos	(49)
Lactococina A	<i>L. diacetylactis</i>	Plásmido 131 Kb	5.778	54 aminoácidos	(45)

solo paso por inmunoafinidad. Finalmente, la caracterización genética de las mismas permitirá evaluar su propagación directa por plásmidos conjugantes o por su clonación en vectores genéticos adecuados, transmisibles por electroporación a otras bacterias lácticas de interés, lo que permitirá posteriormente su evaluación como antagonistas microbianos o «factores de seguridad» en diversos substratos alimenticios.

Mecanismo de acción de las bacteriocinas

Aunque no existe todavía un modelo consensuado de actuación de las bacteriocinas, los resultados disponibles sugieren que su actividad no depende de su adsorción específica en la superficie de las células sensibles y que su adsorción inespecífica deriva de su naturaleza hidrofóbica, mientras que la inmunidad (resistencia) de las cepas Bac⁺ parece deberse más a la producción de una enzima involucrada en la inmunidad que a la alteración de los receptores (34). De las 2 bacteriocinas mejor conocidas, se sabe que la nisina actúa como un compuesto despolarizante en membranas bacterianas energizadas y crea poros en la membrana lipídica. La lactococina A actúa como la nisina, en que también incrementa la permeabilidad de la membrana citoplásmica y disipa el potencial de membrana de las células sensibles. Ya que no se observa una lisis celular de las células sensibles, parece ser que la permeabilización de la membrana ocurre por la formación de poros.

Bacteriocinas producidas por especies del género *Lactococcus*

Los estreptococos del grupo N de Lancefield, actualmente en el género *Lactococcus*, se conocen bien por su utilidad como cultivos iniciadores en la industria láctea. En la Tabla 1 se muestran las bacteriocinas más relevantes producidas por lactococos. De ellas, la nisina, producida por cepas de *L. lactis*, fue el primer compuesto antimicrobiano descrito producido por las bacterias lácticas, con un espectro antimicrobiano muy amplio frente a bacterias grampositivas. La nisina se obtiene comercialmente y unos 45 países permiten su utilización en los alimentos.

La nisina es un lantibiótico, es decir, un polipéptido antimicrobiano con aminoácidos poco

TABLA 2
BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS DEL GENERO *LACTOBACILLUS*

Bacteriocina	Productor	Localización genética	Tamaño molecular (daltons)	Características bioquímicas	Referencia
Bac	<i>L. fermenti</i>	ND	ND	Proteína-lipocarbohidrato	(12)
Lactocina 27	<i>L. helveticus</i> 27	ND	> 2.000.000	Proteína-lipopolisacárido	(48)
Helveticina J	<i>L. helveticus</i>	Cromosoma	37.000	334 aminoácidos	(22)
Lactacina B	<i>L. acidophilus</i>	Cromosoma	6.000-6.500	ND	(4)
Lactacina F	<i>L. acidophilus</i>	Plásmido 110 Kb	6.300	57 aminoácidos	(30)
Plantaricina A	<i>L. plantarum</i>	ND	8.000	ND	(10)
Plantaricina S	<i>L. plantarum</i>	ND	ND	ND	(21)
Sakacina A	<i>L. sake</i> Lb706	Plásmido 18 MDa	ND	ND	(40)
Lactocina S	<i>L. sake</i> L45	Plásmido 50 Kb	3.771	Lantibiótico, 37 aminoácidos	(28)
Sakacina M	<i>L. sake</i> 148	ND	4.467	ND	(43)
Caseicina 80	<i>L. casei</i>	ND	40.000-42.000	ND	(37)
Brevicina 37	<i>L. brevis</i>	ND	ND	ND	(38)

usuales, como deshidroalanina (Dha), deshidrobutirina (Dhb), lantionina (Dha + cisteína) y β -metil-lantionina (Dhb + cisteína). Las proteínas que contienen aminoácidos no codificados en su DNA proceden de rutas metabólicas complejas activadas por complejos multienzimáticos o de una modificación postranslacional del péptido precursor, lo que parece ocurrir en el caso de la nisina. El determinante genético del gen estructural de la nisina se ha clonado y caracterizado en 3 cepas diferentes de *L. lactis*, ATCC11454, 6F3 y NCFB894. En la cepa NCFB894, cerca del gen estructural de la nisina se detecta un elemento de inserción (IS904), todo ello incluido en el elemento genético transponible Tn5301. Aunque la nisina posee un espectro antimicrobiano muy amplio frente a bacterias grampositivas, interacciona fuertemente con los fosfolípidos, lo que limita su utilización en alimentos con emulsificantes. Además, la nisina es menos soluble a un pH ligeramente neutro y alcalino, lo que limita su utilización en muchos substratos alimenticios. Finalmente, el microorganismo productor no se desarrolla adecuadamente en substratos no lácteos.

También conviene destacar que además de la nisina y la lacticina 481, que son lantibióticos, los lactococos producen otras bacteriocinas sin aminoácidos modificados, como la diplococina (11) y la lactococina A (19, 49), producidas en diversas cepas de *L. cremoris* y *L. diacetylactis* (45). Es interesante señalar que el gen estructural de la lactococina A posee la misma secuencia, aunque se localiza en plásmidos de un tamaño molecular diferente, en las cepas de *L. cremoris* y *L. diacetylactis* analizadas.

Bacteriocinas producidas por especies del género *Lactobacillus*

Se conoce que los lactobacilos producen bacteriocinas y la Tabla 2 recoge las más significativas. Algunas bacteriocinas proceden de lactobacilos de origen lácteo, pero otras aisladas de otros substratos alimenticios poseen un espectro antimicrobiano más amplio. En este contexto se conoce que la carne y derivados cárnicos constituyen un substrato excelente para el aislamiento de lactobacilos productores de bacteriocinas; los resultados de Schillinger y Lucke (40) en Alemania, Rodríguez *et al.* (39) y Sobrino *et al.* (42) en España y Lewus *et al.* (25) en Estados Unidos, así lo demuestran. Otros lactobacilos aislados durante la fermentación de aceitunas, pepinillos y otros productos vegetales, así como del intestino de niños lactantes, producen también bacteriocinas de interés.

TABLA 3
BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS DEL GENERO *PEDIOCOCCUS*

Bacteriocina	Productor	Localización genética	Tamaño molecular (daltons)	Características bioquímicas	Referencia
Bac	<i>P. pentosaceus</i> FBB63	Plásmido 10,5 MDa	ND	ND	(17)
Pediocina A	<i>P. pentosaceus</i> FBB61	Plásmido 13,6 MDa	ND	ND	(9)
Pediocina PA-1	<i>P. acidilactici</i> PAC 1.0	Plásmido 6,2 MDa	16.500	ND	(16)
Pediocina PA-1	<i>P. acidilactici</i>	ND	4.640	44 aminoácidos	(31)
Pediocina PA-1	<i>P. acidilactici</i> PAC 1.0	Plásmido 9,4 Kb	ND	44 aminoácidos	(27)
Pediocina AcH	<i>P. acidilactici</i> H	Plásmido 7,4 MDa	2.700	ND	(5)
Pediocina AcH	<i>P. acidilactici</i> H	Plásmido 8,9 Kb	4.268	44 aminoácidos. Secuencia nucleótidos igual a pediocina PA-1	(29)

Las bacteriocinas producidas por lactobacilos de origen cárnico, y concretamente por *L. sake*, podrían utilizarse como factores de seguridad en las carnes refrigeradas y otros derivados cárnicos. De las descritas, la sakacina A y lactocina S poseen un espectro antimicrobiano reducido, mientras la sakacina M es activa frente a otras bacterias lácticas y bacterias grampositivas de los géneros *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Listeria* y *Staphylococcus*, pero no frente a *Bacillus* ni a bacterias gramnegativas, incluidas *S. typhimurium* y *Y. enterocolitica* (6, 43). Conviene destacar que la lactocina S es un lantibiótico y que resultados todavía no publicados de la sakacina M (7) indican que ésta también lo es, siendo su secuencia, hasta lo que se conoce, similar a la lactocina S. Esta observación permite sugerir la existencia de bacteriocinas conservadas en el género *Lactobacillus*, lo que ya se ha demostrado en el *Lactococcus*. Asimismo, las bacteriocinas producidas por lactobacilos de origen vegetal podrían utilizarse para asegurar una fermentación segura e higiénica en la obtención de alimentos vegetales de interés.

Bacteriocinas producidas por especies del género *Pediococcus*

Las bacteriocinas más interesantes se muestran en la Tabla 3. La pediocina A es producida por *P. pentosaceus* FBB61, una cepa aislada de pepinillos fermentados cuya bacteriocina está codificada en un plásmido y es activa frente a microorganismos patógenos, como *C. botulinum*, *L. monocytogenes* y *S. aureus* (9). Otro pediococo de origen vegetal, *P. pentosaceus* FBB63, produce una bacteriocina asociada a un plásmido de 10,5 Mdal que es activa frente a *S. aureus*, *B. cereus* y *S. faecalis*, microorganismos patógenos asociados a los alimentos (17).

Asimismo, la pediocina AcH producida por *P. acidilactici* H aislado de embutidos crudos curados es antagonista de diversas bacterias grampositivas, entre las que se incluyen *C. perfringens*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*, así como de bacterias gramnegativas, como *A. hydrophila* y *Ps. putida*. La bacteriocina se encuentra codificada en un plásmido y posee un tamaño molecular de 2.700 daltons (5). La adsorción de la pediocina AcH en la pared celular de las células sensibles, pero no de las resistentes, origina una muerte celular rápida.

TABLA 4
BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS DE LOS GENEROS *LEUCONOSTOC*
Y *CARNOBACTERIUM*

Bacteriocina	Productor	Localización genética	Tamaño molccular (daltons)	Características bioquímicas	Referencia
Leucocina A	<i>L. gelidum</i>	Plásmido 7,6 MDa	3.930	37 aminoácidos	(18)
Mesenterocina 5	<i>L. mesenteroides</i>	ND	4.500	ND	(8)
Leuconocina S	<i>L. paramesenteroides</i>	ND	2.000-10.000	Glucoproteínas	(26)
Bac	<i>C. piscicola</i> UAL26	Cromosoma	ND	ND	(2)
Carnobacteriocinas A y B	<i>C. piscicola</i> LV17	Plásmido 40 MDa Plásmido 49 MDa	ND ND	3 formas activas de cada una	(3)
Carnocina UI49	<i>Carnobacterium</i> sp.	ND	4.635	Lantibiótico 35-37 aminoácidos	(44)

La pediocina PA-1 producida por *P. acidilactici* PAC 1.0 también se encuentra codificada en un plásmido y posee un tamaño molecular de unos 16.500 daltons (16). La bacteriocina es activa frente a otras bacterias lácticas y *L. monocytogenes* y mantiene su actividad antimicrobiana durante un período extenso de tiempo en filetes de carne refrigerada contaminados con *L. monocytogenes*. No obstante, los últimos resultados experimentales indican que la pediocina PA-1 posee 44 aminoácidos no modificados y un tamaño molecular de 4.640 daltons, mientras la zona N-terminal de la secuencia es similar a la sakacina A, leucocina A y curvaticina A y posee 16 y 13 aminoácidos en común, respectivamente, con las 2 últimas bacteriocinas (31). Asimismo, Marugg *et al.* (27) han descrito 4 genes involucrados en la síntesis y expresión de la bacteriocina PA-1 en *P. acidilactici* PAC 1.0, de los que uno es estructural, otro parece estar involucrado en el transporte de la pediocina al exterior de las células y otros 2 genes de cuyas proteínas no se conoce su funcionalidad.

Finalmente, conviene resaltar que los resultados de Mortlagh *et al.* (29) sobre la pediocina AcH han demostrado que ésta consiste de un prepéptido de 62 aminoácidos, de los que 44 constituyen la bacteriocina activa. La secuencia de nucleótidos del gen estructural de la pediocina AcH es igual a la de la pediocina PA-1, al igual que la secuenciación parcial de los primeros 23 aminoácidos de la pediocina AcH con relación a la PA-1.

Bacteriocinas producidas por especies del género *Leuconostoc*

Se ha observado que especies del género *Leuconostoc* también producen bacteriocinas (Tabla 4). Diversas cepas de *L. gelidum* producen bacteriocinas activas frente a otras bacterias lácticas y *L. monocytogenes* (3), mientras la leucocina A de *L. gelidum* UAL187 es un péptido de 37 aminoácidos y una masa molecular de 3.930 daltons, cuya síntesis está mediada por un plásmido de 76 megadaltons (18). Recientemente, se ha descrito que una cepa de *L. mesenteroides* produce una bacteriocina, mesentericina 5, con un espectro antimicrobiano muy reducido, pero activa frente a *L. monocytogenes* (8), mientras otra cepa de la misma especie produce una leuconocina S, con un espectro antimicrobiano más amplio y que debe ser una glucoproteína porque su actividad se inactiva por la enzima alfa-amilasa (26).

Bacteriocinas producidas por especies del género *Carnobacterium*

Las bacteriocinas producidas por los microorganismos productores se muestran en la Tabla 4. Schillinger y Holzapfel (41) fueron los primeros en describir la producción de bacteriocinas en el género *Carnobacterium*. Posteriormente, se ha citado que *C. piscicola* UAL26 produce una bacteriocina activa frente a bacterias grampositivas, incluidas especies de *Bacillus* y *Clostridium* (3), mientras *C. piscicola* LV17 produce 2 bacteriocinas, una mediada por un plásmido de 40 MDa y la otra por otro de 49-MDa. Los últimos resultados acerca de la purificación de las carnobacteriocinas A y B, previamente citadas, indican que las 2 manifiestan 3 formas activas durante el desarrollo del microorganismo productor en los medios de cultivo apropiados. Recientemente, Stoffels *et al.* (44) han descrito otra bacteriocina, carnocina U149, producida por una cepa no bien caracterizada de *Carnobacterium* sp. Esta bacteriocina es un lantibiótico de 35 a 37 aminoácidos y un tamaño molecular de 4.635 daltons.

Bacterias lácticas productoras de bacteriocinas en el control de microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos

La idea de utilizar bacterias lácticas en el control de microorganismos alterantes y patógenos de los alimentos no es nueva. Los primeros resultados experimentales se obtuvieron utilizando bacterias lácticas, antagonistas por mecanismos desconocidos o poco evaluados, del desarrollo de otros microorganismos. Más tarde la utilización de bacterias lácticas se presentó como una alternativa a la utilización de nitratos y nitritos en diversos productos cárnicos elaborados, evaluando la actividad antagonista de las bacterias lácticas en la síntesis de toxinas botulínicas, así como a la inhibición del desarrollo de microorganismos productores de toxiinfecciones alimentarias y de la producción de aflatoxinas por mohos toxigénicos. Posteriormente se determina la actividad antagonista de las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas o las bacteriocinas elaboradas por ellas en diversos substratos alimentarios. De esta manera se evalúa su potencial tanto en las carnes frescas y refrigeradas y derivados cárnicos, como en la leche y derivados lácteos y en productos vegetales.

No obstante, a pesar de los resultados tan esperanzadores obtenidos, existe la convicción expresada por algunos investigadores de que la actividad antagonista de las bacterias lácticas de interés y de sus bacteriocinas se está evaluando sin conocer todavía sus características bioquímicas, inmunológicas y genéticas más relevantes. De ello se derivan una serie de cuestiones como las de: a) demostrar experimentalmente la síntesis de bacteriocinas en los substratos alimentarios; b) conocer la existencia de posibles sistemas de regulación de la síntesis de bacteriocinas en dichos substratos; c) conocer su cinética de destrucción por enzimas proteolíticas endógenas de los alimentos; d) evaluar la actividad antimicrobiana conjunta de 2 o más bacteriocinas para evitar el desarrollo de microorganismos resistentes a cada una de ellas; e) conocer más a fondo las relaciones de estructura/actividad de las bacteriocinas, para así construir péptidos sintéticos con actividad antimicrobiana o realizar fusiones genéticas de varias bacteriocinas o aplicar técnicas de ingeniería de proteínas para incrementar su actividad; f) conocer mejor cuestiones relativas a la inmunidad y resistencia a las bacteriocinas en las bacterias lácticas de interés, y g) construir vectores genéticos que expresen varias bacteriocinas y que sean fácilmente transmisibles a las bacterias lácticas de interés.

Asimismo, no conviene olvidar que ante los problemas detectados conviene encontrar alternativas adecuadas. Así, por ejemplo, se conoce que la nisina es poco soluble a un pH de cerca de 6, interacciona con fosfolípidos, no es fácilmente difusible, no es activa frente a muchos microorganismos alterantes y patógenos de interés y el microorganismo productor *L. lactis* no se desarro-

lla en muchos substratos alimentarios. Uno de los mayores problemas de la utilización de la nisina en la carne y derivados cárnicos es su pequeña solubilidad al pH de la carne y su producción *in situ* por una cepa que no se desarrolla y sintetiza la nisina a temperaturas de refrigeración. En el caso de la sakacina A de *L. sake* Lb706, se ha demostrado que además de poseer un espectro antimicrobiano muy reducido, su actividad es menor en los substratos cárnicos que en los medios de cultivo y que su actividad decrece con el tiempo. Además, este microorganismo es acidúrico y reduce mucho el pH final de los substratos en que se encuentra, lo que puede limitar su utilidad en los productos cárnicos no fermentados. Los microorganismos del género *Carnobacterium*, aunque son menos acidófilos, son heterofermentativos y producen pequeñas concentraciones de CO₂.

Bacterias lácticas con genes de otras procedencias que les confieren actividades antimicrobianas

El gran avance en el conocimiento de la genética de las bacterias lácticas durante los últimos años permite disponer de técnicas de clonación y expresión de genes de interés en vectores adecuados, así como la propagación de estos vectores a otras bacterias lácticas. Recientemente, Gaier *et al.* (13) han descrito la clonación y expresión del gen de la lisostafina en *L. casei*. La lisostafina es una enzima producida por *S. simulans* con actividad bactericida frente a *S. aureus*, al hidrolizar selectivamente enlaces interpeptídicos de su pared celular. De esta manera, la producción de lisostafina por las bacterias lácticas utilizadas como cultivos iniciadores puede reducir el riesgo de intoxicaciones alimentarias estafilocócicas. El gen que codifica la lisostafina también se ha expresado en *Penicillium nalgiovense*, un moho que se desarrolla en la superficie de los embutidos crudos curados y que puede inhibir el desarrollo de estafilococos en su superficie (14).

Asimismo, Payne *et al.* (32) han descrito la clonación de una lisina de un bacteriófago activa frente a 16 serotipos de *L. monocytogenes* en una cepa autolítica de *L. lactis*, debido a la expresión de una lisina de un bacteriófago activa frente a lactococos. La lisis de los lactococos autolíticos puede permitir la liberación y difusión de la lisina activa frente a *L. monocytogenes* en substratos alimentarios de interés.

Agradecimientos

Los resultados de nuestro grupo en el tema desarrollado se han conseguido gracias a los proyectos ALI91-0255 de la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) y al BRIDGE T-Project on Biotechnology of Lactic Acid Bacteria (Contract BIOT-C910263) de la Comunidad Europea (CE).

Bibliografía

1. Abdel-Bar, N., Harris, N. D. and Rill, R. L. (1987). Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food Sci.* **52**, 411-415.
2. Ahn, C. and Stiles, M. E. (1990). Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 302-310.
3. Ahn, C. and Stiles, M. E. (1990). Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. *Appl. Environm. Microbiol.* **56**, 2503-2510.
4. Barefoot, S. F. and Klaenhammer, T. R. (1984). Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**, 328-334.
5. Bhunia, A. K., Johnson, M. C. and Ray, B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* **65**, 261-268.

6. Cintas, L. M., Moreira, W. L., Rodríguez, J. M., Sobrino, O. J., Fernández, M. F., Sanz, B. and Hernández, P. E. (1992). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria from meat origin against selected indicator microorganisms. Proc. 38th Int. Cong. Meat Sci. Technol. Vol. 2, pp. 643-646. Clermont-Ferrand, France.
7. Cintas, L. M., Holo, H., Sletten, K., Hernández, P. E. and Nes, I. F. (Resultados no publicados.)
8. Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J. F., Simard, R. E., Huang, J. and Lacroix, C. (1991). Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. Appl. Environm. Microbiol. **57**, 3450-3455.
9. Daeschel, M. A. and Klaenhammer, T. R. (1985). Association of a 13.6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* associated with bacteriocin activity. Appl. Environm. Microbiol. **50**, 1538-1541.
10. Daeschel, M. A., McKenney, M. C. and McDonnald, L. C. (1990). Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. Food Microbiol. **7**, 91-98.
11. Darvey, G. P. (1984). Plasmid associated with diplococin production in *Streptococcus cremoris*. Appl. Environm. Microbiol. **48**, 895-896.
12. De Klerk, H. C. and Smith, J. A. (1967). Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. J. Gen. Microbiol. **48**, 309-316.
13. Gaier, W., Vogel, R. F. and Hammes, W. P. (1992). Cloning and expression of the lysostaphin gene in *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus casei*. Lett. Appl. Microbiol. **14**, 72-76.
14. Geisen, R., Standler, L. and Leistner, L. (1990). New mould starters by genetic modification. Food Biotechnol. **4**, 497-504.
15. Gilliland, S. E. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **87**, 175-188.
16. González, C. F. and Kunka, B. S. (1987). Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. Appl. Environm. Microbiol. **53**, 2534-2538.
17. Graham, D. C. and McKay, L. L. (1985). Plasmid DNA in strains of *Pediococcus cerevisiae* and *Pediococcus pentosaceus*. Appl. Environm. Microbiol. **50**, 532-534.
18. Hastings, J. W. and Stiles, M. E. (1991). Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. J. Appl. Bacteriol. **70**, 127-134.
19. Holo, H., Nilssen, O. and Nes, I. F. (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. J. Bacteriol. **173**, 3879-3887.
20. Hurst, A. (1981). Nisin. In: D. Perlman y A. I. Laskin (eds.). Advances in Applied Microbiology. Academic Press, New York.
21. Jiménez, R., Piard, J. C., Ruiz, J. L. and Desmazeaud, M. J. (1990). Isolation of a bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain from a green olive fermentation. FEMS Microbiol. Rev. **87**, 91.
22. Joerger, M. C. and Klaenhammer, T. R. (1990). Cloning, expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. J. Bacteriol. **172**, 6339-6347.
23. Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie **70**, 337-349.
24. Kozak, W., Bardowski, J. and Dobrzanski, W. (1978). Lactostrepcins-acid bacteriocins produced by lactic streptococci. J. Dairy Res. **45**, 247-257.
25. Lewus, C. B., Kaiser, A. and Montville, T. J. (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl. Environm. Microbiol. **57**, 1683-1688.
26. Lewus, C. B., Sun, S. and Montville, T. J. (1992). Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. Appl. Environm. Microbiol. **58**, 143-149.
27. Marugg, J. D., González, C. F., Kunka, B. S., Ledeboc, A. M., Pucci, M. J., Toonen, M. Y., Walker, S. A., Zoetmulder, L. C. M. and Vanderbergh, P. A. (1992). Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. Appl. Environm. Microbiol. **58**, 2360-2367.
28. Mørtved, C. I., Nissen-Meyer, J., Sletten, K. and Nes, I. (1991). Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. Appl. Environm. Microbiol. **57**, 1829-1834.
29. Mortlagh, A. M., Bhunia, A. K., Szostek, F., Hansen, T. R., Johnson, M. C. and Ray, B. (1992). Nucleotide and amino acid sequence of *pap*-gene (pediocin AcH production) in *Pediococcus acidilactici* H. Lett. Appl. Microbiol. **15**, 45-48.
30. Muriana, P. M. and Klaenhammer, T. R. (1991). Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. Appl. Environm. Microbiol. **57**, 114-121.
31. Nieto, J. C., Meyer, J. N., Sletten, K., Peláez, C. and Nes, I. F. (1992). Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Gen. Microbiol. **138**, 1-6.
32. Payne, J., Shearman, C. A. and Gasson, M. J. (1992). Expression of a nisin gene from a *Listeria* bacteriophage in *Lactococcus lactis*. 2nd Meeting of Contractors of BRIDGE T-project on Biotechnology of Lactic Acid Bacteria. Cork, Ireland, pp. 38-40.
33. Piard, J. C. and Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and end products from catabolism. Lait **71**, 525-541.
34. Piard, J. C. and Desmazeaud, M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. Lait **72**, 113-142.
35. Piard, J. C., Muriana, P. M., Desmazeaud, M. and Klaenhammer, T. R. (1992). Purification and partial characterization of lactacin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481. Appl. Environm. Microbiol. **58**, 279-284.
36. Pulusani, S. R., Rao, D. R. and Sunki, G. R. (1979). Antimicrobial activity of lactic cultures: partial purification and characterization of antimicrobial compounds produced by *Streptococcus thermophilus*. J. Food Sci. **44**, 575-578.
37. Rammelsberg, M., Muller, E. and Radler, F. (1990). Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. Arch. Microbiol. **154**, 249-252.

38. Rammelsberg, M. and Radler, F. (1990). Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 177-184.
39. Rodríguez, J. M., Sobrino, O. J., Fernández, M. F., Hernández, P. E. and Sanz, B. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry fermented sausage. *Proc. 35th Int. Cong. of Meat Sci. Technol.* Copenhagen, Denmark, pp. 308-312.
40. Schillinger, U. and Lucke, F. K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environm. Microbiol.* **55**, 1901-1906.
41. Schillinger, U. and Holzapfel, W. H. (1990). Antibacterial activity of carnobacteria. *Food Microbiol.* **7**, 305-310.
42. Sobrino, O. J., Rodríguez, J. M., Moreira, W. L., Cintas, L. M., Fernández, M. F., Sanz, B. and Hernández, P. E. (1991). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **13**, 1-10.
43. Sobrino, O. J., Rodríguez, J. M., Moreira, W. L., Cintas, L. M., Fernández, M. F., Sanz, B. and Hernández, P. E. (1992). Sakacin M a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148. *Int. J. Food Microbiol.* **16**, 215-225.
44. Stoffels, G., Nissen-Meyer, J., Gudmundsdottir, A., Sletten, K., Holo, H. and Nes, I. F. (1992). Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp. *Appl. Environm. Microbiol.* **58**, 1417-1422.
45. Stoddard, G. W., Petzel, J. P., van Belkum, M. J., Kok, J. and McKay, L. (1992). Molecular analysis of the lactococin A gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* WM4. *Appl. Environm. Microbiol.* **58**, 1952-1961.
46. Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* **40**, 722-756.
47. Tatarico, T. L., Casas, I. A., Chung, T. C. and Dobrogosz, W. J. (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 1854-1858.
48. Upreti, G. C. and Hinsdill (1973). Isolation and characterization of bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **4**, 487-494.
49. Van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Jeeninga, R. E., Kok, J. and Vennema, G. (1991). Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl. Environm. Microbiol.* **57**, 492-498.

Incidencia, comportamiento y control de *Aeromonas hydrophila* en productos cárnicos y lácteos

María Luisa García-López*, Andrés Otero, María del Camino García-Fernández
y Jesús Angel Santos

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Universidad de León. 24071 León.

Summary

This review deals with several aspects of *Aeromonas hydrophila* and other motile *Aeromonas* species associated with foodborne illness. Although it is mainly dedicated to the factors affecting growth and survival of this species in foods of animal origin, information on other topics is also provided. This paper includes sections on: Taxonomy, diseases caused by *Aeromonas*, virulence factors, reservoirs and prevalence in foods and water, factors affecting growth and survival, isolation and identification, and control measures.

Key words: *Aeromonas*, *animal origin foods*, *control*.

Resumen

En esta ponencia se revisan diversos aspectos de *Aeromonas hydrophila* y de otras *Aeromonas* móviles asociadas con gastroenteritis humanas, prestando especial atención a su incidencia en alimentos de origen animal y al efecto de los factores extrínsecos e intrínsecos de mayor interés (temperatura, pH, etc.). Los apartados incluidos son: introducción, taxonomía del género, enfermedades humanas causadas por *Aeromonas*, factores de virulencia, ecología e incidencia en los alimentos y el agua, factores que influyen en su supervivencia y multiplicación, aislamiento e identificación y control de *Aeromonas* en alimentos.

Introducción

Durante la década de los ochenta se prestó especial atención a un grupo de bacterias responsables de infecciones e intoxicaciones alimentarias que se caracterizan por su capacidad para multiplicarse a temperaturas de refrigeración. Entre ellas cabe destacar ciertas especies del género *Aeromonas*. Aunque no se han descubierto modelos animales que reproduzcan específicamente el proceso observado *in vivo* (postulado de Koch), existen evidencias clínicas y epidemiológicas que demuestran que algunas especies de *Aeromonas* poseen factores de virulencia asociados a determinadas infecciones humanas, incluidos procesos gastrointestinales.

(*) A quien debe dirigirse la correspondencia.

Taxonomía

En la última edición del Manual de Bergey (28) se recogen 3 especies de *Aeromonas* móviles (*A. hydrophila*, *A. sobria* y *A. caviae*) y una inmóvil (*A. salmonicida* con 3 subespecies: *salmonicida*, *masoucida* y *achromogenes*). En la actualidad (13) se han descrito hasta 13 grupos de hibridación diferentes. De ellos, 4 (GH1, GH3, GH4 y GH7) corresponden a las especies citadas y 7 a nuevas especies y biotipos [*A. media*, *A. eucrenophila*, *A. veronii* (biotipo *sobria* y biotipo *veronii*), *A. jandaiei*, *A. schubertii* y *A. trota*]. Los 2 grupos de hibridación restantes poseen fenotipos similares a *A. hydrophila* y *A. veronii*.

Enfermedades humanas ocasionadas por *Aeromonas*

Con relativa frecuencia, cepas de este género actúan como patógenos oportunistas involucrados en procesos tan diferentes como septicemia, infecciones cutáneas, procesos urinarios y respiratorios, etc. Por otro lado, algunas de las especies son capaces de ocasionar procesos gastrointestinales. Un tipo de gastroenteritis, producido por cepas enterotoxigénicas, se caracteriza por cursar con síntomas similares a los del cólera (heces muy líquidas y fiebre), mientras que la diarrea debida a cepas enteroinvasivas es semejante a la ocasionada por *Escherichia coli* enteroinvasiva (heces conteniendo mucus y sangre). La aparición de uno u otro tipo está relacionada con los factores de virulencia elaborados por las cepas.

Las cepas de *Aeromonas* asociadas a procesos gastrointestinales pertenecen mayoritariamente a los grupos de hibridación 1 (*A. hydrophila*), 4 (*A. caviae*) y 8 (*A. veronii* biotipo *sobria*). Se ha señalado, asimismo, que *A. media* se aísla con relativa frecuencia de heces y que algunos casos de colitis crónica pueden ser debidos a cepas de este género.

Factores de virulencia

Las infecciones intestinales humanas causadas por *Aeromonas* se han atribuido principalmente a la elaboración de ciertos compuestos extracelulares, aunque otras características asociadas a las propias células podrían desempeñar un papel destacado. En cualquier caso la falta de modelos biológicos (órganos o animales) que reproduzcan la enfermedad impide determinar los factores específicos responsables de la gastroenteritis.

Entre los compuestos extracelulares producidos deben citarse enterotoxinas, hemolisinas, ciertas proteasas, sideróforos y otros factores. En relación con las enterotoxinas se han descrito una enterotoxina citotónica relacionada con la diarrea en agua de arroz y una enterotoxina citotóxica que origina diarrea con sangre y mucus. También se ha señalado la producción de un factor que altera la permeabilidad celular y que es neutralizado por anticuerpos frente a la toxina del cólera. Janda (13) indica una posible relación entre este factor y la toxina citotónica. Las hemolisinas pueden originar hemólisis incompleta (hemolisina α) o completa (hemolisina β). Esta última es producida por una proteína citolítica que se correspondería con la enterotoxina citotóxica. Diversas especies producen, al menos, 4 ó 5 proteasas cuyo papel en la patogenicidad no está dilucidado. La capacidad de elaborar sideróforos está bien demostrada en 4 especies de *Aeromonas*, mientras que la investigación sobre otros compuestos extracelulares es muy escasa.

Ecología e incidencia en los alimentos y el agua

Hábitat

Las *Aeromonas* móviles se aíslan de aguas continentales, de estuarios y de alta mar. Su densidad es mayor en aguas corrientes que estancadas, encontrándose con más frecuencia en agua con-

teniendo una cierta concentración de sales. Sin embargo, no parecen estar presentes en lagos hipersalinos ni en aguas termales ($> 45^{\circ}\text{C}$) y tampoco en las muy contaminadas. Desde un punto de vista epidemiológico parece interesante señalar que presentan variaciones estacionales, con una mayor incidencia en épocas cálidas ($> 20^{\circ}\text{C}$).

Alimentos

Agua

El agua de bebida se suele contaminar a partir de efluentes depurados o no, algunos de los cuales son especialmente adecuados para su multiplicación por contener una proporción elevada de proteínas, grasas y almidón (por ejemplo, efluentes de matadero). En relación con el agua, hay que señalar que 2 de los factores determinantes en la diseminación de infecciones por *Aeromonas* (35) parecen ser los fallos en la higienización del agua de bebida (son bastante resistentes al cloro y a otros desinfectantes) y las variaciones estacionales. La bibliografía recoge datos en los que aproximadamente el 30% de muestras de agua de bebida son positivas, habiéndose detectado incluso en agua embotellada (20).

Animales de abasto y aves, canales y carne

Se señalan porcentajes de aproximadamente el 12% de animales sanos (vacas, ovejas, cerdos) que eliminan en sus heces *Aeromonas*, siendo la especie predominante *A. hydrophila* (muchas cepas citotóxicas). La incidencia de *A. caviae* es baja y la de *A. sobria* intermedia.

En relación con las aves, se han publicado trabajos en los que hasta el 98% de las canales de pollo están contaminadas con cepas de este género. No obstante, hay autores que los aíslan menos frecuentemente (aproximadamente el 25%) (3, 32). Datos relativos a muestras de carne de vacuno oscilan entre el 27 y el 60%. Las cifras correspondientes a carne de cerdo y cordero son de 33-74 y 50-60%, respectivamente (32, Sierra, M. 1991. Tesis Doctoral, Universidad de León, León).

Productos cárnicos

En carne de cerdo envasada a vacío (21) se han aislado *Aeromonas* del 20% de las muestras (muchas cepas citotóxicas) y en otros productos cárnicos los datos disponibles son muy variables (10). En este último caso los valores medios oscilan entre 28-35%, pero existen productos con una incidencia muy baja (paté, por ejemplo, 5-7%) y otros en los que es bastante elevada (ciertos productos ovinos tratados térmicamente, 60%).

Leche y productos lácteos

La leche cruda está frecuentemente contaminada con *Aeromonas*, alcanzando en algunos casos valores de 5×10^4 ufc/ml (17, 24). Sin embargo, su incidencia en productos lácteos parece ser menor y sólo se han encontrado en queso Emmental alterado, posiblemente por contaminación durante el proceso de elaboración (16). También se ha detectado (en bajos niveles) en queso fresco elaborado con leche de oveja pasteurizada (Santos, J. A. *et al.* 1991. Res. XII. Congr. Nac. Mi-

crobiol. p. 223), pero parece que cuando la fermentación láctica transcurre correctamente la incidencia es mínima.

Otros alimentos

Los moluscos bivalvos (10, 31) se encuentran frecuentemente contaminados con *A. hydrophila* y *A. sobria* (aproximadamente 70%), siendo menor la importancia de algunos pescados, con valores medios de 25-25% (10). Es interesante señalar que productos de origen marino (ostras y gambas) son los asociados con brotes de gastroenteritis (2). Probablemente por su relación con el agua, muchos productos vegetales crudos (endibias, lechugas, etc.) contienen *Aeromonas* (casi el 100%). Además un número importante de las cepas (70%) son citotóxicas y hemolíticas. La adición de mayonesa y aliños con bajo pH disminuye la incidencia de esta bacteria en ensaladas (4, 10).

Factores que influyen en su supervivencia y multiplicación

Temperatura

El hecho de que se aíslen de hábitats acuáticos a 4° C sugiere que poseen capacidad para multiplicarse en la materia orgánica del agua a esa temperatura (9). Algunos investigadores (25, 31) indican que bastantes cepas de diversos orígenes crecen a 4° C en caldo BHI y que la mayoría lo hacen a 5° C, incluso las que han sufrido un daño subletal por tratamiento térmico (7). En cualquier caso parece que existen, dentro de cada especie, diferentes grupos cuya tolerancia a las temperaturas extremas es variable, dependiendo en cierta medida de su hábitat original. Así, Kirov *et al.* (18) encuentran que el 84% de las cepas aisladas de agua se multiplican bien a $5 \pm 2^\circ \text{C}$, pero que sólo lo hacen el 57% de las de origen humano. También las cepas aisladas de aves se comportan de modo similar a las humanas. El origen acuático de las cepas presentes en las verduras podría explicar su capacidad para aumentar 2-3 unidades logarítmicas durante la vida útil de los vegetales refrigerados (4). Por otro lado, las cepas que no se multiplican activamente a temperaturas elevadas (35-37° C) tienen dificultades para hacerlo en el hombre (19), aunque existen excepciones. En cuanto a la producción de toxina, parece que el límite inferior son 15° C, aunque se han citado temperaturas más bajas (18).

Otros aspectos importantes son su capacidad para multiplicarse en presencia de la flora psicrotrofa alterante (*Pseudomonas* y otros bacilos gramnegativos) y la resistencia a la congelación (supervivencia al menos 18 meses, a -72° C, manteniendo la capacidad de producir enterotoxinas, 1).

Composición de la atmósfera

Algunos investigadores han observado que, en alimentos envasados bajo atmósfera modificada, el nitrógeno favorece el crecimiento de *A. hydrophila* y que el CO₂ lo inhibe (7, 31). Estos extremos se han investigado en carne de cerdo a 4° C y en verduras almacenadas a 4 y 15° C. Parece existir, por tanto, cierto riesgo cuando los alimentos se envasan a vacío o en atmósferas modificadas con bajas concentraciones de CO₂. Otros autores (6, 11), sin embargo, apreciaron el crecimiento a 10° C de cepas de esta especie en carne de vacuno (pH 6) envasada en CO₂ y en colas de cangrejo cocidas y mantenidas a 8° C en una atmósfera modificada con 80% de CO₂.

Debe destacarse asimismo el efecto inhibitorio del envasado en atmósfera modificada en la flora alterante habitual de los alimentos proteicos (aerobia), lo que facilita la supervivencia y multiplicación de las aeromonas.

Sal

Al igual que sucede con la temperatura, el origen de las cepas (humano o medioambiental) influye en su tolerancia a la sal. En general no crecen en presencia de 4% de NaCl, pero algunas pueden hacerlo a concentraciones más elevadas. La sensibilidad al NaCl aumenta a bajas temperaturas y en atmósferas modificadas. Así, Knochel (19) señala que casi todas las cepas estudiadas por él (unas 80 de origen humano y del medio ambiente) fueron inhibidas por el 4% de sal a 5° C, pero que al aproximarse a su temperatura óptima algunas crecían en presencia de hasta 6% de NaCl. En «mince» y surimi elaborados con poca sal *A. hydrophila* crece bien a 5° C, pero es inhibida en surimi con 2,5-3% de NaCl (12). Tampoco cepas aisladas de peces de agua dulce crecieron en presencia de 5% de NaCl (8). En relación con las atmósferas modificadas, 3% de NaCl es suficiente para impedir la multiplicación de cepas de *A. hydrophila*, aunque no para inactivarla, como se demostró en experimentos realizados en carne de cerdo envasada al vacío (22).

pH

Según Hazen *et al.* (9), el pH no parece desempeñar un papel significativo en la distribución de *A. hydrophila* en hábitats acuáticos naturales, ya que se aísla de muestras con un pH entre 5,2 y 9,8, creciendo bien en el rango 5-9. Palumbo (25) señala que 2 cepas de 10 crecieron a pH 4,5 en caldo BHI a 28° C. Hay que reseñar, no obstante, que la sensibilidad al pH está relacionada con la temperatura de incubación y el contenido de NaCl. Así, las cepas estudiadas por Knochel (19) no crecían a pH 5,3 cuando la temperatura era baja (5° C), pero casi todas lo hacían en rangos próximos al óptimo.

Sensibilidad al calor y a la irradiación

A. hydrophila es una bacteria termosensible con valores D y z similares a los de otros bacilos gramnegativos productores de infecciones alimentarias (5, 26). Hay que señalar, no obstante, la existencia de «colas» significativas en las curvas de supervivencia. *A. hydrophila* es, asimismo, sensible a la irradiación (23).

Otros

Se ha investigado la influencia del sorbato y del humo líquido (8), poniéndose de manifiesto que el sorbato (1.000 ppm) combinado con la sal impide, a temperatura elevada (25-37° C), el crecimiento de cepas estudiadas. Sin embargo, el humo líquido sólo es eficaz cuando la contaminación inicial es baja (< 10² ufc/ml).

Aislamiento e identificación de las especies de *Aeromonas* móviles

Inicialmente, para el aislamiento de especies móviles del género *Aeromonas* se empleaban medios recomendados para otros grupos microbianos, especialmente los destinados a bacterias entéricas (enterobacterias y coliformes) y a vibrios marinos. Posteriormente (década de los setenta), se han diseñado medios específicos cuya utilidad ha sido revisada exhaustivamente por Joseph *et al.* (14). En cualquier caso, parece conveniente revisar algunos de los más interesantes.

Medios de preenriquecimiento

Aunque no es habitual este paso, algunos autores lo han utilizado para muestras clínicas y del medio ambiente, siendo los medios descritos agua de peptona alcalina (pH 8,5) y caldo tripticasa soja con ampicilina (5-30 µg/ml). En alimentos, los datos publicados no son concluyentes.

Medios de aislamiento

Los medios que gozan de más aceptación son:

- Agar de Rimler-Shotts (30), que contiene citrato, novobiocina y desoxicolato sódico como agentes selectivos y lisina, ornitina y maltosa como diferenciales.
- Medio mA (29). Los agentes selectivos son ampicilina y desoxicolato sódico, mientras que la trealosa es el agente diferencial.

Ambos medios se emplean conjuntamente con un método de filtración a través de membrana, ya que se diseñaron para el análisis de aguas.

- Agar sangre con ampicilina. Se recomienda para muestras clínicas por detectar directamente la capacidad hemolítica (sangre de oveja, conejo, humana).
- Agar almidón-ampicilina (24). Es el más empleado en alimentos. También en este caso la ampicilina es el agente selectivo, siendo el almidón el compuesto diferencial. Otros medios basados en la actividad enzimática extracelular de *Aeromonas* son: agar glutamato-almidón-penicilina (GSP, 17) y agar ADN-azul de toluidina-ampicilina (34).

Para la identificación presuntiva de este grupo de microorganismos es muy útil el medio AH de Kaper *et al.* (15), que permite realizar hasta 5 pruebas bioquímicas diferentes.

La identificación se puede llevar a cabo mediante «kits» comerciales, especialmente el API 20E, aunque, según las recomendaciones de Toranzo *et al.* (33), es conveniente investigar algunos caracteres determinantes por métodos convencionales (gelatinasa, fermentación de arabinosa, Voges-Proskauer y citrato). También son necesarias algunas pruebas complementarias para la adscripción a especie (producción de gas de la glucosa para diferenciar *A. hydrophila* de *A. caviae* o hidrólisis de la esculina, producción de ácido de la salicina y crecimiento en presencia de KCN para diferenciar *A. hydrophila* de *A. sobria*).

Respecto a las nuevas especies descritas, las características bioquímicas más relevantes son:

A. eucrenophila. Gas de glucosa positiva. El resto de las pruebas son coincidentes con *A. caviae*.

A. veronii. Ornitina descarboxilasa positiva y arginina dihidrolasa positiva.

A. schubertii. Manitol y sacarosa negativa.

A. jandaei. Esculina negativa, sacarosa negativa y resistente a 4 µg/ml de colistina.

A. trota. Sensible a ampicilina y carbenicilina, resistente a cefalotina y esculina negativa.

Control

A la luz de los datos presentados parece que el tratamiento térmico correctamente aplicado (pasterización, cocinado, etc.) es un proceso seguro para inactivar *A. hydrophila* en alimentos crudos. También lo es el empleo de radiaciones ionizantes (1, 25-1,5 KGy, 23).

Durante el almacenamiento a refrigeración de algunos alimentos (carne, por ejemplo) podrían emplearse atmósferas de CO₂, teniendo especial precaución en que la concentración de este

gas esté lo más próxima posible al 100%. Tampoco parece que puedan presentar problemas los alimentos conteniendo 3-3,5% de NaCl en su fase acuosa. La combinación adecuada de bajo pH y niveles relativamente altos de sal y nitratos es eficaz para impedir el crecimiento de *A. hydrophila* a bajas temperaturas (27). El efecto conjunto de sorbato y sal es, asimismo, útil para el pescado (8).

Teniendo en cuenta el origen acuático de este microorganismo, un control estricto del agua de bebida y de la empleada en la industria alimentaria parece imprescindible. Por ejemplo, habría que evaluar el efecto de los tratamientos higienizantes del agua, especialmente cuando ésta contiene niveles elevados de materia orgánica.

En condiciones experimentales se ha descrito la inhibición de *A. hydrophila* por bacteriocinas producidas por bacterias grampositivas, principalmente acidolácticas, lo que sugiere un procedimiento alternativo para su control en alimentos refrigerados.

Finalmente, aunque desde el punto de vista sanitario la presencia de *A. hydrophila* y de otras aeromonas en agua y alimentos es preocupante, parece aún prematuro establecer niveles asociados a riesgo, ya que se desconocen muchos aspectos de su ecología, comportamiento y virulencia. Existen, sin embargo, grupos de riesgo (enfermos de cáncer, individuos recibiendo tratamientos diversos —quimioterápicos, antibióticos—, etc.) en relación con los cuales resultaría adecuado diseñar algún sistema que permitiera estimar qué grado de contaminación o qué metabolitos pueden resultar peligrosos.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Educación y Ciencia (Beca de Formación de Personal Investigador que disfruta don Jesús Angel Santos) y a la CICYT (Proyecto ALI91-0279) su ayuda para llevar a cabo trabajos de investigación sobre el comportamiento y control en alimentos de microorganismos patógenos tolerantes al frío.

Bibliografía

1. Abeyta, C. Jr., Kaysner, C. A., Wekell, M. M., Sullivan, J. J. and Stelma, G. N. (1986). Recovery of *Aeromonas hydrophila* from oysters implicated in an outbreak of foodborne illness. *J. Food Protect.* **49**, 643-646.
2. Altwegg, M., Martinetti Lucchini, G., Lüthy-Hottenstein, J. and Rohrbach, M. (1991). *Aeromonas*-associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **10**, 44-45.
3. Barnhart, H. M., Pancorbo, O. C., Dressen, D. W. and Shotts, E. B. (1989). Recovery of *Aeromonas hydrophila* from carcasses and processing water in a broiler processing operation. *J. Food Protect.* **52**, 646-649.
4. Callister, S. M. and Agger, W. A. (1987). Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *A. caviae* isolated from grocery store produce. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 249-253.
5. Condón, S., García, M. L., Otero, A., and Sala, F. J. (1992). Effect of culture age, pre-incubation at low temperature and pH on the thermal resistance of *Aeromonas hydrophila*. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 322-326.
6. Gill, C. O. and Reichel, M. P. (1989). Growth of the cold-tolerant pathogens *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on high-pH beef packaged under vacuum or carbon dioxide. *Food Microbiol.* **6**, 223-230.
7. Golden, D. A., Eyles, M. J. and Beuchat, L. R. (1989). Influence of modified-atmosphere storage on the growth of uninjured and heat-injured *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3012-3015.
8. Gram, L. (1991). Inhibition of mesophilic spoilage *Aeromonas* spp. on fish by salt, potassium sorbate, liquid smoke, and chilling. *J. Food Protect.* **54**, 436-442.
9. Hazen, T. C., Fliermans, C. B., Hirsch, R. P. and Esch, G. W. (1978). Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 731-738.
10. Hudson, J. A. and DeLacy, K. M. (1991). Incidence of motile aeromonads in New Zealand retail foods. *J. Food Protect.* **54**, 696-699.
11. Ingham, S. C. (1990). Growth of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* on cooked crayfish tails during cold storage under air, vacuum, and modified atmosphere. *J. Food Protect.* **53**, 665-667.

12. Ingham, S. C. and Potter, N. N. (1988). Growth of *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus aureus* on cooked mince and surimis made from Atlantic pollock. *J. Food Protect.* **51**, 634-638.
13. Janda, J. M. (1991). Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infections syndromes associated with the genus *Aeromonas*. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 397-410.
14. Joseph, S. W., Janda, M. and Carnahan, A. (1988). Isolation, enumeration and identification of *Aeromonas* sp. *J. Food Safety.* **9**, 23-25.
15. Kaper, J., Seidler, R. J., Lockman, H. and Colwell, R. R. (1979). Medium for the presumptive identification of *Aeromonas hydrophila* and Enterobacteriaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 1023-1026.
16. Kielwein, G. (1975). Die Bedeutung von *Pseudomonas fluorescens* und von anderen gramnegativen Bakterien fuer die Entwicklung eines ueblen Geruches bei Emmentaler Kaese. *Deutsche Molkerei Zeitung* **96**, 1112-1120.
17. Kielwein, G., Gerlach, R. und John, H. (1969). Untersuchungen ueber das Vorkommen von *Aeromonas hydrophila* in Rohmilch. *Arch. Lebensmittelhyg.* **20**, 34-38.
18. Kirov, S. M., Anderson, M. J. and McMeekin, T. A. (1990). A note on *Aeromonas* spp. from chickens as possible food-borne pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 327-334.
19. Knochel, S. (1990). Growth characteristics of motile *Aeromonas* sp. isolated from different environments. *Int. J. Food Microbiol.* **10**, 235-244.
20. Le Chevallier, M. W., Evans, T. M., Seidler, R. J., Daily, O. P., Merret, B. R., Rollins, D. M. and Joseph, S. W. (1982). *Aeromonas sobria* in chlorinated drinking water supplies. *Microb. Ecol.* **8**, 325-333.
21. Myers, B. R., Marshall, R. T., Edmonson, J. E. and Stringer, W. C. (1982). Isolation of pectinolytic *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* from vacuum-packaged pork. *J. Food Protect.* **45**, 33-37.
22. Palumbo, S. A. (1988). The growth of *Aeromonas hydrophila* K144 in ground pork at 5° C. *Int. J. Food. Microbiol.* **7**, 41-48.
23. Palumbo, S. A., Jenkins, R. K., Buchanan, R. L. and Thayer, D. W. (1986). Determination of irradiation D-values for *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Protect.* **49**, 189-191.
24. Palumbo, S. A., Maximo, F., Williams, A. C., Buchanan, R. L. and Thayer, D. W. (1985). Starch-ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 1027-1030.
25. Palumbo, S. A., Morgan, D. R. and Buchanan, R. L. (1985). Influence of temperature, NaCl, and pH on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Sci.* **50**, 1417-1421.
26. Palumbo, S. A., Williams, A. C., Buchanan, R. L. and Phillips, J. G. (1987). Thermal resistance of *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Protect.* **50**, 761-764.
27. Palumbo, S. A., Williams, A. C., Buchanan, R. L. and Phillips, J. G. (1991). Model for the aerobic growth of *Aeromonas hydrophila* K144. *J. Food Protect.* **54**, 429-435.
28. Popoff, M. (1984). *Aeromonas*. In: N. R. Krieg and J. G. Holt (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology* (vol. I), pp. 545-548. Williams & Wilkins, Baltimore.
29. Rippey, S. R. and Cabelli, V. J. (1979). Membrane filter procedure for enumeration of *Aeromonas hydrophila* in fresh waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 108-113.
30. Shotts, E. B. and Rimler, R. (1973). Medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Microbiol.* **26**, 550-553.
31. Stelma, G. N. (1989). *Aeromonas hydrophila*. In: M. P. Doyle (ed.), *Foodborne bacterial pathogens*, pp. 1-19. Marcel Dekker, Inc. New York.
32. Ternström, A. and Molin, G. (1987). Incidence of potential pathogens on raw pork, beef and chicken in Sweden, with special reference to *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *J. Food Protect.* **50**, 141-146.
33. Toranzo, A. E., Santos, Y., Nieto, T. P. and Barja, J. L. (1986). Evaluation of different assay systems for identification of environmental *Aeromonas* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 652-656.
34. von Graevenitz, A. and Zinterhofer, L. (1970). The detection of *Aeromonas hydrophila* in stool specimens. *Health Lab. Sci.* **7**, 124-127.
35. Wadström, T. and Ljungh, Å. (1991). *Aeromonas* and *Plesiomonas* as food- and waterborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 303-311.

Incidence and control of *Campylobacter* in foods

J. Hernández Haba

Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica. Camino de Vera, 14. 46022 Valencia (Spain).

Summary

Campylobacter jejuni is known as the most common human enteropathogen in developed countries. The epidemiology of the organism has now been adequately determined and indicates that campylobacteriosis is a zoonotic disease. Pets, water, and contaminated foods are the main sources of sporadic infections in humans, and no single animal food source can be excluded as a potential vehicle for infection of humans. The available information indicates that 50 to 70% of cases of enteritis in man are associated with poultry. Cross-contamination and improper handling and cooking of foods of animal origin account for the majority of disease. Hygienic measures must be applied in order to reduce the incidence of campylobacteriosis in humans.

Key words: *Campylobacter jejuni, foods, enteritis, diarrhoea.*

Resumen

Campylobacter jejuni es la bacteria enteropatógena más frecuentemente aislada en diversos países desarrollados. La campylobacteriosis es una zoonosis perfectamente esclarecida, en la que los animales domésticos, el agua y los alimentos contaminados constituyen la principal fuente de infección para el hombre. Más de la mitad de los casos de enteritis humana por *Campylobacter* son ocasionados por consumo de pollo, si bien cualquier alimento de origen animal puede ser un vehículo potencial de infección para el hombre. La mayoría de las infecciones se producen por contaminación cruzada de los alimentos o por su inadecuada manipulación o cocción. La aplicación de medidas higiénicas en la industria y en el hogar reduciría notablemente su incidencia en el hombre.

Introduction

Campylobacter organisms were originally thought to be members of the genus *Vibrio*, and they have long been known as a cause of diarrhoea and septic abortion in both cattle and sheep, but they have been recognized as an important cause of human illness for only the last 20 years. *Campylobacters* were probably observed at the end of the nineteenth century in the faeces of children with diarrhoea, and were initially cited in the literature in 1913 as a causes of abortion in

ewes (10), but was King (9), in 1957, the first to recognize that these organisms could be associated with enteric disease in man. The most commonly identified species, *Campylobacter jejuni*, was first isolated from human diarrhoeal stools in 1972 by a filtration technique developed for veterinary diagnosis by Dekeyser *et al.* (4). In 1977, Skirrow, with a more simple technique, isolated *C. jejuni* in 7.1% of faeces of patients with diarrhoea (13). The subsequent development of selective culture media led to the recognition that *C. jejuni* is an important human enteropathogen.

The new genus *Campylobacter* was proposed in 1963 by Sebald and Véron (12) and has recently been included in the new family *Campylobacteraceae* (20). According with the emended description of the genus proposed by Vandamme *et al.* (21), they appear as slender, gram-negative rods that are comma, S, or spiral shaped, motile by means of a single polar unsheathed flagellum at one or both ends of the cell with a characteristic «cork-screw»-like motility. Cells in old cultures may form spherical or coccoid bodies. Microaerophilic to anaerobic. All species grow at 37° C, but do not grow at 15° C. An O₂ concentration of 3 to 15% is required for the preferentially microaerophilic species. Hydrogen is required or stimulates growth under both microaerophilic and anaerobic conditions. Chemoorganotrophs. Carbohydrates are neither oxidized nor fermented. Energy is produced through respiration and the metabolism of amino acids. They do not require serum or blood for growth. Urea (except some atypical *C. lari* strains) and gelatin are not hydrolyzed. *Campylobacters* have oxidase but not lipase activity. Generally, they do not produce pigments. Menaquinone 6 and methyl-substituted menaquinone 6 are the major respiratory quinones. The major fatty acids are tetradecanoic acid, hexadecanoic acid, hexadecenoic acid, and octadecenoic acid. The G+C content of the DNA ranges from 30 to 46 mol%. The type species of the genus is *C. fetus* subsp. *fetus*.

Eleven species are currently classified in the genus *Campylobacter*. Problems of differentiation between species are involved by the fact that campylobacters have little detectable activity and few phenotypic tests for identification are available. The main conventional physiological and biochemical characteristics for differentiation of *Campylobacter* species are shown in Table 1.

Campylobacter enteritis is caused by the two closely related species *C. jejuni* and *C. coli*, but *C. jejuni* is the predominant species and accounts for about 90% of all human infections even though several other species are associated to a lesser degree with disease in man. Other *Campylobacter* species that have occasionally been isolated from the faeces of patients with diarrhoea are *C. upsaliensis*, *C. lari* and *C. hyointestinalis* (Table 2).

Campylobacter enteritis is an acute enterocolitis, with signs and symptoms not very characteristic, clinically indistinguishable from the other acute bacterial diarrhoeas. The infective dose is as low as a few hundred cells. The average incubation period is 3 days, but it is estimated that this can extend up to 10 days. The initial symptom is often a fever of about 40° C, sometimes associated with confusion or delirium, followed by nausea and severe abdominal pain. Fever is sometimes the only manifestation of the infection, and in some patients is so severe and persistent that initially typhoid fever is diagnosed until the organism is isolated from the faeces. Diarrhoea follows rapidly and is characterized by being either watery and profuse or slimy, and frequently containing inflammatory exudate, leucocytes and blood. Vomiting is rare. The diarrhoea remains for about 2-3 days, but abdominal pain may persist after the diarrhoea has stopped. In general, the infection is not as dangerous to infants and old people as is salmonellosis, and most patients recover within a week. Complications are uncommon, but 1% of patients develop erythema nodosum or reactive arthritis after *Campylobacter* enteritis. Bacteraemia has been noted in fewer than 1% of patients. Peripheral polyneuropathy (Guillain-Barré Syndrome) is a less frequent but more serious complication (3, 6). Although serious complications are rare, deaths attributable to *Campylobacter* infection in the United States are estimated to be 120 to 360 per year (18). Treatment with antibiotics is generally unnecessary, but for severely affected patients erythromycin or ciprofloxacin are effective.

TABLE 1
DIFFERENTIAL CHARACTERISTICS BETWEEN SPECIES OF THE GENUS *CAMPYLOBACTER*

	Growth at:			Catalase	Nitrate	Nitrite	Hippurate	Indoxyl acetate	H ₂ ^a requirement	H ₂ S (TSI) ^b	Susceptibility: ^c		Growth with:		G+C (mol%)
	25°C	37°C	42°C								Cephalotin	NA	1% Gly ^d	3.5% NaCl	
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	- ^e	+	+	+	+	-	+	+	-	-	R	S	+	-	30-32
<i>C. jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	-	+	-	V	-	-	V	+	-	-	S	S	+	-	30-32
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	S	R	+	-	33-34
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	S	R	-	-	33-34
<i>C. coli</i>	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	R	S	+	-	31-33
<i>C. lari</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	R	R	+	-	31-33
<i>C. hyointestinalis</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	V	-	S	R	+	-	35-36
<i>C. upsaliensis</i>	-	+	+	-/W	+	-	-	+	-	-	S	S	V	-	35-36
<i>C. sputorum</i> bv. <i>sputorum</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	S	S	+	-	31-32
<i>C. sputorum</i> bv. <i>bubulus</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	S	R	+	+	31-32
<i>C. sputorum</i> bv. <i>fecalis</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	S	R	+	-	32-33
<i>C. mucosalis</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	S	R	+	-	38-39
<i>C. concisus</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	R	R	+	-	38-40
<i>C. rectus</i>	-	+	W	-	+	+	-	+	+	+	ND	S	+	-	44-46
<i>C. curvus</i>	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	ND	S	+	-	43-46

^a For microaerophilic growth.

^b TSI, triple sugar iron agar.

^c NA, nalidixic acid; S, susceptible; R, resistant.

^d Gly, glycine.

^e +, positive; -, negative; W, weak; V, variable; ND, not determined.

TABLE 2
CAMPYLOBACTERS AND THEIR CLINICAL IMPORTANCE

Established pathogens

- *C. jejuni* subsp. *jejuni*: Acute enteritis.
- *C. coli*: Acute enteritis.
- *C. fetus* subsp. *fetus*: Systemic diseases in compromised hosts.

Potentially pathogenic

- *C. upsaliensis*: Enteritis and bacteraemia.
- *C. hyointestinalis*: Enteritis and diarrhoea.

Uncertain pathogenic significance

- *C. jejuni* subsp. *doylei*: Enteritis.
- *C. lari*: Enteritis.
- *C. concisus*: Periodontal disease.
- *C. curvus*: Blood and oral lesions.
- *C. rectus*: Periodontal disease.

Commensal

- *C. sputorum* biovar *sputorum*: Gingival crevices and faeces.

Not found in man

- *C. mucosalis*.
 - *C. fetus* subsp. *venerealis*.
 - *C. sputorum* biovar *bubulus*.
 - *C. sputorum* biovar *fecalis*.
-

Incidence

The real incidence of *Campylobacter* enteritis is difficult to assess because laboratory reports represent only a small fraction of all infections, and many clinical laboratories may not routinely culture for *Campylobacter* species, or may not use optimal culture methods. In addition, many infections are undiagnosed because people may not consult a doctor for the illness. Therefore, since the Skirrow report in 1977 (13), the number of reported cases of *Campylobacter* enteritis has risen dramatically in most developed countries and, when campylobacters are looked for routinely in the faeces of patients with diarrhoea, they are the most frequently identified bacteria with an incidence that usually exceed those of better-known human enteric pathogens such as *Salmonella*.

In the United Kingdom, annual incidence has increased four-fold over the last 10 years. This increase is probably due to a better sampling rather than a true increase in infection. In 1990, about 3,000 cases per month were reported in the UK; this represents an annual incidence of about 87/100,000 (15). Similar rates have been reported in the United States and other developed countries where surveillance was of similar extent (18). In Spain, the number of cases of *Campylobacter* enteritis notified to the National Centre of Epidemiology in the period 1988-1990, was about 2,000 cases per year, a figure three times lower than that for *Salmonella* infections in the same interval (1).

It has been affirmed that the number of reported cases is only a fraction of the true number of infections. Analyzing the data obtained in a survey of diarrhoea in a single general practice in England (8), and in a waterborne outbreak in the United States (11), an incidence of 10/1,000 (1% of the population per year) is estimated. If this estimation is correct, the total number of cases of *Campylobacter* enteritis in the United States would be about 2.1-2.4 million per year (18).

Age and sex

In developed countries, *Campylobacter* enteritis affects people of all ages, but typically it has a bimodal distribution with peaks of incidence in children under the age of 4 years and in young adults. This secondary peak in young adults is especially pronounced in young men (M/F ratio 1.7/1), and is not usually seen with *Salmonella* or *Shigella* infections (14). It has been suggested that the reasons for this pattern could be due to changes in eating habits among the young people such as the consumption of undercooked chicken, and the growing tendency toward eating «take-away» foods or in «fast-food» establishments.

The incidence of *Campylobacter* infections in the developing world is higher and is virtually limited to young children. For instance, in Mexico and Thailand the incidence is about 40,000/100,000 for children younger than 5 years old. In general, the diarrhoea rates in young children of the developing countries are over 100 times greater than those seen in England, but the rates of symptomatic illness in school-age children and adults are lower than in the developed world because the exposure to the organism is much greater and the children become immune within the first 2 years of life. Because of the high prevalence of campylobacters in the developing world they are a common cause of travellers' diarrhoea (19).

Seasonal variation

In temperate regions, the incidence of *Campylobacter* enteritis is more common in summer than in winter, showing a rise that begins in May, reaches a peak in July, and then gradually falls to winter levels in December. This summer rise occurs 8 weeks ahead of the summer rise of *Salmonella* infections. The reason for these seasonal patterns are unknown, but several studies showed that *Campylobacter* carriage rates in chickens were much higher in summer than in winter. Other likely reasons are some high-risk summer activities such as eating barbecue-prepared meals or drinking untreated water from natural sources (14).

Costs

The cost of the illness to society, including direct costs to government and indirect costs to the individual, was estimated by Sockett and Pearson (16) in a detailed survey of 53 patients with *Campylobacter* enteritis in UK, giving an average figure of £273 per patient, or £587 if the intangible cost of pain and suffering are included. Thus in 1989 the cost of this illness in the UK amounted to nearly £10 million, but as Kendall and Tanner (8) pointed out, the cost could be ten times as high. In short, *Campylobacter* infections cost a great deal in financial and personal terms and justify considerable efforts being made to control them.

Reservoirs and transmission

Campylobacter jejuni is carried in the intestinal tract of a wide variety of wild and domestic animals, mainly as commensals but also as occasional enteric pathogens. Wild birds are the principal reservoirs of infection for domestic animals and animals used for foods. *C. coli* is particularly associated with pigs, and *C. lari* is more common in the gut of seagulls. Human beings are only transitory hosts and a relatively minor source of infection. The sources of *Campylobacter* infections have been studied extensively and four sources appear to account for nearly all cases: pets, raw milk, untreated surface water, and contaminated foods.

TABLE 3
OUTBREAKS OF *CAMPYLOBACTER* INFECTIONS
IN UNITED STATES, 1978-1986^a

Vehicle	No. of outbreaks	No. of ill persons
Water	11	4,983
Raw milk	26	829
Foods:		
— Poultry	3	27
— Egg	1	26
— Other	6	87
— Unknown	9	339
Travel associated	1	150
TOTAL	57	6,441

^aData from reference 18.

The transmission of infection from animals to humans can be direct from contact with infected pets (especially kittens and puppies) or indirect via water, milk and foods. Waterborne and milkborne infections tends to occur in outbreaks and large people are involved, whereas foodborne infection tends to be sporadic and usually small, affecting only 2-3 people (Table 3). It is important to recognize that the majority of *Campylobacter* infections are sporadic cases that are not associated with recognized outbreaks (3, 6, 15).

Water

Campylobacter organisms are common in lakes, rivers and other natural deposits of surface water, including seawater. The sources of campylobacters found in water may be due to faecal contamination by a wide range of wild or domestic animals, or by sewage water after technical problems with the distribution system. *C. jejuni* is not adapted for free-living existence in water and the organism only can survive for up to 4 weeks in cold (4° C) water, but for only a few days in water above 15° C. A few sporadic infections occur from the accidental consumption of untreated water, but major outbreaks of *Campylobacter* enteritis affecting several thousand people were all related to drinking untreated surface water or water supplies with inadequate chlorination, which may have been contaminated by bird droppings. Fortunately such outbreaks are uncommon and water is probably more important as a source of infection for domestic stock (15).

Milk

As noted above, most common-source outbreaks of *Campylobacter* enteritis are related to consumption of raw cows' milk, but goats' milk has also been implicated. A typical outbreak occurs after a school class visit to a dairy farm, when children are given raw milk to drink. Raw milk becomes contaminated by faecal contamination (which is virtually impossible to avoid) at the time of milking, but occasionally it can also be the result of asymptomatic bovine *Campylobacter* mastitis which is difficult to detect. The means by which dairy animals become infected is unclear. Either way, the consumption of raw or inadequately pasteurized milk has led to major outbreaks

of *Campylobacter* enteritis. Surveys in the UK have shown that 5-6 % of cows' milk samples may contain *C. jejuni* (2, 7), and 13 outbreaks were recorded in 3 years, the largest affecting about 3,500 people. To prevent milkborne outbreaks, pasteurization or any other approved heat treatment which kills *Campylobacter* in all milk sold for human consumption is required (15).

Poultry

Since birds are natural reservoirs of campylobacters, colonisation of poultry flocks is almost universal and inevitable. Potential sources for entry of organisms into a flock include infection of newborn chicks from older birds, and contaminated feed or water. During the process of slaughtering, *C. jejuni* spreads from the intestinal content to carcasses. In most countries, the majority (50 to 80 %) of chicken carcasses sold at retail markets are contaminated with *C. jejuni*. In general, normally processed fresh chickens may have *Campylobacter* counts of up to 1.5×10^6 per bird, and unviscerated chickens up to 2.4×10^7 per bird, but frozen chickens have fewer organisms (17). Faeces from infected poultry may also contaminate the surface of eggs, but the organisms do not penetrate the eggshell (5). It is estimated that more than 50 % of sporadic cases of *Campylobacter* enteritis are associated to eating or handling poultry products.

Campylobacter organisms may survive in chicken carcasses after washing with chlorinated water, but they are destroyed by light conventional cooking. There are three routes of human infection by poultry products: by the handling of the raw product, by consumption of the raw or undercooked product, and by cross-contamination of other foods in the kitchen (3).

Other foods

Campylobacters are commonly found in the intestines of cattle, sheep and pigs, and their carcasses regularly become contaminated during the process of slaughter and dressing of animals. Fortunately, *Campylobacter* is sensitive to drying, and conventional forced air chilling rapidly reduces their number through surface drying. Percentages of contamination from 2 to 20 % of retail red meat samples have been reported (15). Pigs typically carry *C. coli* rather than *C. jejuni*, and they are important source of infections in countries where salted or lightly cooked pork products are consumed.

The necessity of moisture for the survival of campylobacters suggests that offal (liver, kidney, heart), which is not subject to drying, might be more frequently contaminated (30-47 % of samples are contaminated), although offal has not yet been revealed as epidemiologically important (6, 15).

Campylobacter have also been isolated from meat products made of pure beef such as steak tartar (which is consumed raw) and raw hamburger, probably because these products are mixed illegally with pork and poultry meat.

Vegetables and fruits might also become contaminated if they are in contact with wild animals or contaminated water. The sensitivity to low water activity suggests that campylobacters would not be a problem in foods with high solute concentration. Sensitivity to acids makes cheese, yoghurt and salads an unlikely sources of campylobacters, but particular ingredients may provide foci for survival (6). *Campylobacter* has also been found in shellfish, such as clams and oysters.

Survival of campylobacters in foods

Fortunately, campylobacters do not survive well in foods or on food-processing surfaces because they do not grow below 30° C, require microaerobic (5 % O₂) and capnophilic (3-5 % CO₂)

conditions, they grow slowly (double time is about 1 h), and they are bad competitors with other bacteria. Furthermore, *C. jejuni* is sensitive to drying, acidic conditions, disinfectants, storage at 25° C, a concentration of 21 % of oxygen, and heat.

C. jejuni can survive for several weeks in a moist environment at 4° C, but tends to die more rapidly at room temperature. Refrigeration of foods promote survival, and keeping foods frozen may allow long-term survival of a small population of an originally large number of *C. jejuni* cells. The decimal reduction time at 63.5° C is a few seconds, and at 55° C is about 1 minute. As opposed to *Salmonella* food poisoning, campylobacters do not grow in foods left at ambient temperatures below 30° C. This means that contaminations which may show their effects over longer periods of time and which have great importance in the epidemiology of *Salmonella*, are of minor significance for *Campylobacter* (3). Barbecue and fondue cooking methods may allow survival of campylobacters in the centre of the food and are known to carry and increased risk of infection.

Prevention and control

The appropriate general measures for the control of *Campylobacter* enteritis involve the proper treatment of water and all milk ready for public consumption. To this may be added the correct disposal of sewage, and a good hygienic practice in the handling of animals, especially hand washing after animal contact and before eating.

Because the consumption of chicken accounts for about 50% of cases of *Campylobacter* enteritis, the single most effective measure would be to control infection in broiled chickens producing birds that are free or lightly colonized with campylobacters. Since infection is not vertically transmitted via eggs, extraneous sources such as water supplies and distribution systems are probably the main routes for introducing the infection in growing flocks. Several recommendations have been suggested for prevention of human infection:

- a) Reduction of the presence of campylobacters in slaughter animals by measures that include the establishment of *Campylobacter*-free breeding stocks, the achievement of strict hygiene rules, the separation of animals from the environment, and the supply of germ-free foodstuffs.
- b) The routes of transmission from farm animals to man should be blocked by hygienic measures in both slaughterhouses and shops.
- c) Cross-contamination of foods should be avoided in shops and kitchens, maintaining a strict separation between poultry products and other foodstuffs.
- d) Consumers should be informed (through television and other mass media) about the importance of rapid heating and cooling of foods, and about the correct handling of poultry and other raw meats in the kitchen.
- e) To avoid the consumption of unpasteurized milk and raw or undercooked meat. Attention should be paid to the hazards of barbecues, fondues and similar situations.
- f) Irradiation of poultry is an effective procedure for killing pathogens and might be considered for people with a higher risk of infection.

References

1. Anon (1990). Vigilancia de gastroenteritis. BMS 1988-1990 (semana 32). Ministerio de Sanidad y Consumo. Boletín Microbiológico Semanal 35-36/90, 1-3.
2. Beumer, R. R., Cruysen, J. J. M. and Birtantie, I. R. K. (1988). The occurrence of *Campylobacter jejuni* in raw cows' milk. J. Appl. Bacteriol. 65, 93-96.

3. Butzler, J. P. and Oosterom, J. (1991). *Campylobacter*: pathogenicity and significance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 1-8.
4. Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J. P. and Sternon, J. (1972). Acute enteritis due to related *Vibrio*: first positive stool culture. *J. Infect. Dis.* **125**, 390.
5. Doyle, M. P. (1984). Association of *Campylobacter jejuni* with laying hens and eggs. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 533-536.
6. Griffiths, P. L. and Park, R. W. A. (1990). *Campylobacters* associated with human diarrhoeal disease. *J. Appl. Bacteriol.* **69**, 281-301.
7. Humphrey, T. J. and Hart, R. J. C. (1988). *Campylobacter* and salmonella contamination of unpasteurized cows' milk on sale to the public. *J. Appl. Bacteriol.* **65**, 463-467.
8. Kendall, E. J. C. and Tanner, E. I. (1982). *Campylobacter* enteritis in general practice. *J. Hyg.* **88**, 155-163.
9. King, E. O. (1957). Human infections with *Vibrio feus* and a closely related *Vibrio*. *J. Infect. Dis.* **101**, 119-128.
10. McFadyean, J. and Stockman, S. (1913). Report of the Departmental committee appointed by the board of Agriculture and Fisheries to enquire into epizootic abortion. Part III. Her Majesty's Stationary Office. London.
11. Sacks, J. J., Libe, S., Baldy, L. M., Berta, S., Patton, C. M., White, M. C., Bigler, W. J. and Witte, J. J. (1986). Epidemic campylobacteriosis associated with a community water supply. *Am. J. Public Health* **76**, 424-429.
12. Sebald, M. et Veron, M. (1963). Teneur en bases de l'ADN et classification des vibrions. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **105**, 897-910.
13. Skirrow, M. B. (1977). *Campylobacter* enteritis: a «new» disease. *Br. Med. J.* **2**, 9-11.
14. Skirrow, M. B. (1987). A demographic survey of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella* infections in England. *Epidemiol. Infect.* **99**, 647-657.
15. Skirrow, M. B. (1991). Epidemiology of *Campylobacter* enteritis. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 9-16.
16. Sockett, P. N. and Pearson, A. D. (1988). Cost implications of human campylobacter infections. *In: B. Kaijser, and E. Falsen (eds.), Campylobacter IV: proceedings of the fourth international workshop on campylobacter infections. University of Göteborg, Göteborg, pp. 261-264.*
17. Stern, N. J. (1992). Reservoirs for *Campylobacter jejuni* and approaches for intervention in poultry. *In: I. Nachamkin, M. J. Blaser and L. S. Tompkins (eds.), Campylobacter jejuni: current status and future trends. American Society for Microbiology. Washington, D. C., pp. 49-60.*
18. Tauxe, R. V. (1992). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. *In: I. Nachamkin, M. J. Blaser and L. S. Tompkins (eds.), Campylobacter jejuni: current status and future trends. American Society for Microbiology. Washington, D. C., pp. 9-19.*
19. Taylor, D. N. (1992). *Campylobacter* infections in developing countries. *In: I. Nachamkin, M. J. Blaser and L. S. Tompkins (eds.), Campylobacter jejuni: current status and future trends. American Society for Microbiology. Washington, D. C., pp. 20-30.*
20. Vandamme, P. and De Ley, J. (1991). Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 451-455.
21. Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. and De Ley, J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: Emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 88-103.

AVANCES EN MICOLOGIA DE ALIMENTOS

Aplicaciones de las técnicas de biología molecular para el control de la contaminación por aflatoxinas

Vicente Sanchis

*Microbiología. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad de Lleida. Alcalde Rovira Roure, 177.
25006 Lleida. España.*

Summary

Aflatoxins are mycotoxins produced by species of *Aspergillus flavus* group. These toxins have received increased attention from the food industry and the general public because they shown a high toxicity against humans and animal. Different methods are applying to control the aflatoxin contamination. But these conventional methods do not seem to resolve the problem. So, new methods using techniques in biotechnology are now being developed: a) Inhibit the biosynthetic and secretory process responsible for aflatoxin contamination. b) Using biocompetitive agents that replace aflatoxigenic strains with non aflatoxigenic strains in the field. c) Using genetic engineering techniques to incorporate antifungal genes into specific plant species.

Key words: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *aflatoxin*, *aflatoxigenic strains*.

Resumen

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por especies del grupo *Aspergillus flavus* que han recibido una gran atención debido a su gran toxicidad frente a los seres vivos. Los métodos convencionales que se desarrollan para controlar el problema de la contaminación por aflatoxinas no parecen ser del todo satisfactorios; de ahí la necesidad de utilizar nuevos métodos que utilizan técnicas en biotecnología. Estos métodos se fundamentan en: a) inhibir los procesos biosintéticos y secretores responsables de la contaminación por aflatoxina; b) usar agentes biocompetitivos que reemplacen en el campo las cepas aflatoxigénicas por cepas no aflatoxigénicas, y c) incorporar dentro de distintas variedades de plantas, mediante técnicas de ingeniería genética, genes específicos antifúngicos expresados en determinados tejidos de la planta.

Introducción

Las aflatoxinas son compuestos tóxicos producidos por las especies fúngicas *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Estos mohos pueden infectar los cultivos antes y después de la recolección y producir aflatoxinas en alimentos y piensos, constituyendo una seria amenaza para la salud de hombres y animales (12). Estas micotoxinas reciben una mayor atención por parte de la industria y de la sociedad por 2 razones principales:

- a) Las aflatoxinas, particularmente la aflatoxina B₁, no sólo son tóxicas a hombres y animales, sino que presentan la característica de ser el producto natural más cancerígeno.
- b) La contaminación por aflatoxinas ha recibido una gran publicidad debido a su alta incidencia en alimentos y piensos en todo el mundo.

Los alimentos contaminados con micotoxinas son una amenaza cada vez más importante en los países del Tercer Mundo, y según los últimos informes parece que va en aumento debido al calentamiento global del planeta y al cada vez menor uso de fungicidas.

Frente a esta perspectiva se han desarrollado una serie de métodos convencionales para controlar el problema de la contaminación por aflatoxinas en los alimentos, y que a continuación se exponen:

a) *Control en prerrecolección* (14)

- Impedir que se produzcan condiciones de «estrés» en la planta por sequedad, malas hierbas, etc. La irrigación es quizá la práctica cultural más efectiva en cacahuate y maíz (17), pero esta práctica no está siempre disponible o es muy costosa a los granjeros.
- Utilización de pesticidas para en primer lugar controlar los insectos que a causa de su actividad provocan y/o facilitan la entrada de los mohos y en segundo lugar inhibir el crecimiento de los mohos aflatoxigénicos.
- Utilización de variedades que presentan una resistencia parcial al ataque fúngico.

Desafortunadamente, estos métodos que reducen las poblaciones de algunas de las plagas de campo no son enteramente efectivas para controlar los hongos productores de aflatoxinas.

b) *Control en postrecolección* (16)

- Prevención. Utilización de condiciones de almacenamiento (temperatura, a_w, atmósfera de gases...) que impidan el desarrollo y producción de la toxina por los mohos toxigénicos.
- Destoxificación. Descontaminar los alimentos mediante la utilización de métodos físicos y químicos, de los que destacamos el tratamiento con vapores de amoníaco y radiaciones.

Una medida cada vez más utilizada es la aplicación en los alimentos de materiales como bentonita que impidan la absorción intestinal de la toxina (18).

Dado que cada vez se están reduciendo los niveles permisibles de estas toxinas en los cultivos, no parece que los métodos convencionales consigan los bajos niveles que se requieren en el comercio de alimentos y piensos. Para ello se están desarrollando nuevos métodos que emplean la biotecnología y que abarcan 3 grandes líneas:

1. Mecanismos moleculares y bioquímicos que controlan la formación de aflatoxinas por el moho. Regulación y control de la biosíntesis de la aflatoxina.
2. Agentes biocompetitivos.
3. Intensificación de la resistencia de la planta huésped contra la contaminación por aflatoxina.

Mecanismos moleculares y bioquímicos que controlan la formación de aflatoxina por el moho

La biosíntesis de aflatoxina no tiene por qué presentarse obligatoriamente durante el crecimiento fúngico y la infección de la semilla. De hecho las cepas no aflatoxigénicas de *A. flavus*, así

como las cepas aflatoxigénicas de la misma especie bajo ciertas condiciones ambientales y dependiendo del sustrato, pueden infectar y colonizar los cultivos sin llegar a producir la micotoxina (13). Igualmente el hecho de que cepas altamente aflatoxigénicas presenten una importante disminución de su capacidad productora de la toxina a causa de la presencia de algunos metabolitos de plantas (4), nos indica que la maquinaria biosintética de la aflatoxina es sensible a factores genéticos, bioquímicos y/o ambientales. Todo esto sugiere el empleo de diferentes estrategias para interrumpir o alterar el proceso biosintético de la aflatoxina.

De lo anteriormente expuesto se deduce la necesidad de una adecuada comprensión de las bases moleculares de la biosíntesis de la aflatoxina, con los compuestos intermedios, enzimas y genes que gobiernan este proceso complejo.

Muchos de los factores bioquímicos que controlan la formación de aflatoxina por el mohos *A. parasiticus* han sido determinados, identificándose muchos de los intermediarios químicos en la ruta biosintética de la toxina (3, 7, 21). Se utilizan estos compuestos como sustratos para conocer las enzimas críticas como una metiltransferasa, una reductasa, una esterasa y una oxidoreductasa que catalizan pasos claves en la ruta biosintética, habiéndose identificado, purificado y caracterizado (2, 5). Asimismo es posible la utilización de enzimas para desarrollar sondas que identifiquen genes responsables de la biosíntesis de las aflatoxinas (1). Actualmente se está trabajando en clonar genes asociados a la biosíntesis de la aflatoxina B₁ (6).

La clonación de los genes de la ruta biosintética nos suministrarán sondas genéticas para futuras aplicaciones biotecnológicas que implican:

- Investigar la regulación molecular de la biosíntesis de la aflatoxina. Determinando los genes que controlan el comienzo de la biosíntesis. También pueden ser usados en la detección de transcritos específicos de mRNA para determinar si los genes de la ruta son transcripcionalmente regulados.
- Inactivación precisa de genes o pasos específicos de la biosíntesis de la aflatoxina con el fin de producir de forma estable mohos no toxigénicos que puedan ser usados como agentes biocompetitivos.
- Estudiar los efectos de los moduladores químicos (derivados del hongo o de la planta huésped) en la regulación genética de la biosíntesis de la aflatoxina. Futuras investigaciones sobre este punto nos suministrarán información fundamental de este proceso y las estrategias a llevar a cabo para interrumpir la toxigenicidad de las cepas mediante el empleo de sustancias que inhiban el sistema enzimático de la biosíntesis de esta toxina y no afecte al requerido para el metabolismo primario de otros organismos expuestos a estas sustancias. Desde el punto de vista ideal sería interesante encontrar una nueva clase de pesticidas «ecológicos» que presenten una actividad específica inhibitoria de la biosíntesis de la aflatoxina y que los productos tratados no sean tóxicos a hombres y animales.

Complementariamente la obtención de estas sondas genéticas podrían ser utilizadas para la detección de cepas aflatoxigénicas en alimentos y piensos, y determinar el peligro potencial que presentan estos productos para contaminarse por esta micotoxina.

Agentes biocompetitivos

La utilización de microorganismos para la degradación de las micotoxinas en los alimentos es, en la mayoría de los casos, muy poco viable desde el punto de vista económico, dado que la acción microbiana va asociada a una pérdida de la calidad organoléptica del alimento a causa de la aparición de colores, olores, limos y degradación de sus compuestos. Sin embargo, su empleo como medida preventiva de la infección y/o contaminación tiene probablemente un mayor futuro.

TABLA 1
 UTILIZACION DE AGENTES BIOCOMPETITIVOS [*A. FLAVUS*
 NO AFLATOXIGENICOS EN LA PREVENCIÓN DE LA
 CONTAMINACION POR AFLATOXINA DE *A. FLAVUS*
 AFLATOXIGENICOS EN SEMILLAS DE ALGODON (COTTY,
 1989. PROC. 38th OILSEED PROC. CLINIC., p. 30)]

Cepas incluidas	Aflatoxina B ₁ (ppb)
Cepa A (aflatoxigénica) sola	72.000
Cepa B (aflatoxigénica) sola	17.000
Cepa C (no aflatoxigénica) sola	0
Cepa A + cepa C	6.000
Cepa B + cepa C	0

El uso de cepas de *A. flavus* no productoras de aflatoxinas pueden facilitar la exclusión de las cepas aflatoxigénicas del medio ambiente. Existen en la naturaleza cepas no productoras de esta toxina, y con una gran capacidad de invadir los tejidos de las plantas, por lo que esta capacidad no está relacionada con la productora de la toxina. Así estas cepas pueden competir con las aflatoxigénicas bajo las mismas condiciones agronómicas y ecológicas.

Resultados previos han mostrado que cepas no aflatoxigénicas de *A. flavus* adaptadas al mismo nicho ecológico que las cepas aflatoxigénicas pueden efectivamente excluirlas de los tejidos vegetales. El uso de cepas no aflatoxigénicas de esta especie como agentes biocompetitivos ha sido propuesto como medida de control de la aflatoxina en algodón, maíz, cacahuete y nueces (10, 11). Estas cepas han sido ya ensayadas en algodón y los resultados iniciales obtenidos son prometedores, como se pueden observar en la Tabla 1, pero el proceso todavía necesita para ser comercializado el ensayo en otros cultivos.

Los buenos resultados obtenidos en el control de la contaminación por aflatoxinas ha conducido a la realización de estudios para mejorar por ingeniería genética estas cepas biocompetitivas y obtener unas cepas con una mayor efectividad en su acción (5).

Existen varias propiedades fúngicas que determinan la habilidad de las cepas de *A. flavus* para infectar y extenderse por los tejidos del huésped. Destacamos, entre éstas, la capacidad de producir pectinasas (8). Una vez conocidas esta y otras propiedades, y los genes que están asociados a éstas, podemos manipular el genoma fúngico y aumentar la agresividad de los hongos y producir agentes biocompetitivos superiores.

Los estudios que se están realizando sobre la regulación y control de la biosíntesis de la aflatoxina y sus genes implicados nos ayudarán igualmente al desarrollo de cepas no aflatoxigénicas de *A. flavus* que puedan ser usadas como agentes biocompetitivos. El clonado de genes de la ruta biosintética nos permitirá en un futuro próximo la eliminación precisa y estable de pasos en la producción de aflatoxinas con el fin de producir cepas fúngicas para su uso en aplicaciones de biocontrol.

Intensificación de la resistencia de la planta huésped contra la contaminación por aflatoxina

La utilización de técnicas de mejora clásica ha permitido a los investigadores la identificación de variedades de plantas «resistentes» (o para ser más exactos, variedades con menor susceptibilidad) a la infección y/o contaminación de aflatoxinas por mohos aflatoxigénicos (14). Es posible que estas barreras en los cultivos que impide el desarrollo fúngico y la formación de aflatoxinas

TABLA 2
INHIBIDORES POTENCIALES DEL CRECIMIENTO FUNGICO
EN ALGODON, CACAHUETE, MAIZ Y OTROS GRANOS (8)

Hidrolasas	Péptidos líticos	Fitoalexinas
Gluconasas (A, M)	Zeamatinas (M)	Estilbenos (C)
Quitinasas (C, M)	Tioninas (OG)	Lacinilenos (A)

A: Algodón. C: Cacahuete. M: Maíz. OG: Otros granos.

sean de naturaleza química y pueden ser responsables del nivel parcial de resistencia identificados en maíz y algodón (14, 15). La identificación de los compuestos químicos unidos a esa resistencia nos proveerá de marcadores bioquímicos para monitorizar la resistencia durante la mejora vegetal clásica y la incorporación de los genes de resistencia a plantas mediante técnicas de transformación.

Dentro de la ingeniería genética para la mejora de plantas, destacamos las siguientes etapas:

- Conocer los productos químicos que le dan resistencia a la planta, así como los genes que están asociados a éstos.
- La ingeniería molecular de los genes antifúngicos para su expresión específica en tejidos de la planta.
- Transformación de las plantas o cultivos sujetos a la contaminación por aflatoxinas con los genes antifúngicos.

Se ha demostrado la existencia en los granos de maíz con niveles variables de resistencia/sensibilidad a *A. flavus*, de quitinasas y glucanasas (15), enzimas hidrolíticas implicadas a veces en la lisis de paredes celulares. Existiendo una correlación entre resistencia/susceptibilidad frente a *A. flavus* y/o contaminación por aflatoxinas y presencia o ausencia de estas enzimas (14).

Otros investigadores han detectado que los tejidos de algodón y cacahuete presentan niveles de compuestos antifúngicos (Tabla 2). Estos tejidos, bajo ciertas condiciones, pueden responder al ataque de mohos aflatoxigénicos produciendo fitoalexinas (9, 23). Destacamos entre estas sustancias a los cadalenos y sus productos oxidados, los lacinilenos, presentes en algodón (22), y los estilbenos (9) presentes en cacahuetes. Estas sustancias tienen múltiples efectos en la fisiología del *A. flavus*, que van desde la inhibición de las primeras etapas de la síntesis de la aflatoxina a la inhibición del crecimiento fúngico. Todas estas características están correlacionadas con la habilidad para resistir el ataque antifúngico.

En la actualidad se han clonado los genes de algunas enzimas hidrolasas (quitinasas y gluconasas) y los de la síntesis de enzimas biosintéticas que catalizan la síntesis de algunas fitoalexinas (estilbenos).

El conocimiento de la biología de la interacción *A. flavus*-planta huésped puede ser vital para el éxito de la estrategia de ingeniería molecular para incorporar en la planta huésped genes que prevengan la contaminación por aflatoxina. Así pues, y en teoría, estos genes, una vez incorporados en el genoma de la planta, deben expresarse a los niveles adecuados, tiempos y lugares de los tejidos de las plantas para impedir que los hongos toxigénicos alcancen las partes de la planta (principalmente semillas) destinadas al consumo de animales y hombres en donde produzcan la aflatoxina.

El uso de genes antifúngicos en la semilla puede ser una estrategia adecuada para inhibir la contaminación de aflatoxina. Destacamos aquellos que desarrollan barreras defensivas en los granos de maíz, paredes carpelares de las bolas de algodón y vainas, cubiertas y tejidos del grandó de

cacahuete, que son los principales lugares de ataque de los mohos. Estas barreras pueden ser efectivas para limitar la invasión fúngica (8).

Quizá el obstáculo tecnológico más difícil que ha de ser superado en la ingeniería genética de los cultivos para mejorar la resistencia a la contaminación por aflatoxina es el desarrollo de procedimientos altamente efectivos para transformar unas determinadas variedades de cultivos que están sujetas a la contaminación por aflatoxinas con genes extraños que se expresen de una manera estable. Esto se ha realizado con éxito en algodón (19, 20). Cacahuete y maíz han sido transformados con genes, pero existe el problema de que los genes no se expresan de forma estable en los tejidos transformados.

Agradecimientos

Agradezco a los doctores Bhatnagar y Cleveland por la información bibliográfica suministrada que ha hecho posible la elaboración de esta revisión.

Bibliografía

1. Bhatnagar, D. and Cleveland, T. E. (1989). Utilization of purified pertinent fungal enzymes for development of probes to identify genes responsible for aflatoxin biosynthesis. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **8**, 305-318.
2. Bhatnagar, D. and Cleveland, T. E. (1990). Purification and characterization of a reductase from *Aspergillus parasiticus* SRRC 2043 involved in aflatoxin biosynthesis. *FASEB J.* **4**, 2727.
3. Bhatnagar, D., Cleveland, T. E. and Kingston, D. G. I. (1991). Enzymological evidence for separate pathways for aflatoxin B₁ and B₂ biosynthesis. *Biochemistry* **30**, 4343-4350.
4. Bhatnagar, D. and McCormick, S. P. (1988). The inhibitory effect of neem (*Azadirachata indica*) leaf extracts on aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **65**, 1166-1168.
5. Bhatnagar, D., Ullah, A. H. J. and Cleveland, T. E. (1989). Purification and characterization of a methyltransferase from *Aspergillus parasiticus* SRRC 163 involved in aflatoxin biosynthetic pathway. *Preparative Biochem.* **18**, 321-349.
6. Chang, P. K., Skory, C. D. and Linz, J. E. (1992). Cloning of a gene associated with aflatoxin B₁ biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Curr. Genet.* **21**, 231-233.
7. Cleveland, T. E. and Bhatnagar, D. (1990). Evidence for de novo synthesis of an aflatoxin pathway-methyltransferase near the cessation of active growth and the onset of aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus parasiticus* mycelia. *Can. J. Microbiol.* **36**, 1-5.
8. Cleveland, T. E. and Bhatnagar, D. (1992). Molecular strategies for reducing aflatoxin levels in crops before harvest. *In: Molecular approaches.* (En prensa.)
9. Cole, R. J., Sanders, T. H., Dorner, J. W. and Blankenship, P. D. (1989). Environmental conditions required to induce preharvest aflatoxin contamination of groundnuts: Summary of six years research. *In: Aflatoxin contamination of groundnuts*, pp. 279-287. Patancheru, India: International Crop Research Institute for Semi-Arid Tropics.
10. Cotty, P. J. (1989a). Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* **79**, 808-814.
11. Cotty, P. J. (1989b). Aflatoxin contamination of cottonseed: Comparison of pink bollworm damaged and undamaged bolls. *Tropical Sci.* **29**, 273-277.
12. Ellis, W. O., Smith, J. P., Simpson, B. K. and Oldham, J. H. (1991). Aflatoxins in food, occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *CRC. Crit. Rev. Food Sci. and Nutr.* **30**, 403-439.
13. Lee, L. S. (1989). Metabolic precursor regulation of aflatoxin formation in toxigenic and non-toxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia* **107**, 127-130.
14. Lisker, N. and Lillehoj, E. B. (1991). Prevention of mycotoxin contamination at the preharvest stage. *In: J. E. Smith and R. S. Henderson (eds.), Mycotoxins and animal foods*, pp. 689-719. CRC Press. Boca Ratón.
15. Neucere, J. N., Cleveland, T. E. and Dischinger, C. (1991). Existence of chitinases in mature corn kernels (*Zea mays L.*). *J. Agric. Food Chem.* **39**, 1326-1328.
16. Park, D. L., Lee, L. S., Price, R. L. and Pohland, A. E. (1988). Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: Current status and regulation. *J. Assoc. Off. Anal. Chemists* **71**, 685-703.
17. Payne, G. A., Cassel, D. K. and Adkins, C. R. (1986). Reduction of aflatoxin contamination in corn due to irrigation and tillage. *Phytopathology* **76**, 679-684.

18. Phillips, T., Sarr, B. A., Clement, B. A., Kubena, L. F. and Harvey, R. B. (1991). Prevention of aflatoxicosis in farm animals via selective chemisorption of aflatoxin. *In*: D. H. Ryan and G. A. Bray (eds.). *Mycotoxins, cancer and health*, pp. 223-237. Louisiana State University Press. Baton Rouge.
19. Trolinder, N. L. and Goodin, J. R. (1988). Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*). II. Requirements of embryo development and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **12**, 43-53.
20. Umbeck, P., Swain, W. and Yang, N. S. (1989). Inheritance and expression of genes for kanamycin and chloramphenicol resistance in transgenic cotton plants. *Crop Sci.* **29**, 196-201.
21. Yabe, K., Ando, Y. and Hamasaki, T. (1991). Enzymatic conversion of norsolorinic acid to averufin in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1340-1345.
22. Zeringue, H. J. (1991). Effect of C₈-C₁₀ alkenals and alkanals on eliciting a defense response in the developing cotton boll. *Phytochemistry*. (En prensa.)
23. Zeringue, H. J. and McCormick, S. P. (1989). Relationship between cotton leaf-derived volatiles and growth of *Aspergillus flavus*. *J Am Oil Chemists' Soc.* **66**, 581-585.

Utilización de técnicas moleculares para la caracterización de levaduras vínicas y el estudio del proceso de vinificación

Amparo Querol¹, Eladio Barrio², Tomás Huerta¹ y Daniel Ramón^{3*}

¹ Departamento de Microbiología y ² Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia. Doctor Moliner, 50. 46100 Burjassot (Valencia). España.

³ Unidad de Bioingeniería. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC. Jaime Roig, 11. 46010 Valencia. España.

Summary

The study of the fermentation process in the Alicante region allowed us to conclude that adverse climatic conditions could be responsible for deficient vinifications with serious problems arising fermentations, usually causing incomplete fermentation. In order to avoid these problems, we selected a *Saccharomyces cerevisiae* strain, namely T73, isolated in the same Alicante region, to be used to perform controlled fermentations. The use of selected strains in the winemaking process requires the development of characterization techniques that can clearly differentiate between the inoculated strain and the wild strains present in the musts. In order to differentiate strains present in the wine ecosystems, an extensive survey of different methods of yeast strains identification has been carried out. However, these techniques are very complex to be used in industry. For this reason, we have developed a new, simple, unexpensive and rapid method based on mitochondrial DNA restriction analysis. This technique was applied to the control of wine fermentations conducted by active dry yeasts. This molecular approach allows us to understand the role of the inoculated dry yeast strain and that of the natural *S. cerevisiae* flora during vinification.

Key words: wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, molecular characterization, mtDNA, fermentation.

Resumen

El estudio del proceso de fermentación en la D. O. Alicante nos ha permitido concluir que las condiciones climáticas adversas durante la recolección de la uva pueden producir serios problemas durante la fermentación, tales como variaciones en la flora levaduriforme inicial y paradas de la fermentación. Para resolver este problema seleccionamos una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, denominada T73, aislada de dicha región, con la finalidad de normalizar el proceso. La utilización de levaduras seleccionadas en el proceso de vinificación requiere el desarrollo de técnicas de caracterización que permitan diferenciar entre la cepa inoculada y las cepas salvajes presentes en el mosto. Con esta finalidad se realizó un estudio comparativo de los diferentes métodos que permiten diferenciar levaduras. Sin embargo, estas técnicas son complejas para poder ser utiliza-

(*) A quien debe dirigirse la correspondencia.

das en la industria; por esta razón hemos desarrollado un nuevo método sencillo y rápido basado en el análisis de restricción del DNA mitocondrial. Esta técnica ha sido utilizada en el control de fermentaciones inoculadas con levaduras seleccionadas y nos ha permitido determinar tanto el papel de la levadura como el de la flora natural de *S. cerevisiae* durante la vinificación.

Introducción

Tradicionalmente el vino se produce por la fermentación natural llevada a cabo por las levaduras presentes en la uva y en la maquinaria de la bodega (prensado, cintas, tanques, etc.). La dinámica de la flora responsable del proceso fermentativo del mosto ha sido objeto de numerosos estudios, tanto en España (12, 13, 17) como en otros países (1, 9). Estos resultados muestran diferencias en la flora aislada que pueden ser observadas en una misma zona vitivinícola e incluso dentro de una misma bodega. Diversos factores pueden ser los responsables de estas variaciones en la flora inicial, tales como cambios en las técnicas de vinificación (22), diferencias en la vendimia (23) o cambios en las condiciones climáticas de la zona, particularmente temperatura y pluviosidad (10, 15, 20).

En este sentido, un estudio comparativo entre 2 campañas vitivinícolas en la D. O. Alicante, una considerada anormal por las altas lluvias durante la recolección (1986) y otra normal (1987), demostraron que los recuentos de levaduras del mosto fueron mayores en la primera campaña que en la segunda (20). En cuanto a la cinética de fermentación se observó un desfase entre las curvas de crecimiento de ambos años. Todo parece indicar que en la campaña 1986 el mal estado fitosanitario de la uva antes de la llegada a la bodega provocó un mayor crecimiento de levaduras oxidativas, perjudicando a las levaduras de alto poder fermentativo responsables de la fermentación (*Saccharomyces cerevisiae*). Como consecuencia de ello, en la campaña de 1986 se produjo un retardo en la fermentación, presentándose problemas de degradación total de los azúcares reductores. Finalmente, estas alteraciones microbianas influyeron en la calidad del vino, observándose un aumento de la acidez volátil y la aparición de sabores y olores desagradables.

Selección de levaduras vínicas

Para resolver problemas similares al comentado en el apartado anterior, en otras regiones vitivinícolas se han utilizado cultivos puros de levaduras aislados de los mostos de la zona (26). Estos cultivos, en forma de levaduras secas activas, se adicionan a los mostos frescos con la finalidad de dirigir las fermentaciones. Como resultado de esta práctica, el producto final mantiene las mismas características y calidad a lo largo de las distintas campañas (9).

Las cepas de levaduras se seleccionan siguiendo diversos criterios (1, 4, 6). Dichos criterios están basados en características de fermentación que se pueden agrupar como favorables o desfavorables. Entre las primeras figuran un buen rendimiento y tolerancia al etanol, producción de ésteres y glicerol, escasas exigencias nutricionales, una alta velocidad de fermentación y la posibilidad de su liofilización. Entre las segundas, la producción de SO_2 , la formación de acidez volátil, la producción de SH_2 , la formación de espuma y la elevada producción de alcoholes superiores. Existen otros factores que se pueden considerar como la tolerancia al SO_2 , la posesión del carácter «killer», la producción de compuestos que se combinan con el SO_2 y la capacidad de degradación del ácido málico.

Basándonos en dichos criterios, y para resolver el problema de la D. O. Alicante, realizamos una selección de levaduras a partir de mostos de la zona. Para ello se siguió un esquema de selección basado en la determinación del factor «killer», el análisis del perfil y la cinética de fermentación en microvinificaciones y por último el análisis organoléptico del producto de la fermentación (17).

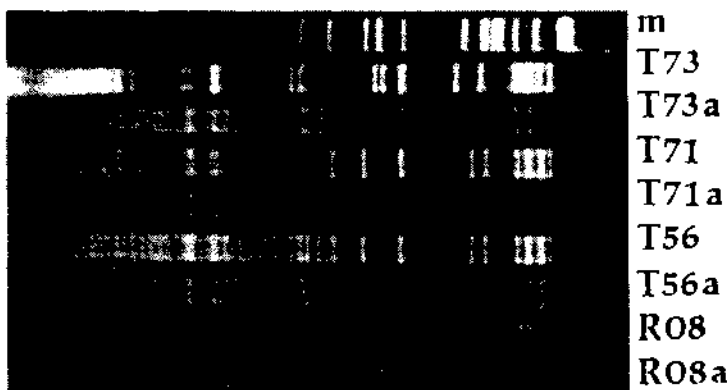


Fig. 1. Patrones de restricción del mtDNA obtenidos con la enzima *RsaI*. Las carreras «a» corresponden al mtDNA obtenido por el nuevo método (18) y las no marcadas al mtDNA purificado (16). Los marcadores de tamaño (m) corresponden a una mezcla de DNA de fago lambda digerido con *HindIII* y con *EcoRI-HindIII*.

Como resultado se seleccionó una cepa de la especie *S. cerevisiae*, denominada T73, procedente de los mostos de la zona. La cepa presenta una serie de características enológicas de interés para la industria, encontrándose perfectamente adaptada a las características de los mostos y a las condiciones de fermentación de la D. O. Alicante y zonas vecinas (17). En la actualidad esta cepa es comercializada por la empresa Lallemand Inc. (Canadá).

Caracterización de levaduras

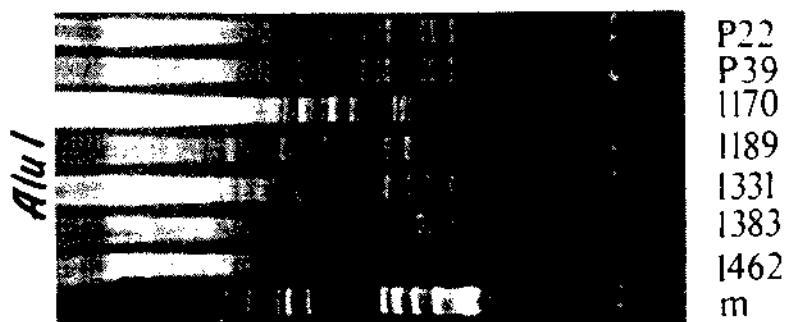
En una fermentación vínica inoculada con una cepa seleccionada es imprescindible poder determinar durante todas las fases de la fermentación si la cepa inoculada se impone a la flora salvaje del mosto. Para ello es necesario disponer de una técnica que permita diferenciar la cepa inoculada del resto de microorganismos de la misma especie presentes en el mosto.

La mayoría de las cepas utilizadas como cultivos iniciadores pertenecen a la especie *S. cerevisiae*. Dada la frecuencia con que otras cepas de esta misma especie aparecen en el mosto, es imposible diferenciar por técnicas clásicas microbiológicas, como pruebas de fermentación y asimilación, la cepa inoculada del resto de cepas naturales presentes en el mosto. Por esta razón se han utilizado numerosas técnicas basadas en el análisis del polimorfismo molecular para la caracterización de levaduras vínicas (5). Entre las técnicas empleadas se encuentran el análisis de los patrones de proteínas (28), el estudio del polimorfismo de restricción de regiones del DNA nuclear (3, 14, 25), el análisis del polimorfismo cromosómico (29) y la determinación de los patrones de restricción del DNA mitocondrial (7, 16).

Recientemente nuestro grupo de trabajo ha llevado a cabo un análisis comparativo de todas estas técnicas que demuestra que tan sólo el polimorfismo cromosómico y el análisis de restricción del DNA mitocondrial (mt DNA) son capaces de diferenciar distintas cepas vínicas de *S. cerevisiae* procedentes del mismo mosto (18).

Sin embargo, ambas técnicas son complejas y difíciles de realizar en bodegas al requerir material sofisticado y personal muy cualificado. Por ello decidimos desarrollar un método rápido de análisis de restricción del mtDNA (18), que consiste en una purificación del DNA total de las levaduras (tanto DNA nuclear como mtDNA) y su posterior digestión con enzimas de restricción que reconocen secuencias del tipo $G_1C_1A_1T_1$. Estas enzimas reconocen pocos sitios de restricción en el mtDNA debido a las características de dicha molécula (posee una riqueza en A y T del 75%: ver ref. 8) y un gran número de sitios en el DNA nuclear. Este último es digerido en fragmentos de pequeño tamaño que migran más rápidamente en una electroforesis en gel de agarosa, lo que permite visualizar claramente los fragmentos de restricción del mtDNA como bandas defi-

Fig. 2. Patrones de restricción del mtDNA obtenidos con la nueva técnica sobre diferentes cepas industriales; panaderas (P22 y P39), de destilería (1170 y 1383) y cerveceras (1189, 1331 y 1462). Todas las cepas fueron obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo, excepto las panaderas cedidas por el doctor Pascual Sanz (IATA, CSIC). Los marcadores de tamaño son los mismos que en la Figura 1.



nidas en el gel. Como se puede observar en la Figura 1, los resultados obtenidos al analizar el mtDNA purificado por la metodología tradicional (16) y los obtenidos con esta nueva técnica son idénticos, con una resolución similar. Este método es aplicable a la caracterización de cualquier levadura industrial y además puede resultar de interés para la caracterización de levaduras procedentes de colecciones de cultivo (Fig. 2).

Ensayos a nivel industrial: seguimientos mediante técnicas moleculares

Se han aplicado distintas técnicas para seguir la cinética de levaduras seleccionadas y naturales durante la fermentación. Algunos autores han utilizado el fenotipo «killer» como marcador, estudiando la dinámica poblacional de cepas sensibles (K^-R^-) y productoras (K^+R^+) en medio sintético o en mosto estéril (11, 24). Otros han utilizado como marcador la capacidad de las levaduras para fermentar la galactosa (24). Ambas estrategias sólo se pueden aplicar en condiciones de laboratorio, y no en la industria donde el mosto no es estéril y un gran número de levaduras salvajes de la especie *S. cerevisiae* presentan las características utilizadas como marcadoras (1, 9). La utilización de mutantes naturales resistentes a ciertos antibióticos (cloranfenicol y oligomicina) ha sido también utilizado por algunos autores (30). En este caso es posible seguir la implantación de la cepa inoculada que posee la resistencia, pero no la dinámica de crecimiento del resto de cepas presentes en el mosto.

El desarrollo de un método rápido y sencillo de análisis del mtDNA, como el indicado anteriormente, permite abordar la implantación de las cepas vínicas a nivel molecular. Mediante la técnica es posible procesar un gran número de muestras y diferenciar de forma eficaz no sólo la levadura inoculada, sino también el resto de levaduras presentes en el mosto.

Utilizando esta técnica estudiamos el proceso de fermentación en una bodega de la D. O. Alicante (Mañán) y en otra de la D. O. Utiel-Requena (Calderón) (19). Para cada ensayo se utilizaron 2 fermentadores de 150 hl; uno de ellos se inoculó con la cepa T73 y el otro, sin inocular, se utilizó como control. Se tomaron muestras cada 2 días y de cada muestra se aislaron 50 colonias (en total 950 colonias). De ellas se extrajo el mtDNA, que se analizó con las enzimas de restricción *HinfI* y *RsaI*. En la Figura 3 se muestran, a modo de ejemplo, los patrones mayoritarios observados en la fermentación inoculada y en la natural de la bodega de Calderón.

En ambas bodegas la cepa T73 se implantó y dirigió la fermentación, llegando a representar al final de la fermentación en la bodega de Calderón el 68,09 % y en la de Mañán el 89,46 % de la población de levaduras.

Pero no sólo fue posible seguir la implantación de la cepa inoculada, sino también determinar la dinámica de las poblaciones naturales de *S. cerevisiae* presentes en la fermentación inocula-

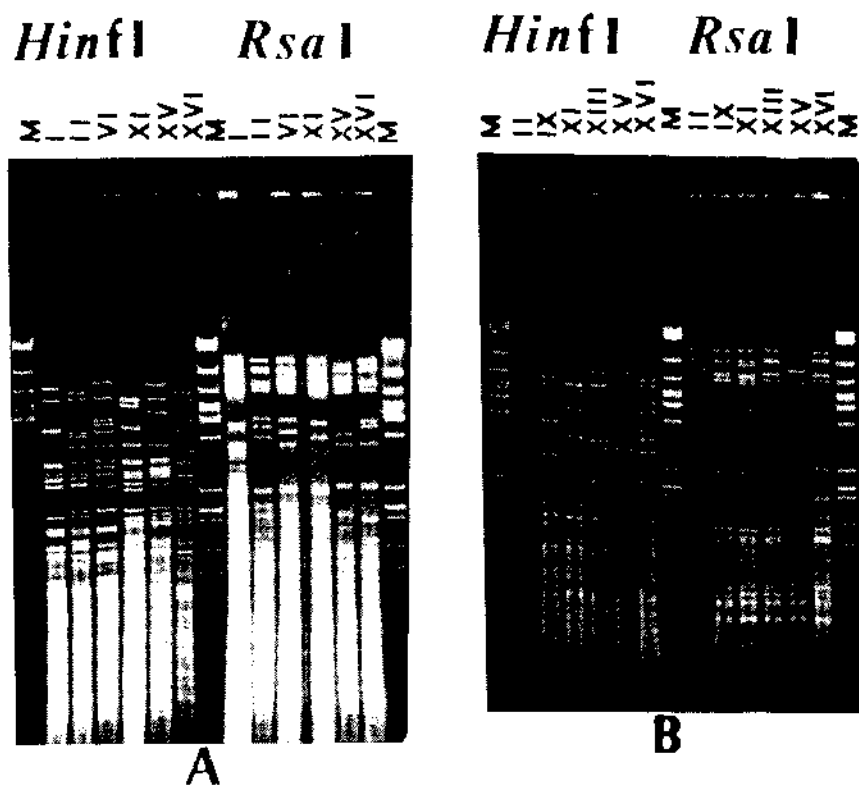


Fig. 3. Patrones mitocondriales mayoritarios presentes en la bodega de Calderón durante la fermentación inoculada (A) y la fermentación control (B). El patrón corresponde a la cepa T73. Los marcadores de tamaño son los mismos que en la Figura 1.

da y en la control. Así, en ambas bodegas se pudo observar una gran variabilidad. En Calderón se determinaron hasta 41 patrones mitocondriales distintos (formalmente cepas de *S. cerevisiae*) y 35 en Mañán. Sin embargo, a pesar de la gran variabilidad tan sólo un reducido número de cepas aparecieron a lo largo de la fermentación con porcentajes significativos (>10%).

Resulta interesante resaltar que en ambas bodegas la diversidad observada fue mayor en la fermentación inoculada que en la natural. Esta mayor diversidad podría ser debida a una alteración del equilibrio del ecosistema, de forma que el crecimiento de la cepa inoculada impediría que las levaduras mayoritarias siguieran creciendo y aparecieran en porcentajes altos. De esta forma el desarrollo de otras levaduras minoritarias se vería favorecido.

En la Figura 4 se representa la evolución de los patrones mayoritarios a lo largo de la fermentación inoculada en ambas bodegas. En la bodega de Calderón (Panel A), el patrón I, que corresponde a la cepa T73, apareció en porcentajes bajos al principio de la fermentación, y fue a partir del cuarto día cuando apareció en porcentajes superiores al resto de patrones. Una situación similar se observó en la bodega de Mañán (panel B). Por tanto, en los primeros días de la fermentación la cepa inoculada no desplaza de forma brusca al resto de cepas presentes en el mosto.

La utilización de levaduras seleccionadas ha creado controversia en la industria del vino. Algunos autores (21) opinan que la inoculación de levaduras seleccionadas no es aconsejable, porque éstas inhiben el crecimiento de las levaduras naturales presentes en el mosto, algunas de las cuales son las responsables de los aromas (2). Nuestros análisis demuestran claramente que la inoculación de levaduras seleccionadas no disminuye el desarrollo de las levaduras naturales pre-

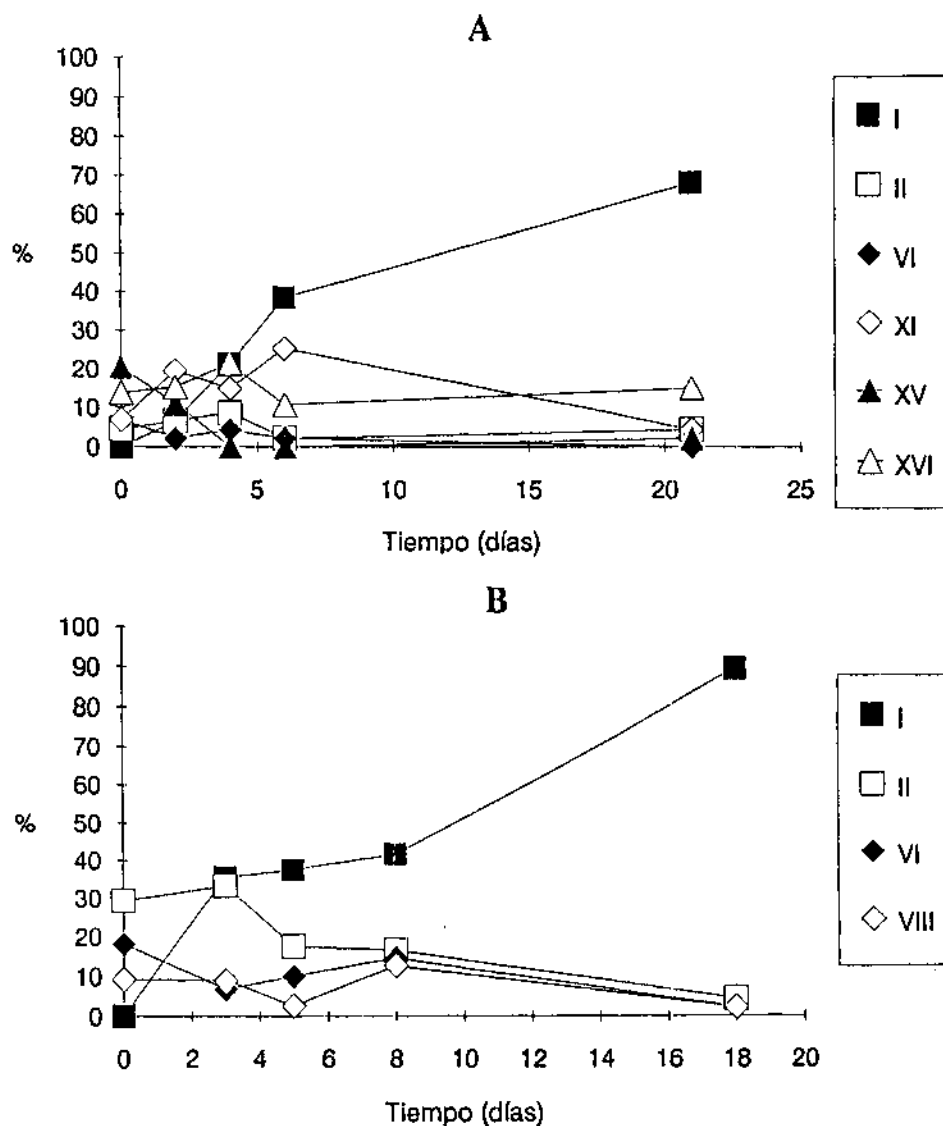


Fig. 4. Evolución de los patrones mayoritarios a lo largo de la fermentación inoculada con la cepa T73 (patrón I) en la bodega Calderón (A) y en la bodega de Mañán (B).

sentes en los primeros días de la fermentación. Por tanto, podemos concluir que los vinos elaborados con cepas seleccionadas presentan excelentes características, tanto organolépticas como analíticas, y mantienen las características propias campaña tras campaña.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (ALI90-0949). A. Q. y E. B. son becarios de la Consellería de Cultura, Educación y Ciencia de la Generalitat Valenciana.

Bibliografía

1. Amerine, M. A., Berg, H. W., Kunkee, R. E., Ough, C. S., Singleton, U. L. and Webb, A. D. (1982). The technology of wine making (4th edition). AVI Publishing Company. Westport C. Y.
2. Benda I. (1982). Wine and brandy. In: G. Reed (ed.), pp. 293-402. AVI Technical Books, Westport, Conn.
3. Braus, G., Furter, R., Prantl, F., Niederberg, P. and Hutter, R. (1985). Arrangement of genus TRP1 and TRP3 of *S. cerevisiae* strains. Arch. Microbiol. **142**, 383-388.
4. Cuinier, C. (1986). Le levurage spécifique. Viticulture et Vin **269**, 29-41.
5. Degré, R., Thomas, D. Y., Ash, J., Mailhiot, K., Morin, A. and Dubord, C. (1989). Wine yeast strain identification. Am. J. Enol. Vitic. **40**, 309-315.
6. Delfini, C. (1992). Criteri metodologici seguiti, risultati ottenuti e prospettive nella selezione di lieviti per uso enologico. Bilogia oggi VI **1-2**, 303-309.
7. Dubourdieu, D., Sokol, A., Zucca, J., Thalouarn, P., Datte, A. et Aigle, M. (1984). Identification des souches de levures isolées de vins par l'analyse de leur ADN mitochondrial. Connaiss Vigne Vin **21**, 267-278.
8. Gray, M. W. (1989). Origin and evolution of mitochondrial DNA. Annu. Rev. Cell. Biol. **5**, 25-50.
9. Lafon-Lafourcade, S. (1983). Wine and brandy. In: G. Reed (ed.). Biotechnology, vol. 5, pp. 81-163. Verlag-Chemie. Heidelberg.
10. Longo, E., Cansado, J., Agrelo, D. and Villa, T. (1991). Effect of climatic conditions on yeast diversity in grape musts from Northwest Spain. Am. J. Enol. Vitic. **42**, 141-144.
11. Longo, E., Velázquez, J. B., Cansado, J., Calo, P. and Villa, T. (1990). Role of killer effect in fermentation conducted by mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Lett. **71**, 331-336.
12. Mora, J., Barbas, J. I., Ramis, B. and Mulet, A. (1988). Yeast microflora associated with some Majorca musts and wines. Am. J. Enol. Vitic. **39**, 344-346.
13. Pardo, I., García, M. J., Zúñiga, M. and Uruburu, F. (1989). Dynamics of microbial populations during fermentation of wines from the Utiel-Requena region of Spain. Appl. Environ. Microbiol. **55**, 539-549.
14. Pedersen, M. B. (1983). DNA sequence polymorphisms in the genus *Saccharomyces*. I. Comparison of the HIS4 and ribosomal RNA genes in lager strains. ALE strain and various species. Carlsberg Res. Commun. **48**, 485-503.
15. Poulard, A., Simon, L. et Cuinier, C. (1981). Caractères de la microflore levurienne du vignoble Nantais. Vignes et Vins **300**, 14-18.
16. Querol, A. and Barrio, E. (1990). A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. Nucl. Acids. Res. **18**, 1657.
17. Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramón, D. (1992a). Strain for use as dry yeast inf fermentation of Alicante wine: selection and DNA patterns. J. Food Sci. **57**, 183-185.
18. Querol, A., Barrio, E. and Ramón, D. (1992b). A comparative study of different methods of yeast strains characterization. System. Appl. Microbiol. **15**, 439-446.
19. Querol, A., Barrio, E., Huerta, T. and Ramón, D. (1992c). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by yeast strains. Appl. Environ. Microbiol. **58**, 2948-2953.
20. Querol, A., Jiménez, M. and Huerta, T. (1990). Microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grape-harvest in region of Alicante (Spain). J. Food. Sci. **55**, 1603-1606.
21. Reed, G. and Nagodawithana, W. (1988). New development in wine microbiology. Am. J. Enol. Vitic. **36**, 1-10.
22. Ribereau-Gayon, P. (1985). New development in wine microbiology. Am. J. Enol. Vitic. **36**, 1-10.
23. Rosini, G., Federichi, F. and Martini, A. (1982). Yeast flora of grape berries during ripening. Microb. Ecol. **8**, 83-89.
24. Rozière, C., Raginel, F., Sánchez, C. et Strehaiano, P. (1989). Implantation de levures sélectionnées. Etude en site industriel de vinification. Rev. Fr. Oenologie **119**, 37-41.
25. Seehaus, T., Rodicio, R., Heinsich, J., Aguilera, H. D. and Zimmermann, F. K. (1985). Specific gene probes as tools in yeast taxonomy Curr. Genet. **10**, 103-110.
26. Snow, R. (1983). Genetic improvement of wine yeast. In: J. F. T. Spencer, D. M. Spencer and A. R. W. Smith (eds.). Yeast Genetics. Fundamental and applied aspects, pp. 439. Springer Verlag. New York.
27. Suárez, J. A. e Iñigo, B. (1990). Microbiología enológica. Fundamentos de vinificación. Mundi-Prensa. Madrid.
28. Van Vuuren, H. J. J. and Van der Meer, L. (1987). Fingerprinting of yeast by protein electrophoresis. Am. J. Enol. Vitic. **38**, 49-53.
29. Vezinhet, F., Blondin, B. and Hallet, J. N. (1990). Chromosomal DNA patterns and mitochondrial DNA polymorphism as tools for identification of enological strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **32**, 568-571.
30. Vezinhet, F. et Lacroix, S. (1984). Marquage génétique de levures: Outil de contrôle des fermentations en souches pure. Bull d'O. I. V. **643-644**, 759-773.

Manipulación genética de la síntesis de enzimas fúngicas de uso en industrias de alimentos

R. González, J. A. Pérez-González, L. Ventura, P. Sánchez, P. Sanz,
M. T. Fernández Espinar, S. Vallés, F. Piñaga y D. Ramón*

*Unidad de Bioingeniería de los Alimentos. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos.
Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Jaime Roig, 11. 46010 Valencia (España).*

Summary

Food industries use a great variety of enzymes as additives. The main percentage of them are produced by species of filamentous fungi. In this review we present the strategies to purify and overproduce this kind of enzymes using recombinant DNA techniques.

Key words: enzymes, purification, synthesis, recombinant DNA techniques.

Resumen

Las industrias de alimentos usan un gran número de enzimas como aditivos. Muchas de ellas son producidas por especies de hongos filamentosos. En esta revisión se presentan los distintos pasos encaminados a la purificación y sobreproducción industrial de algunas de estas enzimas utilizando técnicas de DNA recombinante.

Introducción

Producción de enzimas alimentarias: Una visión global del problema

El uso de enzimas como aditivos es una constante en muchas industrias de alimentos. El mercado mundial de estos compuestos mueve anualmente importantes cifras de dinero, siendo de destacar el hecho de que la producción industrial de los mismos se encuentra en manos de unas pocas compañías, en su mayoría europeas. Fundamentalmente las enzimas de mayor interés son las proteasas, con un 59 % del mercado de ventas, seguidas por las carbohidrasas, que constituyen un 28 % del mismo.

Los proyectos de investigación encaminados a la producción de este tipo de actividades enzimáticas presentan 2 problemas evidentes. Por un lado, la competencia que los grupos de investigación de las multinacionales del sector representan, y por otro, la necesidad de constituir equipos mixtos con tecnólogos de alimentos, microbiólogos, bioquímicos y biólogos moleculares. Para re-

(*) A quien debe dirigirse la correspondencia.

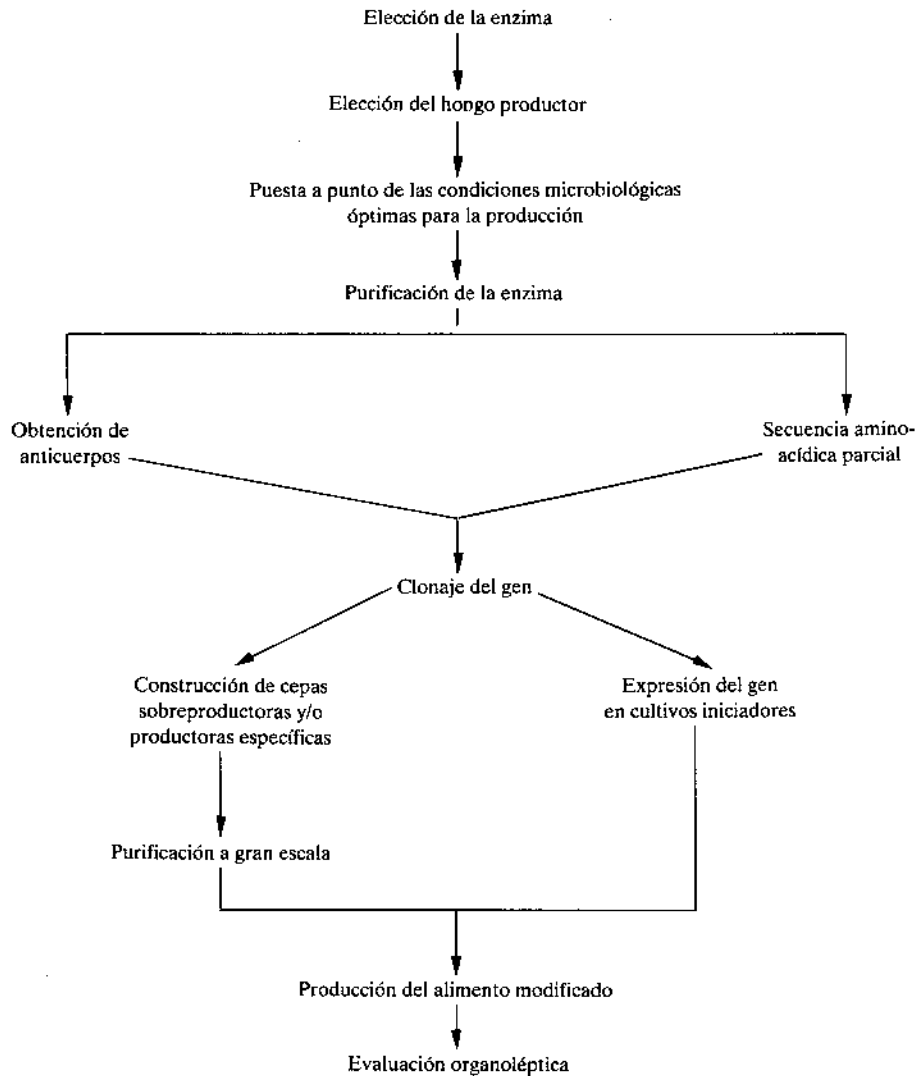


Fig. 1. Esquema de trabajo en la producción de enzimas.

solver el primer problema las únicas soluciones viables son o cooperar con los grandes grupos industriales o buscar actividades enzimáticas que, por su particular modo de acción, son originales en el sentido de innovación que este término conlleva. Para solventar el segundo problema es necesario disponer de un esquema eficaz de trabajo en el que las tareas estén divididas tanto en el tiempo como en el espacio. En resumen, cada miembro del equipo debe conocer su función y saberla encajar en el esquema.

Es difícil definir un esquema global de trabajo, ya que éste depende de la enzima objeto de estudio y del alimento en que se va a aplicar. Un esquema amplio aparece en la Figura 1. Evidentemente, todo el trabajo comienza con la elección por parte de un tecnólogo de alimentos de la enzima deseada. A partir de ahí será necesario encontrar un microorganismo que lo produzca, estudiar las condiciones de crecimiento en las que este microorganismo produce óptimamente la enzima y posteriormente purificar la misma. Este trabajo es propio de microbiólogos y bioquímicos.

Estos últimos deben obtener una fracción de la enzima lo suficientemente pura como para conseguir anticuerpos contra el mismo y/o información parcial sobre su secuencia aminoacídica. Tanto lo uno como lo otro serán herramientas valiosas en las manos de los biólogos moleculares que, o bien por escrutinio inmunológico o por escrutinio con sondas de DNA, clonarán el gen que codifica la enzima purificada. A partir de este punto, y dependiendo del alimento, se puede optar por 2 vías no excluyentes entre sí. Una común, sea cual fuere el tipo de alimento, es la producción masiva y económica de la enzima. Para ello habrá que construir cepas del microorganismo productor que o bien sobreproduzcan la enzima o bien la produzcan en condiciones más idóneas (producción específica) o baratas (medios de cultivo económicos). Esto implica un trabajo exhaustivo de biología molecular que en muchas ocasiones incluso requiere el desarrollo de sistemas de transformación genética. El final del proceso es la obtención de cepas manipuladas genéticamente a partir de las cuales purificar de forma rápida y económica la enzima deseada que se adicionará al alimento. Para este paso deben volver a intervenir los bioquímicos, aunque en esta ocasión los criterios de pureza deben ser mucho menos estrictos. La segunda vía alternativa es aplicable en aquellos alimentos que se producen por fermentación microbiana (cerveza, pan, vino, derivados lácteos, etc.). En este caso puede resultar más conveniente introducir los genes fúngicos en las levaduras o bacterias ácido-lácticas usadas como iniciadores y conseguir que se expresen y secreten los productos génicos. De esta forma el propio microorganismo produce la enzima, con lo que el proceso se abarata considerablemente. Ahora bien, el posible rechazo social al uso de alimentos producidos con microorganismos recombinantes puede originar dificultades en este tipo de estrategias. No por ello es una alternativa desdeñable, sino todo lo contrario, ya que sin lugar a dudas esta será la vía de futuro. En resumen, sea cual fuere la alternativa seguida, el resultado final es la producción de un alimento modificado por la actuación de una enzima. Este alimento presenta diferencias con respecto al original, por lo que se hace necesaria una evaluación organoléptica que tendrán que llevar a cabo tecnólogos de alimentos.

Nuestro grupo de trabajo está interesado en la sobreproducción de ciertas carbohidrasas. Estas enzimas son un grupo heterogéneo que abarca tanto actividades capaces de degradar la celulosa o la hemicelulosa como enzimas tales como las amilasas, capaces de degradar el almidón a glucosa. Las celulasas y hemicelulasas tienen un interés evidente en la fabricación de alimentos líquidos de origen vegetal, al formar tanto la celulosa como la hemicelulosa (arabano, xilano), hacen que producen problemas de filtración y estabilidad coloidal. Asimismo, estas mismas enzimas pueden ser de interés en la fabricación de alimentos como el pan o el vino, ya que al actuar sobre las paredes celulares de los tejidos del substrato vegetal producen cambios organolépticos en el producto final. En cuanto a las amilasas, es de todos conocido su uso en la producción de alimentos dietéticos con bajo contenido calórico, tan de moda en nuestros días. Tomando en cuenta todas estas consideraciones, nuestro trabajo durante los últimos 2 años se ha centrado en el estudio de 4 carbohidrasas: arabinasas, xilanasas, endoglucanasas y glucoamilasas.

Los hongos filamentosos constituyen el grupo microbiano idóneo en el que estudiar este tipo de enzimas. Las razones son obvias: por un lado, son muchas las especies fúngicas capaces de producir este tipo de enzimas, y por otro, lo hacen secretándolas con una eficacia extraordinaria que llega a ser en ocasiones del orden de 20 a 40 g de la enzima por litro de medio de cultivo. En nuestro trabajo con las enzimas reseñadas en el párrafo anterior hemos escogido 3 especies de hongos filamentosos: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus terreus* y *Trichoderma longibrachiatum*. Los 2 últimos son conocidos productores de actividades celulolíticas, hemicelulolíticas y amilolíticas. Por el contrario, *A. nidulans* no es un potente productor, pero es un modelo de estudio en el que se dispone de todas las técnicas básicas de manipulación genética, así como de una amplia colección de mutantes tanto en genes estructurales como reguladores. De esta forma, el estudio de la regulación de la síntesis de estas enzimas puede llevarse a cabo en *A. nidulans* y extrapolar las conclusiones en *A. terreus* y *T. longibrachiatum*.

TABLA 1
ARABINASAS Y XILANASAS PURIFICADAS EN EL HONGO
FILAMENTOSO *A. NIDULANS* (2, 6)

Enzima	Actividad	pI
ExoA	α -L-arabinofuranosidasa	3,3
EndoA	Endo-arabinasa	3,25
pI	α -L-arabinofuranosidasa	3,3
pII	Endo-arabinasa. Xilanasa	6,0
pIII	α -L-arabinofuranosidasa	3,5
Xil I	Xilanasa	6,5
Xil II	Xilanasa	3,5
Xil III	Xilanasa	3,5

En este trabajo pretendemos revisar los pasos necesarios en la sobreproducción de enzimas fúngicas de uso alimentario, ilustrándolos con los resultados de nuestro grupo de trabajo durante los 2 últimos años.

Optimización de las condiciones de producción. Purificación de las enzimas

Como antes se indicó, todo el trabajo comienza con la elección de una enzima y su purificación. Para ello es conveniente definir unas condiciones microbiológicas de cultivo óptimas para su producción. No es lo mismo purificar una enzima de un caldo de cultivo, en el que esta proteína representa un 10% del total de proteínas, que hacerlo de un medio de cultivo en el que, dadas unas especiales condiciones de inducción, estas enzimas sean mayoritarias.

Un ejemplo ilustrativo de esta estrategia lo constituye nuestra experiencia en la purificación de distintas actividades que degradan arabanos en *A. nidulans* (6). Estas enzimas son producidas a altos niveles en medios que contienen pulpa de remolacha como fuente de carbono. Sin embargo, en estas condiciones de cultivo aparecen otras muchas proteínas en el sobrenadante. Por el contrario, un compuesto de degradación de los arabanos, el arabitol, es un inductor específico de estas enzimas, de forma que en presencia de este compuesto todas las enzimas secretadas están implicadas en la degradación de arabanos y algunas de ellas constituyen más del 40% de la proteína extracelular. Hemos podido determinar una situación similar en el caso de la producción específica de xilanasas en *A. nidulans* al crecer este hongo en presencia de xilano como única fuente de carbono (2). En estas condiciones especiales de inducción la purificación es sencilla. De estos ejemplos es posible extraer una conclusión importante. Es necesario llevar a cabo trabajos básicos sobre la regulación de la síntesis de las enzimas, ya que ello puede constituir un importante primer paso de purificación.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de producción se debe purificar la enzima. El esquema de purificación dependerá en cada caso de la enzima, pero normalmente se basa en el empleo de precipitaciones selectivas con sulfato amónico, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrofóbica e isoelectroenfoque. Utilizando estas técnicas, recientemente nuestro grupo de trabajo ha llevado a cabo la purificación y caracterización físico-química y cinética de varias arabinasas y xilanasas de *A. nidulans* (Tabla 1).

A partir de este punto, la proteína purificada se utilizará para obtener anticuerpos o secuenciar el extremo amino terminal o fragmentos de digestión peptídica de la misma.

Clonaje de los genes

Los anticuerpos obtenidos en el apartado anterior se pueden usar para llevar a cabo un escrutinio inmunológico de genotecas de cDNA construidas en condiciones de inducción. En este sentido la información sobre la regulación de la síntesis de las enzimas vuelve a ser de extraordinario interés. Evidentemente también es posible llevar a cabo este escrutinio con oligonucleótidos sintéticos que codifiquen la secuencia aminoacídica obtenida a partir de la enzima purificada.

Si se dispone de información sobre la secuencia nucleotídica de genes similares clonados en otros hongos filamentosos es posible llevar a cabo un escrutinio por hibridación heteróloga. En nuestro trabajo con endoglucanasas y glucoamilasas hemos optado por esta vía. Se han clonado distintos genes de hongos filamentosos que codifican β -(1,4)-endoglucanasas (5). Un fragmento central de uno de ellos fue sintetizado en nuestro laboratorio mediante la técnica de PCR y dicho fragmento se utilizó como sonda frente a genotecas del hongo filamentoso *T. longibrachiatum*. Las señales positivas revelaron la presencia de un gen que denominamos *egl1*, y que codifica una endoglucanasa de interés en industrias cerveceras (4). El gen presenta 2 intrones de 61 y 123 bp y la proteína codificada tiene una masa molecular de 48341, con un péptido señal de 22 aminoácidos y 5 sitios putativos de glicosilación.

De forma similar se clonó mediante PCR un fragmento de un gen de *A. niger* que codifica una glucoamilasa (1). Este fragmento se usó como sonda frente a genotecas de *A. terreus*, dando lugar al clonaje de 2 genes que denominamos *gla1* y *gla2*, los cuales presuntamente codifican actividades glucoamilolíticas (L. Ventura *et al.*, en preparación).

Sobreproducción y/o producción específica de las enzimas en las cepas fúngicas

El disponer de los genes clonados nos permite diseñar construcciones y cepas en las que el gen que codifique la enzima se sobreproduzca o se produzca específicamente. Conceptualmente, la sobreproducción es fácil de comprender. Un aumento en el número de copias del gen, es decir, un aumento en la dosis génica, debe llevar en paralelo un aumento en la producción de la enzima. En cuanto a la producción específica, el cambio del promotor original del gen clonado por promotores mutados *in vitro* o por promotores de otros genes que respondan a señales muy específicas puede dar lugar a una sobreproducción o a una producción específica, respectivamente.

Teóricamente, estas tareas moleculares no son difíciles de realizar. Ahora bien, muchas veces tropiezan con el problema de que las nuevas copias del gen obtenidas *in vitro* deben ser reintroducidas en el organismo para que funcionen *in vivo*. Este hecho exige el disponer de sistemas de transformación genética para los hongos productores. Si bien existen protocolos de transformación para muchos hongos filamentosos, incluidas especies productoras de enzimas, para otros muchos hongos estos sistemas no existen (3). En este caso es necesario desarrollarlos. En nuestro trabajo con *A. terreus* y *T. longibrachiatum* nos enfrentamos con la falta de protocolos de transformación para estos microorganismos. Por ello hemos desarrollado sistemas que permiten la toma de DNA foráneo. En el caso de *A. terreus* se han desarrollado 2 métodos basados en la resistencia a higromicina B (7) y la complementación de un mutante auxótrofo en arginina (8). En el caso de *T. longibrachiatum* se ha desarrollado un sistema de resistencia a higromicina B (P. Sánchez *et al.*, en preparación). Mediante estos sistemas de transformación es posible introducir múltiples copias de los genes *egl1*, *gla1* y *gla2*, dando lugar a cepas que sobreproduzcan β -(1,4)-endoglucanasa o glucoamilasa, respectivamente.

En el caso de la producción específica hemos abordado 2 estrategias distintas. La primera de ellas se basa en la expresión del gen *egl1* de *T. longibrachiatum* bajo el control del promotor *alcA* de *A. nidulans* (D. Ramón *et al.*, en preparación). Este último gen codifica una alcohol deshidrogenasa que está sometida a represión por catabolito. Por el contrario, el gen se induce no sólo en

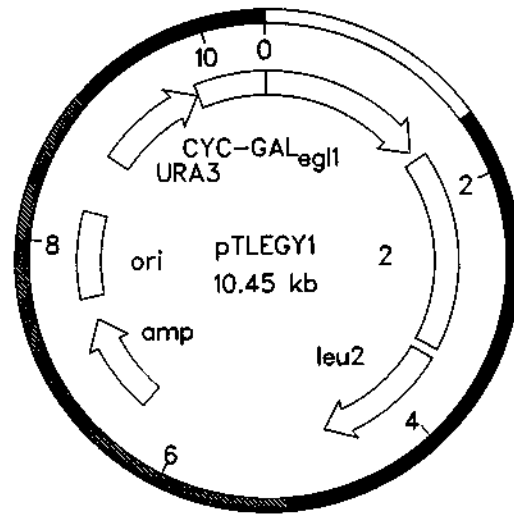


Fig. 2. Mapa físico del plásmido pTLEGY1.

presencia de etanol, sino también de otros inductores gratuitos más baratos, como la treonina. Por técnicas de PCR hemos puesto el gen *egl1* bajo el control de *alcA*. En presencia de fructosa y treonina *A. nidulans* no secreta apreciablemente proteínas. Por ello la introducción de este gen recombinante en *A. nidulans* dará lugar a cepas que en dichas condiciones de cultivo produzcan específicamente la endoglucanasa de *T. longibrachiatum*. Una estrategia alternativa ha consistido en la expresión del gen *egl1* en cepas de *S. cerevisiae*. Para ello hemos construido el cDNA del gen, ya que los intrones fúngicos no son procesados por la levadura, y lo hemos puesto bajo el control de un promotor fúngico inducible por galactosa (Fig. 2). La expresión de este gen en cepas de *S. cerevisiae* es inducible por galactosa y da lugar a la secreción de la endoglucanasa fúngica de una forma específica (4). En ambos casos la expresión en *A. nidulans* y en *S. cerevisiae* logra crear una situación fisiológica artificial en la que la proteína a purificar es si no la única apreciable, sí la mayoritaria en el medio de cultivo.

Expresión de los genes clonados en cultivos iniciadores

Como se comentó anteriormente, en los alimentos obtenidos por fermentación microbiana puede resultar interesante expresar directamente los genes clonados en los cultivos iniciadores. Dado que normalmente estos cultivos iniciadores son levaduras (vino, cerveza, pan) o bacterias lácticas (derivados lácteos), evidentemente es necesario no sólo trabajar con cDNAs de los genes en los que los intrones no estén presentes, sino también poner los genes clonados bajo el control de un promotor de la propia levadura o bacteria ácido-láctica.

En el caso del gen *egl1* hemos llevado a cabo construcciones en las que el gen se encuentra bajo el control de un promotor levaduriforme. Ya que en estos casos interesa una expresión fuerte y continua del gen (cuanto más enzima haya mejor), optamos por colocar el gen *egl1* bajo el control de un promotor fuerte y constitutivo. La elección se centró en el promotor de la actina, construyéndose por PCR un gen recombinante que aparece en la Figura 3. Con esta construcción se han transformado cepas de levaduras cerveceras, panaderas y vínicas que secretan la endoglucanasa fúngica (J. A. Pérez-González *et al.*, en preparación). El paso siguiente será la producción de los alimentos respectivos con estas nuevas cepas industriales.

En resumen, nos enfrentamos al comienzo de una nueva era en la tecnología de alimentos.

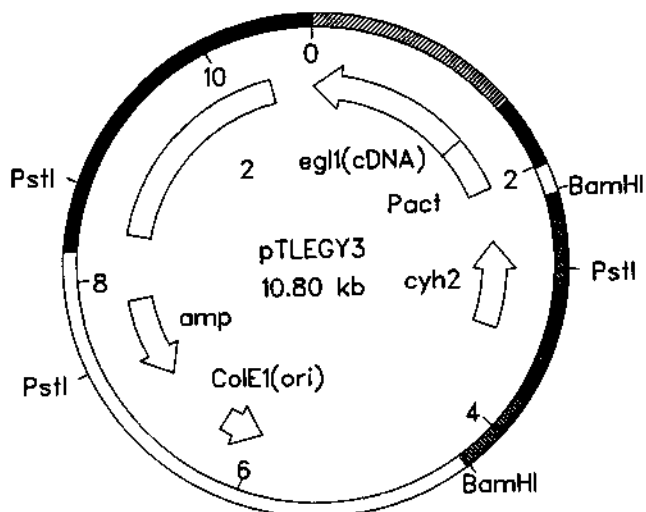


Fig. 3. Mapa físico del plásmido pTLEGY3.

Con el advenimiento de las nuevas técnicas del DNA recombinante y la creación de equipos mixtos, por primera vez el único límite al diseño racional de las cepas industriales será nuestra imaginación. Las herramientas están desarrolladas. Ahora sólo falta empezar a usarlas.

Agradecimientos

El trabajo de nuestro grupo es subvencionado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (Proyectos ALI90-0842, ALI90-1233-E y ALI91-0732). Los autores agradecen el constante apoyo del doctor A. Flors.

Bibliografía

1. Boel, E., Hjort, I., Svensson, B., Norris, F., Norris, K. E. and Fiil, N. P. (1984). Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. *EMBO J.* **3**, 1097-1102.
2. Fernández-Espinar, M. T., Ramón, D., Piñaga, F. and Vallés, S. (1992). Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **91**, 91-96.
3. González, R. y Ramón, D. (1990). La transformación genética de los hongos filamentosos. *Rev. Iberoam. Micol.* **7**, 43-49.
4. González-García, R., Ramón, D. and Pérez-González, J. A. Cloning, sequence analysis and yeast expression of *egl1* gene from *Trichoderma longibrachiatum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (En prensa.)
5. Penttillä, M., Lehtovaara, P., Nevalainen, H., Bhikhabhai, R. and Knowles, J. (1986). Homology between cellulase genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene. *Gene* **45**, 253-263.
6. Ramón, D., v. d. Veen, P. and Visser, J. Purification of arabinan degrading enzymes from *Aspergillus nidulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (En prensa.)
7. Ventura, L. and Ramón, D. (1991). Transformation of *Aspergillus terreus* with the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **82**, 189-194.
8. Ventura, L., Ramón, D. and Pérez-González, J. A. Isolation of an *Aspergillus terreus* mutant impaired in arginine biosynthesis and its complementation with the *argB* gene from *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* (En prensa.)

**LA INFORMATICA EN
MICROBIOLOGIA
DE ALIMENTOS**

Predictive modelling of growth, survival and inactivation of pathogenic and spoilage organisms in foods

T. A. Roberts

AFRC Institute of Food Research-Reading Laboratory, Earley Gate, Whiteknights Road, Reading, RG6 2EF

Introduction

Traditionally, microbiologists have attempted to understand food preservation via challenge tests. Differences between the microbiological status of the initial product and that after storage are interpreted by retrospective consideration of the physical and chemical conditions during storage. Such studies are slow, demand much laboratory analysis, are expensive, and most important, are only relevant to the product and conditions tested. Changes in formulation of the product or storage temperature necessitate repetition of the challenge test.

Food microbiology has been dominated by studies on commodities, without appreciation of the main factors controlling microbial growth. Many factors are claimed to be important without good evidence of their contribution e. g. competition between pathogens and the spoilage flora. Most foods are nutrient rich, and it has been shown that microbial growth is largely determined by a relatively small number of factors e. g. pH, a_w , temperature, atmosphere, particular organic acids.

Many consumers desire food they perceive as more natural, healthier and more convenient, causing the food industry to use lower heat processes to improve quality and lower levels of preservatives because chemical additives are regarded as undesirable. Consequently microbiological safety margins are reduced, and better hygiene and temperature control in manufacture and distribution are required to maintain safety. Such improved control demands clearer identification of the microbiological hazards inherent in food raw materials and a greater understanding of their responses to factors in products that determine their survival or growth.

In many countries changing eating patterns and technological developments in food production, processing and preservation have increased enormously the range of products available. Some products spend weeks in distribution and storage before being offered for sale alongside the fresh product. The food industry has developed novel products, modified formulations and devised alternative means of packaging, and there are pressures to extend even further the shelf-life of foods held under chill. There are continuing demands for longer shelf-life products, coupled with minimal heating and reduced, or no, preservatives/additives.

The extensive scientific literature on food microbiology lacks much information needed by the food industry to develop products that are microbiologically safe and shelf-stable.

Most foods are rich in nutrients for microbial growth. Microbes develop in response to physical and chemical conditions such as pH, available water, gaseous atmosphere, temperature, preservatives and other factors. Huge effort has been expended to define conditions that limit growth, because understanding those conditions appeared to proscribe conditions that would extend shelf-life and minimise growth of foodborne pathogens. Consequently, tables of «minimum» values of pH, temperature and water activity are available for key spoilage bacteria and pathogens.

Many stable and safe food products are now recognised to be the consequence of preservative factors acting in combination, often at levels which singly would not be inhibitory. Except where one, or sometimes two, factors limit microbial growth, our understanding of the relative contributions of factors in controlling microbial growth is poor.

The need for a new approach

Traditionally microbiologists have attempted to explain the differences between the initial product and the spoiled or toxic food by analysing the flora of the initial and stored commodities for numbers and types of microbes and/or their metabolites. Differences in numbers and types are interpreted by retrospective consideration of the physical and chemical conditions during storage. Information is obtained several days after the samples are analysed and the procedures are often lengthy, preventing action being taken before the food is distributed. The methodologies are not suited to modern decision-taking operations which may require, for example, data that can be used on-line in automated accept-reject systems.

Because experimental approaches and methodologies are not agreed universally, comparisons between laboratories are difficult, and data are often only relevant to the particular commodity and conditions tested. Microbiological evaluations of the wide, and everchanging, range of products, processes and storage conditions currently in the market place by applying traditional microbiological methods is impossible, and those data, too, would be relevant only to the products and processes investigated and would not provide a data base relevant and applicable to future products and circumstances.

The concept of «predictive microbiology» was proposed, growth responses of microbes of concern in foods being modelled with respect to the main controlling factors—initially temperature, pH and water activity. The effects of additional factors on growth could then be evaluated using that database.

We felt that if models relevant to broad categories of foods could be developed, this would reduce greatly the need for ad hoc microbiological examination of new food products and enable predictions of shelf-life and safety to be made speedily via a computerized database, with considerable benefit in the long term.

«Probabilistic» models

If the concern is toxin-production, models predicting the probability of that event can be used. Probabilistic models have been developed for proteolytic strains of *Clostridium botulinum* types A and B and predict the probability of toxin production from spores as a function of NaCl, sodium nitrite (input), heat treatment, the presence or absence of other preservatives and additives such as iso-ascorbate, polyphosphate or nitrate, and incubation (storage) temperature (Robinson *et al.*, 1982). Of the many factors tested, a few single factors (nitrite, incubation temperature, iso-ascorbate) were much more important in preventing toxin production than other factors acting alone or in combination. Comparison of data generated in the UK with similar data from the USA showed reassuringly similar trends. Similar probabilistic models have been published for non-proteolytic *C. botulinum* growing under conditions relevant to acid or acidified foods.

«Kinetic» models

A different type of model has been proposed for spoilage and other food-poisoning microbes to enable estimates of the lag and generation times to be calculated. The approach was developed

by modelling the growth responses of three salmonellae in a laboratory medium adjusted to a range of NaCl and pH levels and stored at a range of temperatures. Data collection is highly labour intensive, sometimes necessitating working throughout the night and at weekends to ensure the quality and quantity of data.

Individual growth curves for particular combinations of pH, salt and temperature are fitted and the derived curve parameters M (time to maximum growth rate) and B (relative growth rate at M) modelled as functions of salt, pH and temperature, using a quadratic polynomial. From the model a growth curve can be predicted for any combination of conditions within the limits of the experiment. Other parameters of interest, such as lag time, generation time can then be derived from the predicted curve. Subsequently this approach has proved successful with a range of food-borne pathogens.

The next step is to «validate» the model by comparing the predicted values for growth responses with values published in the literature, or, where those data are insufficient, by limited challenge tests in representative foods.

In the UK the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food is supporting the development of a models database, the data being generated at a number of institutes. The centralized database «Food MicroModel» will be accessible late in 1992 for models of growth responses, and extended in 1993/4 to include models of death and recovery after heat treatments.

A FLAIR Concerted Action is being led from the Institute of Food Research intending to involve other laboratories and institutes in Europe with the concept of modelling. A considerable part of the FLAIR programme involves spoilage microbes and it is hoped that a European models-base will result.

The greatest advantage of models is that they can be used to test the consequences of changing a number of factors at the same time and, with the power of modern computers, the answers are almost instantaneous. Even if the predictions are not precise and only indicate a trend, knowing that trend quickly is highly advantageous during product reformulation or when modifying or evaluating storage conditions.

Care must be taken that the model includes all the controlling factors exerting an effect in the foods in question. Initially there will be suspicion that models generated experimentally in laboratory media may not reflect an organism's behaviour in a food, but after three years' experience we are learning in which food categories the microbes follow the predicted growth responses and which types of foods are exceptions to the rule.

In recent months we have developed at IFR a PC-based version of modelling which uses a spreadsheet and linked graphics.

Given validated models for the key microbes associated with food-borne illness, and eventually with spoilage, product formulation, packaging and storage conditions can be designed to provide a microbiologically safe product of defined shelf-life. Kinetic models have so far been based on viable counts but alternative measures of growth are being explored and should speed the production of more sophisticated models.

La informática en microbiología de alimentos: Aplicaciones en la identificación de microorganismos

Miguel Prieto Maradona

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. 24071 León.

Summary

Recent progress in analytical procedures (chemotaxonomy, molecular biology) and its contribution to the development of microbial Systematics and Identification have been examined. The benefit that these techniques have gained from the technological progression experienced by computer hardware and software (artificial intelligence and numerical taxonomy) and the improvement in tools for the study of characteristics and interrelationships between microorganism are also reported.

Key words: microbial identification, computers.

Resumen

En este trabajo se lleva a cabo una revisión de cómo los recientes avances en técnicas analíticas (taxonomía química, biología molecular) han contribuido al desarrollo de la sistemática bacteriana, y más concretamente a una de sus ramas, identificación, y cómo estos procedimientos se han aprovechado del avance tecnológico experimentado en los últimos tiempos por los equipos y programas informáticos (inteligencia artificial, taxonomía numérica) para poner al servicio del microbiólogo instrumentos de estudio de las características y de las interrelaciones entre los microorganismos.

Introducción

Identificación se define como el proceso mediante el cual se asigna un elemento (desconocido), representado por un conjunto de caracteres, a una categoría (grupo taxonómico) encuadrada en una clasificación previa establecida y nominada. Es un proceso secundario en el tiempo que presupone la existencia de información, adecuadamente catalogada, sin la cual el proceso de asignación resulta infructuoso (2, 25). Clasificación (en ocasiones denominada taxonomía) e identificación forman, juntamente con la nomenclatura (el proceso de asignar nombres a los grupos taxonómicos), lo que es conocido como sistemática (el estudio de la diversidad y los vínculos entre los organismos) (2, 36).

Entre los elementos comunes en todo proceso de asignación tenemos:

- Conjunto de caracteres que definen el elemento desconocido.

- Librería o base de datos donde se ordena la información referente a los diferentes grupos taxonómicos.
- Reglas, procesos que se tienen en cuenta al hacer la asignación entre grupo taxonómico y elemento desconocido.
- Por último, parámetros que miden el grado de semejanza, resultado de la interacción entre los dos primeros elementos.

La validez del procedimiento de identificación dependerá, además de la clasificación previa, de la cantidad y calidad de los atributos utilizados en la caracterización. Por tanto, el investigador debe contar con la posibilidad de errores en la información existente o en la clasificación previa, así como con la necesidad de adquirir un número suficiente de datos.

La aparición del ordenador cambió y continúa cambiando todo nuestro estilo de vida. Algunos pueden argumentar que lo que se ha presentado como una descarga en tareas para los humanos, en realidad ha sustituido unas ocupaciones por otras. Una de estas últimas es la necesidad de actualización que impone su continuo progreso, que provocará que temas presentados en esta contribución como futuristas en poco tiempo se consideren superados.

Los últimos avances en el campo de la microinformática se encuentran tanto en los soportes físicos (hardware) como lógicos (software). Entre los primeros citaremos el incremento en la velocidad de proceso de datos (con ordenadores de sobremesa o estaciones de trabajo alcanzando valores de 100 megaflops), el aumento en la capacidad de almacenamiento (los actuales discos ópticos permiten archivar del orden de varios gigabytes con tiempos de acceso competitivos), los sistemas de captura de imágenes de alta resolución (escáneres con resolución de imagen de varios megapixels) y los sistemas de comunicación y adquisición de datos a partir de equipos analíticos (GPIB, VXI, RS-232, tarjetas de adquisición de datos) disponibles para todo tipo de sistemas. En el terreno del software destacan el desarrollo de potentes paquetes estadísticos en versión para ordenador personal (Clustan, SPSS, BMDP, MVSP, NTSYS), sistemas operativos sin limitaciones de memoria dotados de interfases gráficos (UNIX, Windows, OS/2, Macintosh OS) y la progresión de nuevas técnicas dentro de la inteligencia artificial (sistemas expertos y redes artificiales neuronales). Todos estos factores (juntamente con la disponibilidad de los ordenadores en los laboratorios de microbiología) los hacen un instrumento imprescindible y realmente eficaz en esta tarea de asignación. Su evolución tecnológica no ha finalizado y los previsibles avances en memorias de acceso aleatorio ultrarrápidas, sistemas de almacenamiento masivo y microprocesadores con arquitectura paralela incrementarán más aún su eficiencia.

Otro campo en constante evolución lo constituye el análisis de imágenes. Su aplicación al estudio de geles de electroforesis (proteínas, ácidos nucleicos) permite facilitar la adquisición de imágenes, obviar la subjetividad en la interpretación de datos y digitalizar la imagen. Sistemas de este tipo, como Bio Image, GS-250 Molecular Imager o MasterScan, aportan asimismo herramientas para el análisis, reconocimiento y comparación de modelos. Básicamente los equipos constan de un densitómetro que mide la densidad óptica (señal analógica), transformándola en una señal digital, conectado a un ordenador que almacena los datos y eventualmente los analiza. Las aplicaciones disponibles se encaminan al estudio de perfiles de geles en cero, una y dos dimensiones, la secuenciación automática de ADN, la manipulación, almacenamiento y comparación de imágenes a alta velocidad (17). Aún quedan por perfeccionar aspectos como la estandarización y reproducibilidad en la confección y lectura de geles [Vauterin, L. y Vauterin, P. (1992). 3rd Conference on Taxonomy and Automated Identification of Bacteria. pp. 19-22].

Caracteres utilizados

Los caracteres que se usan en identificación microbiana son reflejo, en definitiva, de la infor-

mación genética a diferentes niveles de expresión y abarcan todas las facetas de la célula microbiana:

- Técnicas que determinan diversas propiedades del genoma o su propia composición.
- Pruebas dirigidas a estudiar proteínas, su secuencia aminoacídica, caracterización enzimática.
- Pruebas que analizan otros componentes de la célula (quimiotaxonomía: ácidos grasos, azúcares, citocromos, compuestos de la pared celular, productos de la pirólisis, etc.).
- Finalmente, tests que examinan otros rasgos fenotípicos (morfología, fisiología, bioquímica) (27).

Entre las técnicas susceptibles de automatización y de uso conjunto con ordenadores, resaltaríamos:

- Cromatografía de gas o gas/líquido de ácidos grasos celulares (Microbial Identification System) (13, 40), monosacáridos (34), productos finales del metabolismo, productos de pirólisis.
- Espectrometría de masas de productos de la pirólisis (Pyrolysis Mass Spectrometry).
- Espectroscopia infrarroja con transformación de Fourier (Fourier-transform infrared spectroscopy) [18; Anderson, T. R., Nivens, D. E. and White, D. (1992). Abstracts of the 92nd General Meeting of the American Society for Microbiology, p. 357].
- Electroforesis de enzimas multilocus [8; Rorvik, L. M., Kolstad, J. and Caugant, D. A. (1992). Abstracts of the XIth International Symposium on Problems of Listeriosis, pp. 55-56], en gel de dodecil sulfato sódico-gel de poliacrilamida (39) (SDS-PAGE), análisis de los polimorfismos en electroforesis con fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polimorphism Analysis, RFLP) (20), electroforesis de fragmentos obtenidos usando iniciadores aleatorios para PCR (Arbitrarily Primed PCR) (41, 42).

Por regla general, según nos acercamos al nivel de expresión básico (genético), aumenta la exactitud con la que se analiza el elemento desconocido, la complejidad de las pruebas y también la información disponible (expresada en forma binaria, multiestado o cuantitativa), haciendo indispensable la utilización de medios adecuados de transferencia, almacenamiento y análisis de datos (4). Particularmente complicados son los resultados de análisis de cromatografías y espectrometrías, que obligan al uso de métodos numéricos complejos. No obstante, no siempre interesa obtener la máxima información, y son muchas las circunstancias que determinan la elección de las técnicas analíticas y los sistemas utilizados en identificación.

Mecanismos de asignación

Entre los mecanismos usados (claves dicotómicas, métodos numéricos, redes neuronales, sistemas expertos basados en marcos), los métodos numéricos (probabilísticos, análisis multivariante) han constituido hasta ahora el enfoque habitual al problema de la identificación (2). Una característica determinante es el uso que estos métodos hacen de la información. A diferencia de las claves dicotómicas, en las que un carácter o propiedad puede tener importancia decisiva a la hora de definir los taxones, los sistemas numéricos basan su análisis en el estudio conjunto de un número suficientemente grande de caracteres, otorgando *a priori* el mismo peso a todos ellos y disminuyendo o evitando con ello la posibilidad de error final (19).

Gracias al uso de funciones probabilísticas basadas en el teorema de Bayes (5, 19, 28) se consigue una estimación estadística de la semejanza del elemento desconocido respecto de los taxones de la base de datos, basada en los porcentajes de positividad de dichos taxones para distin-

tas pruebas. Estos sistemas pueden aprovechar la gran difusión experimentada por los sistemas miniaturizados, y aún presentando inconvenientes (principalmente debido al uso de propiedades fenotípicas, lo cual conlleva una limitación en el aporte de información de la célula), sus ventajas (sencillez, economía, bases de datos accesibles) los han mantenido como opción válida, y prueba de ello es la reciente aparición de nuevos sistemas miniaturizados (3, 6, 15, 22, 32, 38) y automatizados (24, 37), matrices de probabilidades procedentes de análisis numéricos (12) y programas de análisis de estas matrices (11, 26).

Los análisis multivariantes de datos (cuantitativos o cualitativos), aunque primeramente dirigidos hacia la clasificación microbiana, pueden utilizarse en identificación, disponiendo de convenientes técnicas de normalización y transformación de datos, así como de agrupamiento (jerárquico y no-jerárquico) y discriminación. Se definen también como técnicas de reconocimiento de patrones y tienen como fin el encontrar posibles relaciones entre los objetos o grupos taxonómicos, desarrollar procedimientos de predicción, clasificación e identificación y reconocer los elementos extraños (23). Se considera el valor de cada variable o propiedad (un número mínimo de 50 deben estudiarse) como una coordenada en el espacio multidimensional euclídeo, y por medio de técnicas numéricas se calcula primero la distancia existente entre todos ellos y se reduce el número de coordenadas a un valor representable gráficamente (2 ó 3).

Los análisis multivariantes jerárquicos (análisis cluster) constituyen el grupo más utilizado en taxonomía numérica por existir numerosos algoritmos (single linkage, average linkage, Ward, etc.) y por producir clasificaciones que agradan al taxonomista al generar grupos compactos, anidados, con categorías en gradación (dendigramas) (21). En el caso de los no jerárquicos (análisis de componentes principales, análisis de coordenadas principales, análisis de factores múltiples, análisis de correlaciones canónicas, etc.), éstos permiten realizar una representación de los elementos (cepas) sin producir una clasificación típica: los elementos presentes en los diagramas de 2 ó 3 dimensiones tienen que agruparse visualmente o bien se trabaja con grupos previamente establecidos (1). Este método hace posible descubrir relaciones que podrían quedar ocultas al utilizar los agrupamientos jerárquicos (2), por lo que un uso conjunto de ambos métodos es conveniente al aportar información desde distintos puntos de vista. Otro grupo de técnicas multivariantes más orientadas a la identificación y que utilizan datos cuantitativos los componen el análisis discriminante, el SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy), y el KNN (K-Nearest Neighbor). Se denominan también métodos de aprendizaje supervisados, y su objetivo es entrenar al ordenador para reconocer grupos definidos mediante datos categorizados y determinar su separabilidad (4, 23).

Los resultados que arrojan procedimientos analíticos, tales como las electroforesis, cromatografías o espectrometrías, con abundancia de variables cualitativas y/o cuantitativas, mantienen a ambas técnicas numéricas como método de elección también en la actualidad. En la electroforesis, el análisis cluster para establecer las relaciones genéticas se hace a partir de una matriz de semejanzas confeccionada, teniendo en cuenta las bandas de migración presentes y ausentes. En el caso de las espectrometrías, mediante parametrización de los datos del espectro (18). Respecto a las cromatografías, los métodos varían, pero generalmente se basan en la identificación de los picos y comparación de perfiles con bases de datos mediante métodos multivariantes no jerárquicos. Existen diversos coeficientes de semejanza (expresada como similitud o distancia) entre los elementos analizados. Por regla general, se utilizan los coeficientes de distancia para los análisis no jerárquicos (distancia euclídea y sus variaciones, chi-cuadrado, etc.) y de similitud (Sneath, Jaccard, Dice, etc.) para el jerárquico. El lector puede encontrar una revisión de programas informáticos que disponen de estos métodos estadísticos (medidas de similitud y métodos de agrupamiento) en los trabajos de Sackin (35), Pigott y Sharman (33) y Jacobsen y Gunderson (21).

En el caso de secuencias de ADN, ARN o proteínas, el tipo de datos obtenido obliga a utilizar otros métodos de cálculo de similitudes. Los programas de comparación de secuencias más

populares son FASTN, FASTP y FASTA (31). Están disponibles en varios entornos operativos (UNIX, VAX/VMS, Macintosh y MS DOS) y permiten la comparación entre secuencias ofreciendo diversos índices de similitud, aunque no todos tienen significación biológica. El paquete de análisis genético GCG (Genetics Computer Group, disponible en torno VAX/VMS) posee también módulos para alineación y cálculo de homologías. Existen otros programas de dominio público para biología molecular que pueden conseguirse de las múltiples (900) localizaciones Internet [presentes en las redes EARN (European Academic Research Network) u otras redes homólogas existentes en otros continentes] utilizando el llamado Protocolo de Transferencia de Ficheros (FTP).

Los métodos de búsqueda de homología entre secuencias pueden utilizar procedimientos exhaustivos (lo cual requiere un gran tiempo de computación, proporcional al tamaño de la secuencia problema) o bien algoritmos que sacrifican la fidelidad a cambio de una mayor rapidez (normalmente intentan encontrar un pequeño fragmento y luego analizan el resto de la secuencia); ahora bien, el desarrollo en la tecnología de ordenadores con arquitectura paralela paliará este escollo. Los resultados procedentes de análisis de homologías pueden ser posteriormente tratados por procedimientos numéricos como el análisis cluster, con lo que obtendremos al final una representación gráfica en forma de dendrograma mostrando las relaciones entre los microorganismos examinados (30).

Las bases de datos PIR (Protein Information Resources), Swiss-Prot, DDBJ (DNA Data Bank of Japan), GenBank (GenBank Genetic Sequence Data Bank) y EMBL (European Molecular Biology Laboratory Nucleotide Sequence Data Library) albergan numerosa información de secuencias biológicas (proteínas y ácidos nucleicos). Para acceder a estas bibliotecas se utiliza la red EARN a la que están conectadas la mayoría de las universidades europeas (en un futuro próximo estas bases de datos estarán disponibles en soporte CD-ROM). Aunque tienen que superarse algunos problemas (las técnicas de secuenciación deben simplificarse y los costes disminuir), es preciso contar con bases de datos suficientemente amplias; por otra parte, conforme las bases de datos van creciendo se necesitan procesadores con más capacidad y velocidad capaces de atender a más usuarios —actualmente el tiempo de procesado de una cadena de 250 bases puede ser de 5 a 10 minutos—, puede vislumbrarse un futuro en el que la identificación microbiana se lleve a cabo contrastando el fragmento problema con las secuencias almacenadas. En el presente sólo se dispone en las bases de datos arriba mencionadas de fragmentos secuenciados pertenecientes a un pequeño número de microorganismos (principalmente patógenos u otros microorganismos de importancia). El análisis de la secuencia del ARN ribosomal de 16S parece ser especialmente útil (desde el punto de vista de identificación y también desde el filogenético), ya que este fragmento parece no haber estado bajo una gran presión evolutiva y las variaciones en ciertas regiones o dominios entre taxones próximos son mínimas o inexistentes, ampliándose aquéllas en otras regiones al alejarse los objetos taxonómicos en la escala evolutiva (2, 43). Además, puede ser particularmente útil en el caso de microorganismos difíciles de cultivar (43). No obstante, se han encontrado discrepancias (14, 30) al comparar los resultados de la ribotipia con otros métodos de análisis filogenético (hibridación del ADN).

Los sistemas expertos, en sus diferentes variedades, se configuran como una poderosa herramienta en la elección de técnicas y en la interpretación de los resultados, y se prestan a un uso conjunto con los métodos numéricos (9). Hasta ahora las aplicaciones se han centrado en el tratamiento de pruebas fenotípicas [9, 16; Bryant, T. N. and Brammer, R. J. (1992). 3rd Conference on Taxonomy and Automated Identification of Bacteria, pp. 78-81]. Su aplicación parece también importante en métodos donde la información referente a diferencias entre taxones no proviene de matrices de probabilidades (4).

Las redes neuronales (artificial neural networks) constituyen un campo de la inteligencia artificial en desarrollo y sus características más señaladas son la simulación del razonamiento huma-

no y su capacidad de aprendizaje, así como la tolerancia a datos falsos o difusos (7). Aunque pueden usarse en aparatos convencionales, el proceso se enlentece enormemente cuando el número de conexiones aumenta, por lo que se debe implementar en ordenadores paralelos. Un aspecto en el que las redes neuronales van a encontrar aplicación es en el análisis de imágenes, ya que la naturaleza de los datos (fuzzy) los hace especialmente aptos para ser tratados de esta manera. Rataj y Schindler (34) presentan un prototipo de red neuronal multicapa con capacidad de tratamiento de valores atípicos o erróneos. Aunque estos autores han utilizado un conjunto reducido de taxones y pruebas fenotípicas, los resultados parecen prometedores. La efectividad de un sistema de identificación no sólo se valora por la correcta asignación del elemento desconocido a uno de los taxones incluidos en la base de datos (aquel con el que existe mayor similitud), sino también por la capacidad de reconocer aquellos elementos extraños que no se encuentran representados en la mencionada base de datos. En este sentido las redes neuronales muestran una explícita ventaja sobre otros métodos, pero su aplicación no parece próxima.

Conclusiones

La variedad de técnicas analíticas y procedimientos de estudio matemático existentes ofrece múltiples posibilidades en el terreno de la identificación. En un futuro cercano, si los aparatos se hacen asequibles, tendrán un lugar en los laboratorios de microbiología dedicados a cualquiera de las parcelas de la sistemática. La elección de las herramientas dependerá de la disponibilidad de factores, tales como dinero, medios, personal y requerimientos como rapidez, precisión o grupo taxonómico a estudiar. No obstante, cualquiera que sea la opción elegida, dada la tendencia general en los laboratorios hacia la automatización, la información a disposición del investigador se ha incrementado enormemente y se hace indispensable disponer de equipos informáticos con apropiadas conexiones con los equipos de análisis. Los programas encargados de analizar esta información, aunque mejoran día a día en facilidad de manejo, potencia y posibilidades, seguirán necesitando de personal experimentado a su cargo.

Aspectos a mejorar son el desarrollo de bases de datos con información variada de microorganismos importantes en el campo de la microbiología de alimentos, el establecimiento de estándares, la normalización de técnicas, así como la conexión entre distintos sistemas informáticos con el objetivo de hacer la información accesible a la comunidad científica. Otros puntos que necesitan perfeccionarse son la integración y reconciliación de la información a diferentes niveles de expresión (genotípica, quimiotaxonómica, fenotípica) (36).

Bibliografía

1. Anderson, G. (1985). The application and relevance of nonhierarchical methods in bacterial taxonomy. *In: M. Goodfellow, D. Jones and F. G. Priest (eds.). Computer-Assisted Bacterial Systematics (Society for General Microbiology Special Publication no. 15) pp. 227-263. Academic Press, London, New York.*
2. Austin, B. and Priest, F. (1986). *Modern Bacterial Taxonomy.* Van Nostrand Reinhold Co. Ltd. Molly Millars Lane, Wokingham, Berkshire, U. K.
3. Bannerman, E., Yersin, M. N. and Bille, J. (1992). Evaluation of the Organon-Teknika MICRO-ID LISTERIA system. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2011-2015.
4. Bascomb, S. (1989). Computers in taxonomy and systematics. *In: T. N. Bryant and J. W. T. Wimpenny (eds.). Computers in Microbiology: a Practical Approach pp. 65-102. IRL Press, Oxford.*
5. Bascomb, S., Lapage, S. P., Curtis, M. A. and Willecox, W. R. (1973). Identification of bacteria by computer: identification of reference strains. *J. Gen. Microbiol.* **77**, 291-315.
6. Bille, J., Catimel, B., Bannerman, E., Jacquet, C., Yersin, M. N., Caniaux, J., Monget, D. and Rocourt, J. (1992). API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1857-1860.

7. Boddy, L., Morris, C. W. and Wimpenny, J. W. T. (1990). Introduction to neural networks. *Binary* **2**, 179-185.
8. Boerlin, P., Peter, O., Bretz, A. G., Postic, D., Baranton, G. and Piffaretti, J. C. (1992). Population genetic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates by multilocus enzyme electrophoresis. *Infect. Immunol.* **60**, 1677-1683.
9. Brammer, R. J., Bryant, T. N. and May, J. H. R. (1991). Investigation of an expert systems approach to bacterial identification. *Comput. Applic. Biosci.* **7**, 461-469.
10. Bratchell, N., O'Donnell, A. G. and MacFie, H. J. H. (1989). *In*: T. N. Bryant and J. W. T. Wimpenny (eds.) *Computers in Microbiology: a Practical Approach*, pp. 41-63. IRL Press, Oxford.
11. Bryant, T. N. (1991). Software for the development and evaluation of probabilistic identification matrices. *Comput. Applic. Biosci.* **7**, 189-193.
12. Carnahan, A. M., Joseph, S. W. and Janda, J. M. (1989). Species identification of *Aeromonas* strains based on carbon substrate oxidation profiles. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 2128-2129.
13. Decallone, J., Delmee, M., Wauthoz, P., El Lioui, M. and Lambert, R. (1991). A rapid procedure for the identification of lactic acid bacteria based on the gas chromatographic analysis of the cellular fatty acids. *J. Food Protect.* **54**, 217-224.
14. Fox, G. E., Wisotzky, J. D. and Jurtschuk, P. Jr. (1992). How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 166-170.
15. Freney, J., Duperron, M.T., Courtier, C., Hansen, W., Allard, F., Boeufgras, J. M., Monget, D. and Fleurette, J. (1991). Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 38-41.
16. Gavini, F., Lefebvre, B., Hamze, M. and Izard, D. (1990). Development of an expert system for bacterial identification: study of a prototype for identifying beta-galactosidase positive enterobacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 93-99.
17. Hader, D. P. and Kauer, G. (1990). Image analysis techniques for automatic evaluation of two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **11**, 407-415.
18. Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G. and Naumann, D. (1991). Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 67-79.
19. Holmes, B. and Hill, L. R. (1985). Computers in diagnostic bacteriology, including identification. *In*: M. Goodfellow, D. Jones and F. G. Priest (eds.), *Computer-Assisted Bacterial Systematics* (Society for General Microbiology Special Publication no. 15). Academic Press, London and New York, pp. 265-287.
20. Howard, P. J., Harsono, K. D. and Luchansky, J. B. (1992). Differentiation of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* and *Listeria seeligeri* by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 709-712.
21. Jacobsen, T. and Gunderson, R. W. (1986). Applied cluster analysis. *In*: J. R. Piggot (ed.), *Statistical Procedures in Food Research*, pp. 361-408. Elsevier Applied Science, London, New York.
22. Jenkins, S. A., Drucker, D. B., Keaney, M. G. L. and Ganguli, L. A. (1992). Evaluation of the RAPID ID 32A for the identification of *Bacteroides fragilis* and related organisms. *J. Appl. Bacteriol.* **71**, 360-365.
23. Jeon, I. J. (1991). Pattern recognition techniques for food research and quality assurance. *In*: D. Y. C. Fung and R. W. Matthews (eds.), *Instrumental Methods for Quality Assurance in Foods*, pp. 271-298. Marcel Dekker Inc., New York.
24. Klinger, J. M., Stowe, R. P., Obenhuber, D. C., Groves, T. O., Mishra, S. K. and Pierson, D. L. (1992). Evaluation of the Biolog automated microbial identification system. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2089-2092.
25. Krieg, N. R. and Holt, J. G. (eds.) (1984). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, London.
26. Langham, C. D., Sneath, P. H. A., Williams, S. T. and Mortimer, A. M. (1989). Detecting aberrant strains in bacterial groups as an aid to constructing databases for computer identification. *J. Appl. Bacteriol.* **66**, 339-352.
27. Lányi, B. (1987). Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *In*: R. R. Colwell and R. Grigorova (eds.), *Methods in Microbiology*. Vol. 19, pp. 1-67. Academic Press, London.
28. Lapage, S. P., Bascomb, S., Willcox, W. R. and Curtis, M. A. (1973). Identification of bacteria by computer: general aspects and perspectives. *J. Gen. Microbiol.* **77**, 273-290.
29. Martínez-Murcia, A. J., Benlloch, S. and Collins, M. D. (1992). Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 412-421.
30. Pearson, W. R. and Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2444-2448.
31. Piccolomini, R., Girolamo, A., Catamo, G., Cellini, L., Allocati, N. and Ravagnan, G. (1991). Enterosystem 18-R: description and comparative evaluation with conventional methods for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 2300-2304.
32. Piggott, J. R. and Sharman, K. (1986). Methods to aid interpretation of multidimensional data. *In*: J. R. Piggot (ed.), *Statistical Procedures in Food Research*, pp. 181-232. Elsevier Applied Science, London, New York.
33. Rataj, T. and Schindler, J. (1991). Identification of bacteria by a multilayer neural network. *Binary* **3**, 159-164.
34. Rizzo, A. F., Korkeala, H. and Mononen, I. (1987). Gas chromatography analysis of cellular fatty acids and neutral monosaccharides in the identification of lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2883-2888.
35. Sackin, M. J. (1987). Computer programs for classification and identification. *In*: R. R. Colwell and R. Grigorova (eds.), *Methods in Microbiology*. Vol. 19, pp. 459-494. Academic Press, London.

36. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (1991). Introduction. *In*: E. Stackebrandt and M. Goodfellow (eds.). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. XIX-XXIV. John Wiley and Sons Ltd. Sussex, U. K.
37. Stager, C. E. and Davis, J. R. (1992). Automated systems for identification of microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**, 302-327.
38. Torok, T. and King, A. D. J. (1991). Comparative study on the identification of food-borne yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1207-1212.
39. Vandamme, P., Pot, B. and Kersters, K. (1991). Differentiation of campylobacters and *Campylobacter*-like organisms by numerical analysis of one-dimensional electrophoretic protein patterns. *Syst. Appl. Bacteriol.* **14**, 57-66.
40. Welch, D. F. (1991). Applications of cellular fatty acid analysis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 422-438.
41. Welsh, J., Pretzman, C., Postic, D., Saint-Girons, I., Baranton, G. and McClelland, M. (1992). Genomic fingerprinting by arbitrarily primed Polymerase Chain Reaction resolves *Borrelia burgdorferi* into three distinct phyletic groups. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 370-377.
42. Welsh, J. and McClelland, M. (1991). Genomic fingerprinting using arbitrarily primed Polymerase Chain Reaction and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nucleic Acid Res.* **19**, 5275-5279.
43. Wilson, K. H. (1992). New vistas for bacteriologists. *ASM News* **58**, 318-321.

Diseño de experimentos y tratamiento de datos en microbiología de alimentos

Emilio A. Carbonell

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Apartado Oficial. 46113 Moncada. Valencia.

Summary

A discussion on the problems associated with designing experiments in Food Microbiology research is presented. After defining what is meant by Design of an Experiment, a series of questions are raised that, once answered, will help in properly designing the experiment. It is emphasized the chain research-design-model-analysis-design and the danger in blindly using well-known designs and canned programs.

Key words: design of experiments, statistics, ANOVA.

Resumen

Se presenta una discusión sobre los problemas asociados al diseño de experimentos en microbiología de alimentos. Después de definir lo que se entiende por «diseño de experimentos», se pasa revista a una serie de preguntas que es necesario plantearse antes de iniciar cualquier experimento. De la contestación adecuada a tales preguntas se deducirá qué diseño es el más adecuado. Se pone énfasis en la relación problema-diseño-modelo-análisis-diseño y en los peligros de la utilización «a ciegas» de los diseños y programas enlatados de ordenador.

El diseño de un experimento consiste en los pasos *previos* a la realización del experimento, dirigidos a asegurar que los datos se obtengan de tal modo que permitan realizar un análisis objetivo encaminado a efectuar generalizaciones válidas con respecto al problema planteado.

Al iniciar un experimento, el investigador, junto con el estadístico, debe:

1. Definir claramente los objetivos inherentes al problema: construye la estructura de los tratamientos para proporcionar las respuestas a los problemas (fase de concepción).
2. Determinar los recursos experimentales disponibles: caracteriza la estructura de similitud o diferencia entre las unidades experimentales (fase de recursos).
3. Finalmente, hacer compatibles ambas acciones, reconociendo y teniendo muy en cuenta las restricciones prácticas (fase de diseño). Una amplia discusión sobre estas fases se puede encontrar en (4).

Antes de comenzar el experimento se debe especificar claramente el problema y las preguntas que la investigación debe contestar; es decir, lo que podría denominarse los «contrastes de interés» (6, 7). Por otro lado, es necesario hacer una reflexión sobre los puntos anteriores estructurándolos mediante una serie de preguntas cuyas contestaciones ayudarán a diseñar correctamente el experimento. Diversos autores han presentado su visión sobre este tema (1, 5), de modo que un conjunto mínimo de ellas debería ser:

- a) *¿Qué variable(s) identifica(n) el problema?* Se debe decidir cuántas y qué variables definen el problema propuesto. En primer lugar, cuántas; es decir, si se trata de un problema uni o multivariable. Si, por ejemplo, se está haciendo una tipología de las mieles de una cierta región española en relación a su calidad, la variable «calidad» se identificará con varias variables, como color, humedad, pH, turbidez, acidez libre, presencia de azúcares, etc. En otro caso, podría definirse univariadamente como el resultado de un panel de degustadores. Si se está estudiando la severidad de un ataque de hongos sobre una fruta, debe decidirse si se medirá el diámetro, el área o el número total de lesiones mayores de un cierto grado.
- b) *¿Cómo ha de cuantificarse la variable?* Definida(s) la(s) variable(s), es necesario dotarla(s) de unos valores que podrán ser cuantitativos o cualitativos. Así, en el caso del panel de degustación es necesario definir el rango de puntuaciones deseado. Si se determina la densidad óptica de un estudio serológico, es necesario determinar qué correcciones se deben establecer sobre el valor observado de un pocillo en una placa con objeto de hacerlo comparable a otros pocillos de otras placas. Si la variable es categórica, deben definirse sin ambigüedad el número y características de las clases; si es cuantitativa, las condiciones experimentales en las que se efectúa la medición, así como la precisión deseada.
- c) *¿Qué factores influyen sobre la variable?* Este es un punto fundamental dentro del proceso. En él, el experimentador debe hacer una lista lo más exhaustiva posible de todos y cada uno de los factores (causas) que pueden tener influencia sobre la variable (medición) que se va a estudiar. Posteriormente se clasificarán en los 3 apartados siguientes.
- d) *¿Cuáles de ellos son importantes e interesantes para la investigación (tipo 1)?* Esto es sencillo, pues es el objetivo de la investigación tal como se ha definido en la fase de concepción.
- e) *¿Cuáles son importantes, pero no interesantes para la investigación (tipo 2)?* En este punto el investigador reconoce la existencia de una serie de causas que influyen de forma importante sobre la variable, pero en principio no está interesado en estudiarlas, pues no es un objetivo prioritario de su investigación, o no puede evaluarlas experimentalmente, o son demasiado costosas, etc.
- f) *¿Cuáles no son importantes (tipo 3)?* Estos factores no serán considerados en el diseño, pues se sabe que su influencia es pequeña. Sin embargo, es necesario reconocer que pueden representar un ruido de fondo relativamente importante que no permita detectar estadísticamente la influencia de los diferentes niveles de los factores definidos en d).
- g) *¿Qué hacer con los factores tipo 2?* Esta es una decisión muy importante para definir el diseño definitivo del experimento. Se pueden seguir 3 alternativas:
 1. Tenerlos en cuenta en el diseño y estudiarlos. Por ejemplo, se sabe que el laboratorio donde se hacen los análisis influye en los resultados de los mismos, aunque naturalmente en la investigación no se está interesado en cuantificar su influencia. En este caso se podría decidir tenerlo en cuenta en el diseño a base de repetir la investigación propuesta en varios laboratorios. Con ello se logra aumentar el espacio de generalización de los resultados (espacio de inferencia); sin embargo, el hecho de repetir el experimento puede conducir a aumentar su coste.

2. Realizar el experimento en sólo un nivel del factor tipo 2. Por ejemplo, se sabe que la raza de cerdo influye en la calidad del jamón. Como no se dispone de presupuesto ni se considera oportuno el repetir el estudio con varias razas, una opción es fijar que todos los animales del estudio pertenezcan a una misma raza. Con ello, contrariamente al caso anterior, el universo de inferencia está restringido a la raza dada.
 3. No considerar su influencia y aleatorizar los niveles del factor tipo 2 en los factores tipo 1 estudiados. Por ejemplo, la procedencia de la leche influye en la calidad final del queso. Una forma de actuar es no tener en cuenta este hecho y aleatorizar los tratamientos en las partidas de leche sin considerar su procedencia. Con esta acción se aumenta el error experimental, de modo que podrían no detectarse de forma estadística las diferencias existentes entre los diversos niveles de los tratamientos estudiados.
- h) *¿Cuál es el espacio de inferencia?* Como consecuencia de las decisiones tomadas en la fase anterior, es necesario preguntarse a qué población se generalizarán (inferirán) los resultados [ver (1) para una amplia discusión sobre las implicaciones del concepto de «espacio de inferencia»]. Dependiendo de ello, se decidirá cómo tomar los datos para que puedan ser considerados como una muestra representativa de la población de referencia.
- i) *¿Cuántas veces y de qué forma repetirá el experimento?* Esta suele ser una pregunta muy repetida en la conversación investigador-estadístico. Es necesario determinar el tamaño mínimo del experimento con objeto de que el diseño sea eficiente. Sin embargo, la contestación ansiada por el investigador no es siempre fácil. A esta pregunta contesta el estadístico, a su vez, con una serie de preguntas: cuál es la variabilidad de los datos, qué diferencia mínima se quiere detectar, con qué probabilidad, cuál es la comparación de mayor interés o más crítica. Después de esa lluvia de preguntas, el investigador queda descorazonado, pues a una sencilla y vital pregunta no le da una respuesta concreta a no ser que, a su vez, haya contestado de forma concreta a la que le han planteado a él. Si el investigador conoce las respuestas, el cálculo es sencillo [ver, entre otros, a (3)]. Si no dispone de respuestas, lo normal es llegar a un compromiso basado en el número máximo de unidades experimentales que es capaz de manejar de forma homogénea, siempre que el presupuesto del proyecto lo permita. Dentro de este apartado es oportuno hacer un par de matizaciones. Primero, cuando se está hablando de número de repeticiones puede interpretarse como 2 conceptos totalmente diferentes. Por un lado, se trata de repetir el conjunto del experimento varias veces; esta definición está unida al concepto de bloques o tandas. Por otro lado, tal como lo entendemos aquí, se refiere a obtener más de una observación por unidad experimental igualmente tratada. La repetición permite interpretar las diferencias entre unidades tratadas de forma diferente al compararlas con la variación entre unidades igualmente tratadas. No debe confundirse esta interpretación con el hecho de tomar submuestras dentro de las unidades experimentales. Por ejemplo, si se está estudiando diversos factores que afectan la presencia de microorganismos en el champiñón enlatado, al repetir la determinación a base de tomar 2 muestras de un mismo bote, no debe considerarse como una repetición. La segunda matización se refiere a una llamada de atención para los experimentos que estén basados en mediciones expresadas en porcentajes. Supongamos que se está estudiando el porcentaje de botes que han resultado contaminados después de haber aplicado dos tratamientos distintos. Si se parte de 10 botes por tratamiento, un simple bote contaminado en más o en menos en un tratamiento dado, se traduce en un salto de un 10% en el valor medido. Ello implica que el error de medida es como mínimo del 10%. En esta situación, cómo se puede pretender detectar diferencias pequeñas entre los tratamientos si partimos de un error intrínseco del 10%. Si se hubieran tomado, por ejemplo, 100 muestras por tratamiento, este error sería sólo del 1%.

TABLA 1
ANÁLISIS DE LOS DATOS DE UN EXPERIMENTO PARA
DETECTAR LAS DIFERENCIAS ENTRE 3 TIPOS DE
DETERMINACION SEROLOGICA EN 10 LABORATORIOS
UTILIZANDO 10 O 3 MUESTRAS

Fuentes de variación	Grados de libertad	
	10 muestras	3 muestras
Típos	2	2
Laboratorios	9	9
Interacción	18	18
Residuo	270	60
TOTAL	299	89

- j) *¿Qué trascendencia tendrán las conclusiones?* De acuerdo con la importancia de rechazar la hipótesis nula cuando es cierta, el investigador debe fijar el nivel de significación con que realizará las pruebas estadísticas. Esta decisión ha de ser previa a la adquisición de cualquier dato, no posterior a la vista de lo que más interese. Si, por ejemplo, se está estudiando el nivel de contaminación de un alimento, uno debería tener una alta probabilidad de no equivocarse al decir que no está contaminado, cuando sí que lo está, aunque casos de no contaminación fueran diagnosticados como contaminados. En este supuesto habría que elegir un nivel de significación muy bajo (1 ó 0,1 %). En otras situaciones experimentales interesa aumentar el nivel de significación al 10 ó 15 % para protegerse contra el error de aceptar la hipótesis nula cuando es falsa.
- k) *¿Cómo se tomarán los datos?* Aunque podría pensarse que la adquisición de los datos es una tarea sencilla y sin problemas, esto no es así. Debe tenerse en cuenta que los análisis estadísticos se realizan sobre datos y la presencia de un dato erróneo puede dar al traste con una buena realización del experimento. Hay que evitar el trasiego y copia de datos de un documento (cuaderno de campo) a otro. Deben diseñarse las hojas de adquisición de datos de forma que inequívocamente identifiquen la unidad experimental que se esté registrando y que sea utilizada directamente para introducir los datos en el ordenador. Más aún, existen en el mercado gran cantidad de aparatos de mano y automáticos para registrar *in situ* los datos para ser transferidos posteriormente a un ordenador (2).

El objetivo final de todo experimento es proporcionar el máximo de información sobre el problema estudiado. Sin embargo, esta información debe ser obtenida de una forma eficiente tanto práctica como estadísticamente. Mediante un buen diseño se puede maximizar la cantidad de información con un mínimo uso de recursos. Una forma de mejorar la eficiencia es considerar el análisis de los datos incluso antes de haber sido obtenidos. Un conocimiento previo de qué se va a hacer con los resultados del experimento conducirá a evitar un diseño absurdo. Por ejemplo, supongamos que se está estudiando la eficacia de 3 tipos de ELISA para la detección serológica de diferentes razas bacterianas. Con objeto de aumentar el espacio de inferencia se decide que 10 laboratorios entren en el estudio de un proyecto conjunto. Supongamos que en la reunión de los responsables del proyecto se decide que pueden estudiarse de forma homogénea 10 repeticiones por tipo y laboratorio. Una vez realizado el experimento, por consideraciones que no son del caso, el análisis de los datos para los apartados de «Fuentes de variación» y «Grados de libertad» tendría un aspecto como el correspondiente a la parte izquierda de la Tabla 1. La línea del «Residuo» estaría basada en 270 grados de libertad, lo que resulta a todas luces desorbitado e incluso

inútil, puesto que la diferencia entre los tipos de ELISA se probaría mediante el estadístico F basado en 2 y 18 grados de libertad. Si se hubiera estudiado el análisis de los datos previamente a su adquisición, se hubiera visto que con tan sólo 3 repeticiones se podría, en principio y a falta de otras razones, haber obtenido un diseño que cumplía los objetivos de la investigación más eficientemente (parte derecha de la Tabla 1). Varios autores han sugerido que, para que el diseño sea eficiente, los grados de libertad del residuo deben encontrarse entre un mínimo de 10 y un máximo de 20 (4).

Una vez decidido el experimento se describirá en forma matemática mediante un modelo estadístico que dará lugar a un análisis de los datos. Tal como se ha indicado anteriormente, este análisis retroalimentará la fase de diseño para probar su eficiencia. Por tanto, existe una cadena fundamental problema-diseño-modelo-análisis-diseño. Por ello se ha de señalar el peligro que encierra la utilización «a ciegas» tanto de los diseños clásicamente descritos (bloques al azar, cuadrado latino, etc.) como de los programas enlatados de ordenador. Cada investigación trata de resolver un problema muy específico, y tan específico como es el problema será su diseño. Si el problema coincide en su estructura con alguno de los que originó un diseño clásico, debe usarse tal diseño; de lo contrario, no.

Bibliografía

1. Anderson, V. L. and McLean, R. A. (1974). *Design of experiments. A realistic approach*. Marcel Dekker, Inc. New York.
2. Brown, J. F., Strettle, R. J. and Sutherland, C. J. (1986). *Interfacing Biological Equipment with Microcomputers*. Edward Arnold, London.
3. Gill, J. L. (1978). *Design and Analysis of Experiments in the Animal and Medical Sciences*. The Iowa University Press, Ames, Iowa.
4. Mead, R. (1988). *The Design of Experiments. Statistical principles for practical application*. Cambridge University Press, Cambridge.
5. Ostle, B. (1963). *Statistics in Research* (2nd edition). The Iowa University Press, Ames, Iowa.
6. Pearce, S. C., Clarke, G. M., Dyke, G. V. and Kempson, R. E. (1988). *Manual of Crop Experimentation*. Charles Griffin & Co. Ltd., London.
7. Dyke, G. V. (1988). *Comparative Experiments with Field Crops*. Charles Griffin & Co. Ltd., London.