



**Estrategias para reducir *Listeria monocytogenes* en carne y productos
cárnicos**

Giannina Brugnini Osimani

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctor

**Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química
Universidad de la República**

Diciembre 2022

**Estrategias para reducir *Listeria monocytogenes* en carne y productos
cárnicos**

Tribunal:

Dr. Gerardo Leotta

Dra. Alejandra Medrano

Dr. Mauricio Redondo Solano

Dra. Caterina Rufo, Directora

Dra. Silvana Vero, Directora Académica

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer:

A Caterina Rufo, tutora de este trabajo. Infinitas gracias por tu incansable dedicación y paciencia a lo largo de este proceso. En especial agradezco tu capacidad de entrega incondicional y solidaria de tu conocimiento hacia mí. Gracias por enseñarme a crecer como investigadora. Agradezco de corazón haberte tenido como tutora y el poder seguir compartiendo contigo el trabajo diario, así como nuestras vidas. ¡GRACIAS CRUFO!

A la Dra. Silvana Vero, directora académica de esta tesis, quien siempre estuvo dispuesta a colaborar con este trabajo. Gracias por tu tiempo y dedicación.

Al Dr. Santiago Luzardo del INIA Tacuarembó que me asistió en las medidas instrumentales de color en carne y puso a disposición el colorímetro para realizarlas.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) que financió parte de este trabajo de posgrado mediante el proyecto: FMV_3_2018_1_148907 “Optimizar las condiciones de fermentación y secado para la reducción de *Listeria monocytogenes* durante la elaboración de chacinados secos en la industria nacional” ANII - Fondo María Viñas. (Período 2019 - 2021)

A Ronny Pelagio, responsable de la planta Piloto del LATU donde se realizaron las diferentes producciones de salames. Gracias Ronny por tu excelente disposición, colaboración y compromiso en este trabajo.

A todos los integrantes del Instituto Polo Tecnológico de Pando, quienes de una forma u otra han colaborado con mi trabajo y formación durante este tiempo. En especial, agradezco a mis compañeras del laboratorio de Alimentos y Nutrición Jesica Rodríguez, Romina Boccagni y Belén Abella (integrantes actuales), así como a Soledad Rodríguez (ex integrante) quienes compartieron mis alegrías, enojos, frustraciones e interminables monólogos. Gracias por bancarme y

colaborar con este trabajo, haciéndome sentir orgullosa del grupo humano que formamos.

A Juan Carriquiry por iniciarme en el maravilloso mundo de la carne y que, junto a Beatriz Briano me enseñaron y compartieron la realidad de la industria Frigorífica Nacional. Gracias a ambos por el apoyo incondicional y sus enseñanzas.

En especial a mi familia, Floro, Inés, Juan y Lucas que, posiblemente sin entender mucho mi trabajo, me acompañaron, bancaron mis ausencias y soportaron mis cambios de humor en el transcurso de esta tesis. A mi Padre, incondicional en todo momento y que siempre estuvo orgulloso de mis logros laborales. Finalmente, a mi Madre que vio gestar este trabajo y anheló verlo terminado, pero que ahora lo ve desde el cielo.

A todos Uds. ¡Muchas gracias!

Estrategias para reducir *Listeria monocytogenes* en carne y productos cárnicos

Giannina Brugnini Osimani
Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química
Universidad de la República
2022

Directores:

Dra. Caterina Rufo

Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Instituto Polo Tecnológico de Pando
Facultad de Química - Universidad de la República

Dra. Silvana Vero

Área Microbiología, Departamento de Biociencias
Facultad de Química – Universidad de la República

Listeria monocytogenes es una bacteria patógena causante de listeriosis y que habitualmente se encuentra en carne y productos cárnicos como los salames. La producción de carne fresca y de salame tienen características propias y por tanto las estrategias usadas para controlar la carga microbiana difieren en cada proceso. El objetivo general de esta tesis fue estudiar el comportamiento de *Listeria monocytogenes* en carne envasada al vacío expuesta a radiación UV-C y ácido láctico y en salames en distintas condiciones de proceso para obtener en cada matriz las condiciones óptimas que logren la máxima reducción de *Listeria monocytogenes* en el producto final.

Como resultado de esta tesis se aislaron e identificaron 35 cepas de *Listeria*: 29 *L. innocua* y 6 *L. monocytogenes* pertenecientes a dos serotipos (4b y 1/2a). Mediante la electroforesis de campos pulsados (PFGE) se distinguieron dos pulsotipos diferentes de *L. monocytogenes* (pulsotipo 1 para los aislados de serotipo 4b y pulsotipo 2 para los aislados de serotipo 1/2a). Todos los

aislamientos presentaron sensibilidad al ácido láctico in vitro. La concentración mínima inhibitoria en TSB-YE fue de 0.3 % y la concentración mínima bactericida de 0.7 %. Los aislamientos de *L. monocytogenes* encontrados fueron sensibles al UV-C in vitro, siendo la DL50 de 3.47 mJ/cm² para L100A1 y 5.39 mJ/cm² para L101E3, siendo esta diferencia no significativa ($p < 0.05$). Se seleccionó la cepa L100A1 para realizar los estudios en carne. Mediante la metodología de superficie de respuesta se obtuvo un modelo cuadrático que predice la reducción logarítmica de *L. monocytogenes* en carne vacuna envasada al vacío tratada con ácido láctico y UV-C. La reducción logarítmica máxima para *L. monocytogenes* fue de 1.55 ± 0.41 log ufc/g y para bacterias ácido lácticas de 1.55 ± 1.15 log ufc/g, con un impacto mínimo en el color de la carne aplicando 2.6 % de ácido láctico y 330 mJ/cm² UV-C. Estas condiciones afectaron el crecimiento de *L. monocytogenes* y retrasaron el crecimiento de las bacterias ácido lácticas por 2 semanas en muestras de carne envasadas al vacío a 4 °C. Esta estrategia podría contribuir para mejorar la seguridad y la vida útil de la carne vacuna envasada al vacío con un bajo impacto en el color de la carne.

En cuanto al trabajo en salames, se estudió a escala piloto el efecto sobre la sobrevivencia de *L. monocytogenes*, que tienen la temperatura de fermentación, la temperatura de secado, el diámetro del producto y el lactato de sodio inoculando la masa con *Listeria innocua* como microorganismo modelo. El comportamiento de *Listeria* se modeló según la ecuación de Baranyi & Roberts obteniéndose para cada condición de ensayo el parámetro μ (tasa de inactivación de *L. innocua*), el valor inicial de *L. innocua* (Y_0), el valor final alcanzado (Y_{END}) y se calculó la variación en los recuentos de *Listeria innocua* entre el tiempo inicial y el tiempo final del proceso ($Y_0 - Y_{END}$). Se determinó que el agregado de lactato de sodio al 2 % durante la fermentación compromete la reducción de *L. innocua*. Del estudio de las condiciones de proceso en la sobrevivencia de *L. innocua* se obtuvieron dos modelos matemáticos, un modelo cuadrático para la tasa de inactivación de *Listeria* (μ) y un modelo 2F para la reducción total de *Listeria* alcanzada ($Y_0 - Y_{END}$) que permiten explicar estas respuestas en función de las temperaturas de fermentación y secado y del calibre del salame. Los valores máximos de μ y de ($Y_0 - Y_{END}$) se obtienen cuando la temperatura de fermentación es 30 °C y la de secado de 20 °C. Si bien la

reducción total de *Listeria* alcanzada al final del proceso, en ausencia de lactato, alcanzó siempre valores de 3 log ufc/g, existieron condiciones que permitieron el crecimiento de *Listeria* durante el secado y que en caso de partir de carne con recuentos de *Listeria* mayores a 3 log ufc/g no se obtendría un producto final que cumpla con la legislación nacional de ausencia de *Listeria* en 25 gramos.

Strategies to reduce *Listeria monocytogenes* in beef and meat products

Giannina Brugnini Osimani
Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química
Universidad de la República
2022

Directors:

Dra. Caterina Rufo

Laboratorio de Alimentos y Nutrición, Instituto Polo Tecnológico de Pando
Facultad de Química - Universidad de la República

Dra. Silvana Vero

Área Microbiología, Departamento de Biociencias
Facultad de Química – Universidad de la República

Listeria monocytogenes is a pathogenic bacteria commonly found in meat and meat products such as salami. The production of fresh meat and salami have their own characteristics and therefore the strategies used to reduce bacterial contamination are different. The general objective of this thesis was to study the behavior of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed meat exposed to UV-C and lactic acid and in salami under different processing conditions to define the optimal conditions for each product to achieve the maximal reduction of *Listeria monocytogenes*. As a result of this thesis, 35 *Listeria* strains were isolated and identified: 29 *L. innocua* and 6 *L. monocytogenes* belonging to two serotypes (4b and 1/2a). Using pulsed field electrophoresis (PFGE), two different pulsetypes of *L. monocytogenes* were distinguished (pulsetype 1 for serotype 4b isolates and pulsetype 2 for serotype 1/2a isolates). All the *L. monocytogenes* isolates presented sensitivity to lactic acid in vitro. The minimum inhibitory concentration in TSB-YE was 0.3 % and the minimum bactericidal concentration was 0.7 %. The *L. monocytogenes* isolates found were sensitive to UV-C in vitro, with an

LD50 of 3.47 mJ/cm² for L100A1 and 5.39 mJ/cm² for L101E3, this difference being non-significant ($p < 0.05$). The L100A1 strain was selected to carry out the studies in vacuum packaged beef. Using Response Surface Methodology, a quadratic model was obtained that predicts the logarithmic reduction of *L. monocytogenes* in vacuum-packed beef treated with lactic acid and UV-C. The maximum log reduction for *L. monocytogenes* was 1.55 ± 0.41 log cfu/g and for lactic acid bacteria was 1.55 ± 1.15 log cfu/g, with minimal impact on meat color by applying 2.6 % of lactic acid and 330 mJ/cm² UV-C. These conditions affected the growth of *L. monocytogenes* and delayed lactic acid bacteria growth for 2 weeks in vacuum-packed meat samples at 4 °C. This strategy could contribute to improve the safety and shelf life of vacuum-packed beef with a low impact on meat color.

Regarding the work on salami, the effect on the survival of *L. monocytogenes*, of the fermentation and drying temperatures, the diameter of the product and sodium lactate, was studied at a pilot scale by inoculating the dough with *Listeria innocua* ATCC® 33090 as surrogate microorganism. The behavior of *Listeria* was modeled according to the Baranyi & Roberts equation, thus obtaining for each test condition the parameter μ (inactivation rate of *L. innocua*), the initial value of *L. innocua* (Y_0), the final value reached (Y_{END}) and the variation in the *Listeria innocua* counts between the initial time and the final time of the process ($Y_0 - Y_{END}$) was calculated. It was determined that the addition of 2 % sodium lactate during fermentation compromises the reduction of *L. innocua*. Two mathematical models were obtained, a quadratic model for the rate of *Listeria* inactivation (μ) and a 2F model for the total reduction of *Listeria* achieved ($Y_0 - Y_{END}$) allowing us to explain these responses based on the fermentation and drying temperatures and the size of the salami. The maximum values of μ and ($Y_0 - Y_{END}$) are obtained when the fermentation temperature is 30 °C and the drying temperature is 20 °C. Although the total reduction of *Listeria* achieved at the end of the process, in the absence of lactate, always reached values of 3 log cfu/g, there were conditions that allowed the growth of *Listeria* during drying and in the case of starting from meat with counts of *Listeria* greater than 3 log cfu/g the process would not obtain a final product that complies with the national legislation for the absence of *Listeria* in 25 grams.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN EN ESPAÑOL	v
RESUMEN EN INGLÉS	viii
INDICE	x
ABREVIACIONES	xiv
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
I.1. Carne y derivados	1
<i>I.1.1. Carne</i>	1
I.1.1.1. Definición.....	1
I.1.1.2. Valor nutritivo de la carne.....	2
I.1.1.3. Valor comercial de la carne en Uruguay.....	2
I.1.1.4. Industrialización de la carne.....	3
I.1.1.5. Conservación y vida útil.....	4
<i>I.1.2. Salame</i>	4
I.1.2.1. Definición.....	4
I.1.2.2. Proceso de producción de salames.....	5
I.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	6
I.3. <i>Listeria monocytogenes</i> en carne y salame	8
I.4. Estrategias de control y mitigación de <i>Listeria</i> en carne y derivados	9
<i>I.4.1. Estrategias en carne</i>	9
<i>I.4.2. Estrategias en salame</i>	10
I.5. Descripción del problema a estudiar en este trabajo	10
II. OBJETIVO GENERAL	12
II. 1. Objetivos específicos	12
II.2. Estructura de la tesis	12
III. CAPÍTULO I	14
III.1 Introducción	15
<i>III.1.2. Ácido láctico</i>	15
<i>III.1.3. Radiación UV-C</i>	16
<i>III.1.4. Hipótesis y estrategia de trabajo</i>	18
III.2. Objetivo general	19

<i>III.2.1. Objetivos específicos</i>	19
III.3. Materiales y métodos	20
<i>III.3.1 Búsqueda y aislamiento de Listeria</i>	20
<i>III.3.2. Caracterización de los aislamientos de Listeria</i>	21
III.3.2.1. Confirmación de género y especie por tinción Gram, actividad catalasa y galerías API.....	21
III.3.2.2 Confirmación de género y especie por métodos moleculares.....	21
III.3.2.3. Serotipificación molecular de <i>L. monocytogenes</i>	22
III.3.2.4. Tipificación de <i>L. monocytogenes</i> por Electroforesis de campo pulsado (PFGE).....	22
<i>III.3.3. Sensibilidad de los aislamientos de L. monocytogenes frente a ácido láctico y UV-C</i>	23
III.3.3.1 Sensibilidad de <i>L. monocytogenes</i> frente al ácido láctico en microplaca.....	23
III.3.3.2. Sensibilidad de los aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> a diferentes dosis de UV-C en placa.....	24
<i>III.3.4. Efecto inhibitorio de la aplicación del ácido láctico y del UV-C en carne envasada al vacío sobre el crecimiento de L100A1</i>	25
III.3.4.1. Preparación de las muestras de carne inoculadas con <i>L. monocytogenes</i>	25
III.3.4.2. Tratamiento con ácido láctico.....	25
III.3.4.3. Tratamiento con UV-C.....	26
III.3.4.4 Recuento de <i>L. monocytogenes</i>	26
<i>III.3.5. Efecto y optimización de la aplicación combinada de UV-C y AL en carne sobre L100A1</i>	27
<i>III.3.6. Estudio del efecto en el tiempo a 4 °C del tratamiento combinado de 2.6 % de AL y 330 mJ/cm² de UV-C sobre L. monocytogenes, BAL, enterobacterias y coliformes</i>	29
III.4. Resultados y Discusión	30
III.4.1. Resultados de la búsqueda, aislamiento y caracterización de los aislamientos de <i>Listeria</i> spp.....	30
III.4.2. Sensibilidad de los aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> al ácido láctico en microplaca.....	35

<i>III.4.3. Sensibilidad de los aislamientos de L. monocytogenes al UV-C en placa.....</i>	<i>37</i>
<i>III.4.4. Efecto del AL y UV-C en carne envasada al vacío.....</i>	<i>38</i>
<i>III.4.4.1. Estudio del efecto de la aplicación del ácido láctico sobre los recuentos de L100A1 en carne envasada al vacío a tiempo cero y 14 días.</i>	<i>38</i>
<i>III.4.4.2. Efecto de la aplicación de UV-C en carne sobre L100A1 a tiempo cero y 14 días.....</i>	<i>40</i>
<i>III.4.4.3. Estudio de la aplicación combinada de UV-C y AL en carne mediante RSM.....</i>	<i>41</i>
<i>III.4.4.4. Aplicación de las condiciones óptimas de UV-C y AL en carne y su efecto durante 56 días.....</i>	<i>45</i>
<i>III.4.4.4.1. Recuentos microbiológicos en carne.....</i>	<i>45</i>
<i>III. 4.4.4.2. Medias de pH en carne.....</i>	<i>48</i>
<i>III. 4.4.4.3. Medidas de color en carne.....</i>	<i>49</i>
III.5. Conclusión.....	51
IV. CAPÍTULO II.....	52
IV.1. Introducción.....	53
<i>IV. 1.1. Fermentación.....</i>	<i>53</i>
<i>IV.1.1.1. Lactato de sodio.....</i>	<i>53</i>
<i>IV.1.1.2. Cultivos iniciadores.....</i>	<i>54</i>
<i>IV.1.1.3. Temperatura de fermentación.....</i>	<i>55</i>
<i>IV.1.2. Secado.....</i>	<i>55</i>
<i>IV.1.3. Modelos.....</i>	<i>56</i>
<i>IV.1.4. Hipótesis y estrategia de trabajo.....</i>	<i>57</i>
IV.2. Objetivo general.....	59
<i>IV.2.1. Objetivos específicos.....</i>	<i>59</i>
IV.3. Materiales y métodos.....	60
<i>IV.3.1. Materiales.....</i>	<i>60</i>
<i>IV.3.2. Preparación del inóculo de L. innocua.....</i>	<i>60</i>
<i>IV.3.3. Selección del cultivo iniciador.....</i>	<i>60</i>
<i>IV.3.4. Elaboración de los salames inoculados con Listeria innocua ATCC® 33090.....</i>	<i>61</i>

IV.3.5. Estudio del efecto del agregado de lactato de sodio durante la fermentación.....	62
IV.3.6. Diseño experimental para evaluar condiciones producción.....	62
IV.3.7. Recuentos de <i>L. innocua</i> en salames.....	64
IV.3.8. Determinación de la actividad de agua y el pH en salames.....	65
IV.4. Resultados y Discusión.....	66
IV.4.1. Selección del cultivo iniciador	66
IV.4.2. Efecto de la adición de lactato de sodio sobre la reducción de <i>Listeria</i> y el pH durante la fermentación.....	68
IV.4.3. Comportamiento de <i>L. innocua</i> durante la producción de salames.....	71
IV.4.3.1. Estimación de tasa de inactivación de <i>Listeria</i> (μ), cantidad de <i>Listeria</i> al inicio (Y_0) y al final (Y_{END}) del proceso según la ecuación de Baranyi & Roberts.....	71
IV.4.3.2. Modelado de la tasa de inactivación de <i>Listeria</i> (μ), cantidad final de <i>Listeria</i> (Y_{END}) y nivel de reducción total ($Y_0 - Y_{END}$) del proceso mediante un RSM.....	73
IV.4.3.2.1. Análisis de la tasa de inactivación (μ , en log ufc/g/día).....	73
IV.4.3.2.2. Análisis de la cantidad de <i>Listeria</i> final (Y_{END} , en log ufc/g).....	75
IV.4.3.2.3. Análisis del nivel de reducción ($Y_0 - Y_{END}$ en log ufc/g)	76
IV.4.3.3. ¿Podrá <i>Listeria</i> crecer durante el secado?.....	78
IV.4.3.4. Tiempo de secado.....	83
IV.5. Conclusión.....	85
V. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS.....	87
VI. REFERENCIAS.....	88
VII. ANEXOS.....	111
VII.1. Anexo I.....	111
VII.2. Anexo II.....	112
VII.3. Anexo III.....	113
VII.4. Anexo IV.....	114
VII.5. Anexo V.....	115
VII.6. Anexo VI.....	116
VII.7. Anexo VII.....	117

ABREVIACIONES

- *AL*: Ácido Láctico (% m/v)
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- *aw*: Actividad de agua
- *BAL*: Bacterias ácido lácticas
- MRS Agar: Agar Man Rogosa & Sharpe
- *PALCAM*: Agar polimixina – acriflavina - cloruro de litio – ceftazidima - esculina – manitol.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
- pH: $-\log [H^+]$
- RBN: Reglamento Bromatológico Nacional
- *Red. Lis 48 hs*: Reducción de *L. innocua* a las 48 horas de fermentación (log ufc/g)
- *TSA*: Agar Triptona Soja
- *TSB*: Caldo Triptona Soja
- *Tferm*: Temperatura en la cámara de fermentación (°C)
- *Tsecado*: Temperatura en la cámara de secado (°C)
- μ : Tasa de crecimiento o inactivación (log ufc/g/día)
- *ufc*: Unidades formadoras de colonias
- Y_{END} : Cantidad de *L. Innocua* final (28 días) en salames predicho por la ecuación de Baranyi & Roberts. (log ufc/g)
- Y_0 : Cantidad de *L. Innocua* inicial en salames predicho por la ecuación de Baranyi & Roberts (log ufc/g)
- $Y_0 - Y_{END}$: Nivel total de reducción del proceso predicho por la ecuación de Baranyi & Roberts (log ufc/g)
- Y_{48h} : Recuentos de *L. innocua* a la salida de la fermentación (log ufc/g)
- $Y_{END} - Y_{48h}$: Diferencia en los recuentos de *Listeria* entre el final y el inicio y de la etapa de secado (log ufc/g)

I INTRODUCCIÓN GENERAL

I. 1 Carne y derivados

I.1.1 Carne

I.1.1.1 Definición

Según el *Codex Alimentarius* se define carne a las partes de un animal que han sido dictaminadas como inocuas y aptas para el consumo humano o se destinan para este fin (Codex Alimentarius, 2005). En Uruguay, se define a la carne como la parte comestible de animales faenados y declarados aptos para el consumo humano por la autoridad oficial competente, constituida por los tejidos blandos que rodean el esqueleto, incluyendo su cobertura grasa, tendones, vasos, nervios, aponeurosis y todos aquellos tejidos no separados durante la operación de faena incluido el diafragma (Decreto 210/18)

La carne es el resultado del proceso bioquímico que sufre el músculo luego de la muerte del animal. La conversión de músculo a carne tiene tres fases: pre-rigor, rigor mortis y post-rigor (Fennema, 2012) Tras el sacrificio del animal y el desangrado, la circulación sanguínea se detiene, disminuyendo el contenido de oxígeno en el músculo y dando inicio a la glucólisis anaerobia, utilizando ATP y produciendo ácido láctico. El ácido láctico provoca una disminución del pH que facilita la degradación de las proteínas que afectan de manera directa la capacidad de retención de agua, el color, la ternura, el sabor y la jugosidad de la carne (Fennema, 2012). Cuando se agotan las reservas de glucógeno, se produce la entrada y liberación masiva de calcio dentro de las fibras musculares, que es seguida por la contracción muscular progresiva, característica del rigor mortis. En esta fase, se observa la disminución de la elasticidad muscular alcanzando la máxima resistencia del tejido (Matarneh et al., 2017; Sentandreu et al., 2002) y la carne presenta gran dureza si se consume. Por esta razón, la carne es madurada, es decir mantenida a temperaturas controladas de refrigeración (por encima de -1.5 °C, su temperatura de congelamiento) por

períodos prolongados de tiempo (Mohammad Koochmaraie, 1996) durante el cual se desarrollan las características organolépticas propias del producto.

1.1.1.2 Valor nutritivo de la carne

La carne es uno de los alimentos más nutritivos para el hombre debido a su alto contenido de proteínas de alto valor biológico, lípidos, vitaminas y minerales. Contribuye a la dieta principalmente por su contenido en proteínas de alta digestibilidad aportando todos los aminoácidos esenciales. Tiene un alto contenido de hierro, zinc, cobre, selenio (Cabrera et al., 2010; Pistón et al., 2020) vitaminas del complejo B, vitamina A y otros compuestos bioactivos con alta biodisponibilidad (Alfaia et al., 2013). La composición de la carne varía según el tipo de músculo, pero en promedio 100 gramos de carne aportan a la dieta aproximadamente 21 g de proteína, 4 gramos de grasa total, 2.0 g de ácidos grasos saturados, 1.7 g de ácidos grasos monoinsaturados, 0.1 g de ácidos grasos poliinsaturados, 0.1 g de ácidos grasos trans, 51 mg de colesterol y 102 mg de sodio.

1.1.1.3 Valor comercial de la carne en Uruguay

Uruguay es un país con un alto consumo per cápita de proteína cárnica, donde la carne de origen bovina constituye gran parte de este consumo. En 2021 el consumo total estimado de carne alcanzó los 91.2 kg/hab./año, de los cuales la carne bovina representó 46 kg/hab./año (INAC, 2021). En este mismo año, se faenaron 2.638.301 cabezas bovinas, faena que fue realizada por 35 establecimientos habilitados a nivel nacional, con diferente participación y especialización (INAC, 2021).

La carne bovina representa el principal rubro de exportación del sector, aportando el 81 % de las divisas (2465.6 millones de dólares) siendo una industria de gran importancia económica para el país. El 70 % de la carne bovina producida se exporta y el restante 30 % se comercializa en el mercado interno. El principal comprador es China con el 60 %, seguido de Estados Unidos, México

y Canadá con el 12 %, la Unión Europea con el 11 %, el Mercosur con el 5 %, e Israel con el 3 % (INAC, 2021).

1.1.1.4 Industrialización de la carne

El proceso de producción industrial de carne sigue las normas de Bienestar Animal e involucra una serie de etapas que inician con la insensibilización, el degüello y desangrado del animal. Luego se realiza el cuereado, el desuello del rabo y se liga el recto para evitar la salida de su contenido y consiguiente contaminación. Posteriormente se liga el esófago y se extrae la cabeza, se procede al aserrado del esternón y a la incisión para realizar la evisceración, momento en el cual se retiran las vísceras (como pulmones, hígado y corazón). Al concluir la evisceración, se procede al corte longitudinal de la canal obteniéndose así las dos medias canales. Inmediatamente se realizan las operaciones de "dressing", que son realizadas en la línea de faena para lograr una presentación uniforme de las medias canales y finalmente se lavan para eliminar partículas de aserrín de hueso y restos de sangre coagulada. Como resultado de la faena, se obtienen una gran variedad de productos, los cuales se pueden clasificar en canal, menudencias, y subproductos. La canal es el producto cárnico primario, constituido por carne, hueso y grasa (INAC, 2004). Las medias canales vacunas pueden ser comercializadas con hueso o pueden, como en la mayoría de los casos, ingresar al proceso de desosado, en el cual se obtienen gran diversidad de cortes en función de los mercados de destino. En la sala de desosado se realizan los trabajos de desosado propiamente dicho, que consisten en retirar cortes o conjuntos de cortes de su soporte óseo. Para la obtención de los diferentes cortes se hace el prolijado o charqueo de los mismos y se les da la forma según lo acordado con el comprador. Como resultado de ello, además de los cortes, se obtiene carne chica, huesos y grasa. Finalmente, los cortes son envasados (envase primario) y se los coloca en cajas de cartón (envases secundarios) que se almacenan en cámaras de enfriado o de congelado según corresponda de acuerdo al corte y al mercado de destino.

1.1.1.5 Conservación y vida útil

La carne fresca es un alimento altamente perecedero debido a su alto contenido de nutrientes y de agua (Lambert et al., 1991). El deterioro microbiológico de la carne después de la faena, durante su procesamiento y almacenamiento está determinada por factores intrínsecos y extrínsecos, así como por los métodos de procesamiento y preservación (Huis In't Veld, 1996). Dentro de los factores intrínsecos se destacan la actividad de agua, pH, nutrientes disponibles, sustancias antimicrobianas naturales (Huis In't Veld, 1996), composición, tipo y grado de contaminación microbiana inicial (Koutsoumanis et al., 2006). Entre los factores extrínsecos, los más relevantes son la atmósfera del envasado y la temperatura de almacenamiento (Koutsoumanis et al., 2006).

El envasado al vacío junto con la refrigeración es el sistema de conservación que más se utiliza para la comercialización de los cortes de alto valor comercial ya que prolonga la vida de almacenamiento manteniendo un ambiente deficiente en oxígeno dentro del envase y preservando las características sensoriales propias del producto, además de ser un tipo de envasado muy rentable para la industria (Bell et al., 1996; Hernández- Macedo et al., 2011; McMillin, 2008). Estudios en Uruguay sobre vida útil de carne fresca vacuna envasada al vacío y almacenada a 0 °C y +4 °C indicaron que la vida útil para cortes de alto valor como el bife angosto y la picaña a 0 °C es de 4 meses, mientras que a 4 °C se reduce a 2 meses (García et al., 2015).

1.1.2 Salame

1.2.1 Definición

Los chacinados secos son productos fermentados, elaborados en base a mezclas de carne (bovina y porcina), grasa de cerdo, sal, adyuvantes de maduración y especias que no sufren durante su elaboración procesos térmicos que eliminen la contaminación microbiana. El chacinado seco de mayor consumo

en nuestro país es el salame, razón por la cual se tomará como modelo de estudio en este trabajo.

Según el Reglamento Bromatológico Nacional, modificado por el Decreto N° 588/008 (Decreto 588/008): “se entiende por salame a diversos embutidos secos elaborados a base de carne cruda de cerdo y vacuno, adicionados de trozos uniformes de tocino y condimentos, que son madurados posteriormente. Los salames se tipifican con distintos nombres, según el tamaño del grano de picado, condimentación, procedimiento de elaboración y forma o tamaño. Pueden ser ahumados o no”.

El salame tiene un alto contenido de proteínas y grasa. 100 gramos de este producto contienen 21.3 g de proteínas, 37.9 g de grasa total y 2.1 g de hidratos de carbono disponibles (Tabla de composición de alimentos de Uruguay, 2002). A diferencia de la carne, el salame producido en Uruguay se comercializa, en su totalidad, en el mercado local (OPYPA., 2021), siendo el chacinado seco de mayor consumo.

1.1.2.2 Proceso de producción de salames

Para la elaboración de salames se parte de carne y grasa congeladas para no aumentar la carga microbiana de la carne y facilitar el picado de la grasa. Luego del picado se adicionan y mezclan los ingredientes (cloruro de sodio, azúcares y condimentos) y aditivos (conservantes, estabilizantes, antioxidantes y reguladores de acidez), la masa se embute en tripas (que pueden ser tanto naturales como artificiales) y a partir de este punto el proceso se puede dividir en una primera etapa donde ocurre la fermentación seguida de una segunda etapa de secado. Durante la etapa de fermentación se produce un descenso de pH inicial que puede explicarse por el desarrollo de las bacterias ácido lácticas (BAL) ya sea provenientes de la materia prima, del ambiente o adicionadas como cultivos iniciadores (Barbuti & Parolari, 2002; Girard, 1991) que consumen los azúcares presentes en el interior del embutido cárnico liberando ácido láctico como producto de su metabolismo (Bozkurt & Erkmén, 2004). El pH desciende a valores cercanos al punto isoeléctrico de las proteínas las cuales se

desnaturalizan y se agregan generando una textura firme y perdiendo capacidad de retención de agua.

La fermentación puede durar entre 1 y 3 días, a una humedad relativa entre 85 y 95 % con un rango de temperaturas que puede oscilar entre 15 °C y 30 °C dependiendo del producto y del país (Hutkins, 2006; RSA-CONICET, 2017). Luego durante el secado se produce la reducción de la actividad de agua (Lucke, 1998) y puede observarse un aumento del pH debido a reacciones de proteólisis y lipólisis, liberando amoníaco al medio (Laranjo et al., 2017; Lucke, 1998). Además, durante el secado hay una disminución importante en la actividad acidificante de las BAL debido a la reducción del contenido de azúcares (sustrato) en esta etapa, y la transformación de ácido láctico en otras sustancias aprovechables por la microbiota presente. La actividad de agua final del producto dependerá, entre otros factores, de la temperatura y velocidad de aire en la cámara de secado. El secado dura entre 15 y 21 días a una temperatura que puede variar entre 15 °C y 25 °C (Hutkins, 2006; RSA- CONICET, 2017).

1.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es el agente causal de listeriosis, una enfermedad rara pero severa con una alta tasa de mortalidad (30 %) (Lomonaco et al., 2015) que se produce principalmente por la ingesta de alimentos contaminados con el patógeno (Buchanan et al., 2017; Rees et al., 2017). La listeriosis puede causar gastroenteritis febril leve en personas sanas; sin embargo, puede ocurrir una enfermedad invasiva caracterizada por bacteriemia, meningitis, neumonía, aborto, endocarditis y sepsis (Ferreira et al., 2014), particularmente en grupos de alto riesgo como embarazadas, recién nacidos, personas mayores y personas inmunocomprometidas (de Noordhout et al., 2014). En Estados Unidos y en la Unión Europea se registró una tendencia creciente en el número de brotes de listeriosis entre los años 2008 y 2015 (CDC, 2014; EFSA-ECDPC, 2016). En Uruguay se registra un promedio de tres casos anuales de listeriosis, pero en el año 2016 hubo un aumento de casos de listeriosis invasiva, y se reportaron 13 casos de los cuales 4 fueron letales (MSP, 2017).

L. monocytogenes es un bacilo gram positivo, catalasa positivo, no formador de esporas, móvil (Farber & Peterkin, 1991), psicrófilo, ácido-tolerante, halotolerante y anaerobio facultativo (Doyle et al., 2001). Tiene la capacidad de formar biofilms (Jay, 1996) pudiendo permanecer en el ambiente y resistir la desecación y el tratamiento con agentes antimicrobianos y sanitizantes. Puede crecer en ausencia de oxígeno, en un amplio rango de pH (entre 4.4 – 9.4) y a temperaturas entre 0 y 45 °C (Nychas et al., 2008). Tiene la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones de stress y por tanto puede volverse endémica en los ambientes de producción de alimentos (Chen et al., 2010; von Laer et al., 2009). Este proceso de adaptación al stress es dependiente de la cepa (Blatter et al., 2010; López et al., 2008; Senczek et al., 2000)

Para la identificación y tipificación de *Listeria monocytogenes* existen diferentes métodos bioquímicos y moleculares. Entre los métodos bioquímicos se encuentran la tinción de Gram, catalasa, oxidasa e hidrólisis de la esculina para la identificación rápida del género *Listeria* y el ensayo de hemólisis, prueba Camp y galerías API para la identificación de especie. Los métodos moleculares como la reacción de polimerasa en cadena (PCR) apuntan a la detección de genes específicos implicados en la patogenicidad de *L. monocytogenes* (Dussurget et al., 2004). Barbau-Piednoir et al. (2013) han desarrollado y validado un método de PCR en tiempo real para la detección y discriminación de *Listeria* spp. (con cebadores dirigidos al gen *iap* que codifica para la proteína P60 asociada a la invasión) y *Listeria monocytogenes* (con cebadores que reconocen un fragmento del gen de virulencia *hly* que codifica para la listeriolisina O requerida para la ruptura de la vacuola fagocítica y la liberación de la bacteria dentro del citoplasma).

Desde el punto de vista epidemiológico, es importante caracterizar las cepas de *L. monocytogenes*. Entre los 13 serotipos de *L. monocytogenes*, cuatro de ellos (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) están implicados en el 95% de casos y brotes de listeriosis humana (Doumith et al., 2004). La serotipificación puede realizarse por técnicas moleculares basadas en PCR (Doumith et al., 2004, 2005).

Para tipificar a nivel de cepa y monitorear diferentes aislados de *L. monocytogenes* se utilizan distintos métodos moleculares. Entre ellos se destaca la electroforesis en gel de campos pulsados (PFGE), que durante muchos años

ha sido la técnica estándar para tipificar *L. monocytogenes* por su alto poder discriminatorio (CDC, 2017; Liu, 2006). Mediante PFGE los aislados de *L. monocytogenes* se clasifican en subtipos o pulsotipos. Desde hace unos años, se introdujo la secuenciación del genoma completo (WGS) en combinación con otros métodos moleculares, lo que facilita aún más la discriminación de cepas (Kwong et al., 2016; Ruppitsch et al., 2015) y la trazabilidad de la contaminación.

I.3. *Listeria monocytogenes* en carne y salame

La contaminación microbiológica en la carne es la fracción de la contaminación inicial proveniente del animal y del ambiente que logra establecerse como dominante en el producto final. Los pasos más contaminantes son el cuereado, la evisceración y la manipulación durante el desosado. En la carne envasada, la microbiota variará en función de diferentes parámetros como pH, actividad del agua (aw), composición, temperatura y condiciones de almacenamiento (Aduyamfi et al., 2012; Ercolini et al., 2006; Li et al., 2006). La modificación de la temperatura de almacenamiento y de la disponibilidad de oxígeno en el envase modifican la composición de la microbiota favoreciendo el desarrollo de especies Gram positivas, anaerobias, no degradativas que corresponden en su mayoría a bacterias ácido lácticas (Egan et al., 1988). Otras especies psicrófilas como *Listeria monocytogenes* también son capaces de establecerse (Tsigarida et al., 2000). La habilidad de *L. monocytogenes* de sobrevivir y crecer a temperaturas de refrigeración, en un amplio rango de pH (4.4 – 9.4) y en ausencia de oxígeno (Nychas et al., 2008) hacen que este patógeno sea uno de los más prevalentes en carne envasada a vacío (Mor-Mur & Yuste, 2010). En lo que respecta a carne producida en Uruguay, los datos disponibles indican que la contaminación con *L. monocytogenes* es frecuente. Bosilevac et al. (2007) encontraron al analizar 226 muestras de carne uruguaya que el 24 % estaban contaminadas con *L. monocytogenes*. También se reportaron hallazgos y rechazos en carne uruguaya exportada a Rusia y Europa por la presencia de *L. monocytogenes* (European Commission. RASSF Portal).

En salames la contaminación microbiológica proviene de la carne utilizada como materia prima, del ambiente de elaboración y el equipamiento utilizado. Los

salames son productos que no requieren de cocción previa para su ingestión por lo que se clasifican dentro de alimentos prontos para el consumo y se consideran alimentos de riesgo moderado (USDA, 2003). *Listeria monocytogenes* por sus características es capaz de desarrollarse y sobrevivir en las condiciones fisicoquímicas de los salames (Nightingale et al., 2006). Varios reportes indican la presencia de *Listeria* en embutidos cárnicos fermentados (EFSA, 2014; Meloni, 2015; P. Skandamis & Gounadaki, 2006). En Uruguay, un relevamiento de alimentos realizado entre el 2011 y el 2013 determinó en chacinados una prevalencia de *L. monocytogenes* del 7 % (IC del 95 %: 2.4 – 11.6) (Braga et al., 2017). A su vez, datos publicados por la Intendencia de Montevideo (<http://www.montevideo.gub.uy/aplicacion/resoluciones>) indican que *L. monocytogenes* está presente en estos productos, sugiriendo que no siempre el proceso de fermentación y secado logran controlar a este patógeno.

I.4. Estrategias de control y mitigación de *Listeria* en carne y derivados

I.4.1 Estrategias en carne

Para reducir el riesgo potencial que presentan la carne y derivados cárnicos contaminados con *Listeria monocytogenes*, se deben implementar a lo largo del proceso de producción estrategias antimicrobianas como el uso de ácidos orgánicos, aplicación de radiación UV-C, vapor y/o agua caliente, entre otras.

La aplicación de ácido láctico (AL) ha sido propuesta como estrategia no térmica para reducir la contaminación bacteriana en carne (Rajkovic et al., 2010). Sin embargo, su eficacia en la reducción de *L. monocytogenes* depende de la concentración de AL aplicada, de la relación volumen de ácido/superficie de carne y de la cepa de trabajo entre otros factores (Bucur et al., 2018; P. N. Skandamis et al., 2008). También se ha reportado que la aplicación de AL produce efectos no deseados en el color de la carne (Rodríguez-Melcón et al., 2017).

Por otro lado, la luz ultravioleta (254 nm) es una tecnología de intervención no térmica que puede utilizarse para la descontaminación de las superficies de los

alimentos (Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas, 2004), pero también se ha aplicado en carne (Kalchayanand et al., 2020). Sin embargo, la resistencia al UV-C es variable entre cepas y se ha visto una mayor resistencia al UV-C de cepas de *L. monocytogenes* cuando son sometidas a pre-stress (Gayán et al., 2015; McKinney et al., 2009).

I.4.2 Estrategias en salame

La producción de salames se basa en gran parte en la fermentación láctica como método de conservación por reducción de pH y exclusión competitiva en un medio con alto contenido de sal (entre 2 y 3 %). Las estrategias usadas para el control de *L. monocytogenes* incluyen el uso de conservantes y de cultivos iniciadores (Toldrá, 2014). Establecida una formulación, las condiciones de fermentación y secado van a condicionar el crecimiento de *L. monocytogenes*, condicionando el descenso del pH y de la aw (Leistner, 2000) hasta alcanzar valores restrictivos ($\text{pH} \leq 4.4$ o $\text{aw} \leq 0.92$ o $\text{pH} \leq 5.0$) para el crecimiento de *Listeria* (ICMSF, 2005). Alcanzar estas condiciones dependerá principalmente de las temperaturas y humedad utilizadas durante la fermentación y el secado (Casaburi et al., 2008), de las características de los cultivos iniciadores (Drosinos et al., 2006; Martín et al., 2022), de los azúcares disponibles para la fermentación y del uso de reguladores de pH (Girard, 1991; Pellicer et al., 2011) como el lactato de sodio (Degenhardt & Anna, 2007; Pellicer et al., 2011).

I.5. Descripción del problema a estudiar en este trabajo

Los cortes cárnicos de mayor valor se comercializan envasados al vacío con una vida útil de dos meses si son conservados a 4 °C y cuatro meses si se conservan a 0 °C (García et al., 2015) y se debe garantizar su inocuidad durante toda su vida útil. La aplicación de AL 5 % es efectiva para reducir la contaminación de *Listeria monocytogenes* en carne envasada a vacío. Sin embargo, su aplicación está limitada por los cambios no deseados en color que generan rechazo por los consumidores (Rodríguez-Melcón et al., 2017). Combinar el uso de AL con otras

estrategias de mitigación que permitan reducir la contaminación bacteriana sin afectar las características sensoriales del producto se plantea como una alternativa atractiva. Ha & Ha (2011) y Parikh et al. (2011) hallaron que cuando se aplica UV-C en combinación con ácido cítrico o hipoclorito de sodio la UV-C puede ser aún más efectiva para eliminar bacterias. Además, la radiación UV-C puede aplicarse luego del envasado, aspecto importante ya que reduce el nivel de *L. monocytogenes*, eliminando la posibilidad de re-contaminación del producto. Por consiguiente, en este trabajo se plantea evaluar la aplicación combinada y seleccionar las condiciones óptimas de AL y UV-C para reducir la contaminación de *L. monocytogenes* a lo largo de la vida útil de los cortes envasados al vacío.

Por otro lado, para los salames en Uruguay el criterio para *L. monocytogenes* es ausencia en 25 gramos (Decreto 588/008, 2008). Datos nacionales reportaron la presencia de *L. monocytogenes* en chacinados secos fermentados (Braga et al., 2017; Intendencia Municipal de Montevideo. Resoluciones), sugiriendo que no siempre el proceso de fermentación y secado logran eliminar del patógeno. En las condiciones de fabricación nacional, no hay estudios disponibles que describan la evolución de *Listeria monocytogenes* durante el proceso de elaboración de los salames ni el impacto de los ingredientes y de las condiciones de proceso sobre la contaminación final de *Listeria* en el producto.

Por consiguiente, en esta tesis se plantea estudiar en las condiciones habituales de producción en Uruguay el efecto de la variación en la temperatura de fermentación y de secado, calibre, cultivos iniciadores y uso de reguladores de acidez sobre la reducción de *L. monocytogenes* durante la elaboración de salames a escala piloto para generar conocimiento útil para implementar medidas. Asumiendo una concentración máxima de *L. monocytogenes* en carne cruda de 3 log ufc/g (Mataragas et al., 2006; Polese et al., 2017; Pouillot & Lubran, 2011; Ross et al., 2009) se considera que una reducción de por lo menos 3 log ufc/g durante el proceso cumpliría el criterio de ausencia en 25 g.

II OBJETIVO GENERAL

Estudiar el comportamiento de *Listeria monocytogenes* en carne envasada al vacío, expuesta a UV-C y ácido láctico, y en salames en distintas condiciones de proceso para obtener en cada matriz las condiciones óptimas que logren la máxima reducción de *L. monocytogenes* en carne y en salame.

II. 1. Objetivos específicos

- Seleccionar las condiciones de aplicación de AL y UV-C que permiten reducir la contaminación de *L. monocytogenes*, aislada de frigoríficos nacionales, en carne envasada al vacío a lo largo de la vida útil, sin producir cambios significativos en el color.
- Estudiar el efecto de la temperatura de fermentación, temperatura de secado y el uso de reguladores de pH sobre la sobrevivencia de *Listeria* durante la producción de salame en la industria nacional, y determinar las condiciones de proceso que garanticen una reducción de por lo menos 3 log ufc/g de *Listeria* en salame.

II.2. Estructura de la tesis

El trabajo realizado y los resultados obtenidos para el cumplimiento de los objetivos planteados se presentan en dos capítulos.

En el capítulo I, *Efecto de la aplicación de ácido láctico y UV-C sobre Listeria monocytogenes en carne envasada a vacío* se presentan los resultados del aislamiento y caracterización de cepas de *L. monocytogenes* de establecimientos frigoríficos nacionales y el estudio de su respuesta al ácido láctico y a UVC in vitro y en carne. Se definen las condiciones óptimas, concentración de ácido

láctico y UV-C, para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* y bacterias ácido lácticas presentes en la carne durante el transcurso de su vida útil.

En el capítulo II, *Estudio a escala piloto del efecto sobre la sobrevivencia de L. monocytogenes que tiene la temperatura de fermentación, la temperatura de secado y el uso de reguladores de pH en la elaboración de salames en las condiciones de producción nacional*. Se presentan los resultados del uso de lactato de sodio y diferentes cultivos iniciadores en la reducción de *Listeria* y pH durante la fermentación. Se determina el efecto de la temperatura de fermentación, la temperatura de secado y el calibre sobre la evolución de *Listeria*, durante la elaboración de los salames y se determinan las condiciones de proceso que garantizan una reducción de por lo menos 3 log ufc/g de *Listeria* en el producto. Se obtiene un modelo matemático que vincula la temperatura de fermentación, temperatura de secado y calibre con el nivel de reducción de *Listeria* durante el proceso y se discute la relación entre los parámetros pH, aw y temperaturas y la evolución de *Listeria* en los salames.

III CAPÍTULO I.

Efecto de la aplicación de ácido láctico y UV-C sobre Listeria monocytogenes en carne envasada a vacío.

III. 1. Introducción

La contaminación de la carne con *Listeria monocytogenes* es consecuencia de la producción proceso (Labadie, 1999). *L. monocytogenes* puede sobrevivir y crecer en carne envasada al vacío almacenada a temperaturas entre 0 y 4 °C; por lo tanto, en los establecimientos frigoríficos se aplican diferentes estrategias para minimizar la contaminación bacteriana (Dorsa, 1997; Nychas et al., 2008). Entre las diferentes estrategias, la aplicación de ácido láctico (AL) está ampliamente aceptada porque no presenta riesgos para la salud del consumidor. La máxima concentración de AL permitida en carne es del 5 % (m/v) (European Food Safety Authority (EFSA), 2011). A su vez, la irradiación con UV-C se destaca por su bajo costo, por no generar residuos químicos potencialmente peligrosos, y por presentar baja huella de carbono (Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas, 2004). Además, es una intervención aprobada por la FDA para la descontaminación de superficies de alimentos (FDA, 2000). Las intervenciones antimicrobianas pueden afectar el color de la carne fresca, característica principal que influye en las decisiones de compra de los consumidores (C. Faustman & Cassens, 1990; Zerby et al., 1999). Los efectos negativos sobre el color de la carne son el principal problema asociado con el uso de ácido láctico, especialmente a alta concentración (Rodríguez-Melcón et al., 2017). Por el contrario, la aplicación de UV-C (118–590 mJ/cm²) en carne fresca no parece causar cambios perjudiciales de color (Kalchayanand et al., 2020).

III.1.2. Ácido láctico

La aplicación de ácido láctico (AL) ha sido propuesta como estrategia para reducir los niveles bacterianos en carne (Rajkovic et al., 2010). El mecanismo de acción del ácido láctico depende de la capacidad del ácido no disociado (pKa = 3.8) para penetrar a través de la membrana celular y disociarse dentro de la bacteria causando una disminución en el pH interno, que puede interrumpir la producción de ATP, la síntesis de ARN, la replicación del ADN y el crecimiento celular (Rajkovic et al., 2010).

El uso de AL fue aprobado principalmente para disminuir la contaminación por *Escherichiacoli O157:H7* y *Salmonella*. Estados Unidos permitió su uso en carne desde 1999 (Koochmaraie et al., 2005), en cambio la Unión Europea (UE) lo aprobó en 2013 (Comisión Europea, 2013). Actualmente, se aplica de manera rutinaria en canales y cortes en establecimientos frigoríficos a nivel mundial. El rango de concentración permitido de la solución de AL está entre 2 y 5 %.

La aplicación de AL entre 2 y 4 % en carne reduce los recuentos de *L. monocytogenes* (Byelashov et al., 2010; DeGeer et al., 2016; Theron & Lues, 2007). Reducciones entre 0.79 y 1.31 log ufc/cm² se obtuvieron en carne vacuna fresca cuando se aplicó entre 1 % y 4 % de AL DeGeer et al. (2016) y 1.56 log ufc/cm² cuando se aplicó ácido láctico al 2 % (Ariyapitipun et al., 2000).

Se han observado diferentes niveles de reducción de *L. monocytogenes* que se han asociado con diferentes factores como la variabilidad en la sensibilidad entre cepas sometidas a estrés y las distintas formas de aplicación de AL (Bucur et al., 2018; P. N. Skandamis et al., 2008). Por otro lado, el AL tiene un efecto negativo sobre el color de la carne, especialmente a concentraciones de 5 % (Rodríguez-Melcón et al., 2017), generando rechazo para el consumidor limitando su aplicación. Este cambio de color se debe a la oxidación de la mioglobina a metamioglobina (Eagerman et al., 1977).

III.1.3. Radiación UV-C

La luz ultravioleta (254 nm) es una tecnología de intervención no térmica que puede utilizarse para la descontaminación de las superficies de los alimentos, no deja residuos y es fácil de implementar en la industria de alimentos (Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas, 2004). La radiación ultravioleta se puede subdividir en tres regiones: UV de onda corta (UV-C) entre 200 y 280 nm, UV de onda media (UV-B) entre 280 y 315 nm y UV de onda larga (UV-A) entre 315 y 400 nm. La acción germicida se produce en el rango UV-C. Sin embargo, la máxima eficiencia para la desinfección se sitúa en los 254 nm. La UV-C causa daños en el ADN de las células expuestas ya que promueve la formación de enlaces entre timinas en cadenas adyacentes del ADN y éstos dímeros de timina inhiben la

correcta replicación del ADN durante la reproducción celular. Los efectos en los enlaces cruzados son proporcionales al tiempo de exposición e intensidad de la luz UV (Sastry et al., 2000; Snowball & Hornsey, 1988). La luz ultravioleta germicida a 254 nm mata eficazmente *L. monocytogenes* (Haughton et al., 2011; Isohanni & Lyhs, 2009; Morey et al., 2010).

La radiación UV-C (200 a 280 nm) se ha utilizado para la descontaminación de superficies de alimentos (Bintsis et al., 2010). También se ha reportado la capacidad de UV-C para inactivar *L. monocytogenes*, siendo esta inactivación dependiente de la cepa y teniendo una correlación directa entre la dosis de UV-C y la reducción de *Listeria monocytogenes* alcanzada (Gailunas et al., 2008; Sommers et al., 2009). Además, la radiación UV-C puede penetrar en el material de empaque, material generalmente utilizado en carne y productos cárnicos, como polipropileno transparente y bolsas de polietileno (Tarek et al., 2015) causando una reducción significativa de *L. monocytogenes* en los alimentos (Sommers et al., 2009).

Lyon et al. (2007) encontraron que un tratamiento de 300 mJ/cm² resulta en una reducción del 99 % de un inóculo de aproximadamente 10⁶ células de *L. monocytogenes*. Stermer et al. (1987) reportaron que una dosis de radiación de 150 mWs /cm² aplicada sobre carne reduce las bacterias en una superficie lisa de carne alrededor de 2 log y que aumentar el nivel de dosis a 500 mJ/cm² reduce el nivel de bacterias un log adicional. A su vez, la UV-C aplicada no tuvo efectos nocivos sobre el color (Hunter "a", enrojecimiento) o apariencia general. Sommers et al. (2009) también estudiaron el efecto de la aplicación de UV-C sobre *L. monocytogenes* en la superficie de frankfruters antes y después de envasados. En este estudio, la irradiación con UV-C del producto que fue inoculado con *L. monocytogenes* resultó en una reducción logarítmica de 1.31, 1.49 y 1.93 a dosis de 1000, 2000 y 4000 mJ/cm², respectivamente. El tratamiento con una dosis de 2000 mJ/cm² luego de envasado resultó en una reducción logarítmica de 0.97 ± 0.14. En ningún caso, el tratamiento con UV-C tuvo efecto sobre el color o la textura de los frankfruters (Sommers et al., 2009).

III.1.4. Hipótesis y estrategia de trabajo

En el presente trabajo, se plantea como hipótesis que la aplicación combinada de AL a bajas concentraciones y UV-C después del envasado al vacío podría lograr un nivel significativo de reducción de la contaminación por *L. monocytogenes* en la carne vacuna con un impacto mínimo en el color. Además, se espera que la aplicación de AL/UV-C también impacte en otras bacterias presentes en la carne envasada al vacío, en especial bacterias ácido lácticas (Kalchayanand et al., 2020; Signorini et al., 2006) que tiene un impacto en la vida útil (García et al., 2015; Pennacchia et al., 2011), por lo que el efecto de la aplicación combinada sobre ellas puede ser relevante.

En los últimos años, se ha prestado especial atención al diseño experimental y metodología de superficie de respuesta (RSM) para optimizar las condiciones en diferentes sistemas (Martinez-Silveira et al., 2019; Zimet et al., 2018). Estas herramientas de modelado permiten el estudio de los efectos simultáneos de diferentes factores y sus interacciones. La estrategia de RSM para estudiar los efectos de la combinación de AL y UV-C en carne vacuna envasada al vacío no ha sido muy utilizada. Hasta la fecha, solo se encontró un trabajo que describe una estrategia similar para estudiar los efectos de la aplicación de AL y UV-C en la reducción de *Salmonella typhimurium* sobre trozos de lomo curado Brasileño (Rosario et al., 2021).

En esta tesis, se propone utilizar un diseño central compuesto de dos factores y una metodología de superficie de respuesta (RSM) para optimizar la concentración de AL y la dosis de UV-C aplicada a la carne envasada al vacío que reduzca la cantidad de *L. monocytogenes* sin provocar efectos significativos sobre el color de la carne. Debido a que la sensibilidad de *L. monocytogenes* frente al AL y al UV-C es dependiente de la cepa (Bucur et al., 2018; Kalchayanand et al., 2020; P. N. Skandamis et al., 2008), en este estudio se pretende utilizar cepas de *L. monocytogenes* provenientes de establecimientos frigoríficos nacionales que serán aisladas y caracterizadas.

III.2. Objetivo general

Seleccionar las condiciones de aplicación de AL y UV-C que permiten reducir la contaminación de *L. monocytogenes*, aislada de frigoríficos nacionales, en carne envasada al vacío a lo largo de la vida útil, sin producir cambios significativos en el color.

III.2.1. Objetivos específicos

- Aislar, identificar y caracterizar cepas de *Listeria spp.* presentes en carne uruguaya.
- Estudiar el comportamiento *in vitro* de las cepas aisladas frente al AL y UV-C.
- Evaluar el efecto de la aplicación de AL en carne sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*.
- Evaluar el efecto de la aplicación de UV-C en carne sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*.
- Evaluar el efecto combinado de la aplicación de AL y UV-C en carne envasada al vacío sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* y definir las condiciones óptimas para controlar el crecimiento del patógeno sin alternaciones significativas en el color.
- Evaluar el efecto de la aplicación de AL/UV-C en las condiciones óptimas en la evolución de *L. monocytogenes* y bacterias ácido lácticas en carne envasada al vacío y almacenada a 4°C durante el transcurso de su vida útil.

III.3. Materiales y métodos

III.3.1 Búsqueda y aislamiento de *Listeria*

Se tomaron muestras de la superficie de 12 canales antes de ingresar a las cámaras de maduración, y recogieron 10 muestras de carne en diferentes puntos de la línea de desosado de los cortes del trasero en dos establecimientos frigoríficos (F1 y F2) de nuestro país. Las muestras de superficie de canales se realizaron utilizando esponjas estériles (Whirl-Pak®) previamente hidratadas con 10 mL de buffer Butterfield. Se utilizó una esponja por cada media canal, y la superficie total muestreada fue de aproximadamente 8000 cm² (Arthur et al., 2004). Para las muestras de carne se tomaron asépticamente 100 gramos de 10 cortes de carne seleccionados al azar y se colocaron en bolsas estériles. Las esponjas y las muestras de carne se conservaron refrigeradas (4 °C) y se trasladaron hacia el laboratorio para su análisis.

En el laboratorio, esponjas y 10 g por muestra de carne se colocaron individualmente en bolsas estériles con 90 mL de medio Half Fraser (Oxoid), con suplemento Half Fraser SR0166 (Thermo) y se incubaron a 30 °C durante 24 ± 3 horas. Posteriormente, se transfirió 0.1 mL de cada cultivo a 10 mL de medio de enriquecimiento secundario Fraser (Oxoid), con agregado de suplemento Fraser SR0156 (Thermo) y se incubaron a 37 °C durante 48 ± 3 horas. Luego, se realizó aislamiento por estrías en placas de agar Palcam con agregado del suplemento selectivo para Palcam SR0150 (Thermo) y se incubaron a 37 °C por 48 horas. Se tomaron cinco colonias características de *Listeria* spp. en agar Palcam (2 mm de diámetro, coloración verde-grisácea con halo marrón oscuro-negro) y se aislaron sucesivamente en placas con agar tripticasa de soja (TSA) (Oxoid) suplementado con 0.6 % de extracto de levadura (YE) (Oxoid) (TSA-YE), a 37 °C durante 18 horas. Para su conservación, se repicaron de una colonia a un tubo de TSA-YE inclinado, y se incubaron 18 - 20 horas a 37 °C. Luego se mantuvieron refrigeradas (4 ± 1°C) hasta el momento de su uso. Para el almacenamiento durante períodos prolongados, se conservaron en TSB-YE con 20 % de glicerol a -80 °C.

III.3.2. Caracterización de los aislamientos de *Listeria*

III.3.2.1 Confirmación de género y especie por tinción Gram, actividad catalasa y galerías API

Para realizar la tinción de Gram y la prueba de catalasa se partió de una colonia de un cultivo joven (18 - 24 horas) de placas de TSA-YE. Para el sistema de galerías API *Listeria*, se suspendieron tres colonias aisladas de cultivos jóvenes (18 - 24 horas) en una ampolla de API Suspension Medium (2 mL) y se realizó el ensayo según instrucciones del fabricante. Se incubó 18 - 24 horas a 36 ± 2 °C en atmósfera aerobia.

III.3.2.2 Confirmación de género y especie por métodos moleculares

La confirmación de género y especie de los aislamientos a nivel molecular se realizó mediante una PCR multiplex a tiempo final y una PCR a tiempo real. Para la extracción de ADN se utilizó el kit Mericon™DNA Bacteria Plus Kit (Qiagen), a partir de un cultivo en medio TSB con extracto de levadura incubado a 37 °C durante 18 horas. La PCR múltiplex utilizada fue una modificación de la reportada por Bubert et al. (1999). Se utilizaron los cebadores, MonoA(F), Ino2(F) y Siwi2(F) y Lis1B(R) (Bubert et al., 1999) y Gra1(F) (Acquistapace, 2015). La reacción consistió en 30 ciclos: 95 °C durante 15 segundos, 58 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 50 segundos. Se utilizó un termociclador Rotor–Gene Q. Se usó como control negativo el buffer de lisis, como control positivo para *L. innocua*, la cepa de ATCC® 33090, y como control positivo para *L. monocytogenes*, la cepa ATCC® 19111. Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % en buffer TAE 1X. Los productos de PCR de los aislados L100A1, L101B2, L10 y L80 fueron purificados usando el QIAquick® de Qiagen y mandados a secuenciar a Macrogen Inc. (Seoul, Korea).

Para la PCR a tiempo real se utilizaron los pares de cebadores prs-2(F) y prs-2-deg(R) para identificar *Listeria* spp., el par hlyA-177(F) y (R) y el par hlyA-146-

deg-tronc(F) y (R), ambos para identificar *L. monocytogenes* (Barbau-Piednoir et al., 2013). El programa térmico para las tres reacciones consistió en: un ciclo de activación de ADN polimerasa de 5 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos de amplificación de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. Luego se realizó la curva de desnaturalización de los productos de la amplificación mediante el aumento gradual de la temperatura de 60 a 95 °C en 20 minutos (± 0.6 °C/20 segundos) utilizando el termociclador Rotor–Gene Q. La reacción se realizó en un volumen final de 25 μ L, con 2 μ L de ADN muestra, 1X Rotor-Gene™ SYBR®Green PCR Master Mix (Qiagen) y 500 nM de cada cebador.

III.3.2.3. Serotipificación molecular de *L. monocytogenes*

La serotipificación molecular de los aislamientos de *L. monocytogenes* se realizó según el método reportado por Doumith et al. (2004) por PCR dirigida a los genes: *prs*, *ORF2110*, *ORF2819*, *Imo1118* e *Imo0737* (Anexo I).

Los productos de PCR fueron visualizados luego de electroforesis en gel de agarosa al 2 % en buffer TBE 1X. Los productos de PCR se sembraron con buffer UView™ 6X Loading Dye (Biorad) y se utilizó el marcador de peso molecular de 100pb (Biorad). El gel fue teñido con SYBR™ Safe 10.000X (0.1 μ l/ml de gel) por 10 minutos y visualizado bajo luz ultravioleta en un transiluminador.

III.3.2.4. Tipificación de *L. monocytogenes* por Electroforesis de campo pulsado (PFGE)

Los aislados de *L. monocytogenes*, se tipificaron mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE por sus siglas en inglés Pulsed Field Gel Electrophoresis) de acuerdo con el protocolo estandarizado Pulse-Net del Center for Disease Control and Prevention (EEUU) utilizando las enzimas de restricción *Ascl* y *Apal* (Stekelenburg & Kant-Muermans, 2001) (CDC, 2017). Las condiciones para la electroforesis fueron: tiempo inicial y final de pulsado 4 y 40 segundos respectivamente, voltaje 6 V, ángulo de inclusión 120 grados y tiempo de corrida 19 horas. Los patrones resultantes de la electroforesis se analizaron

de manera visual, basándose en el criterio de tipificación de cepas bacterianas propuesto por Tenover et al. (1995); en el cual, si dos patrones no difieren en sus bandas, se consideran indistinguibles.

*III.3.3. Sensibilidad de los aislamientos de *L. monocytogenes* frente a ácido láctico y UV-C*

*III.3.3.1 Sensibilidad de *L. monocytogenes* frente al ácido láctico en microplaca*

Para los aislamientos de *Listeria monocytogenes*, se determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del ácido láctico, mediante la técnica de microdilución en caldo y posterior siembra en placas de agar Palcam con agregado del suplemento selectivo para Palcam (SR0150 Thermo). Los inóculos se prepararon a partir de cultivos en fase exponencial, ajustando la absorbancia (625 nm) en un rango entre 0.08 y 0.10 equivalente al patrón 0.5 de la escala de McFarland (1.5×10^8 ufc/mL) y se diluyeron en buffer Butterfield estéril hasta alcanzar una concentración final de 1×10^6 ufc/mL. Las soluciones de ácido láctico de diferentes concentraciones se prepararon con agua destilada estéril a partir de una solución comercial de ácido láctico 85 % (m/v) (PURAC®, Corbion, Nortedur S.A., Montevideo, Uruguay). Para determinar la CMI se utilizaron placas de 96 pocillos. La concentración inicial del inóculo en cada pocillo fue de 2.5×10^6 ufc/mL y las concentraciones de ácido láctico en el pocillo fueron 1.2 %, 0.7 %, 0.4 %, 0.3 %, 0.2 %, 0.1 % y 0 %. Se realizaron controles positivos (inóculo + TSB-YE) y controles negativos (la concentración más alta de ácido láctico + TSB-YE). Las placas se incubaron a 35 °C durante 16- 20 horas. La lectura de absorbancia de la microplaca se realizó en un lector de placas Multiskan Ex, Thermo Scientific® a 620 nm. Se considera la concentración mínima inhibitoria (CMI) a la mínima concentración de ácido láctico en la que no se observa desarrollo bacteriano (valor de OD \leq 0.05) (Branen & Davidson, 2004). A su vez, se midió el pH en la microplaca luego del

periodo de incubación para las distintas concentraciones de ácido utilizando un pHmetro Hanna® modelo 9025c.

Para determinar la CMB se tomaron 100 μ L de los pocillos sin crecimiento visible de la bacteria ($OD \leq 0.05$) y se sembraron en placas de agar Palcam con agregado del suplemento selectivo para Palcam (SR0150 Thermo). Las placas de agar Palcam se incubaron a 37 °C y se contaron a las 48 horas. Se considera la concentración mínima bactericida (CMB) a la menor concentración de ácido láctico que en placas de agar es capaz de eliminar el 99.99 % del inóculo inicial (lo que se visualiza por la ausencia de colonias en placa). Los ensayos se realizaron por triplicado para cada aislamiento seleccionado. Las diferencias entre los tratamientos se determinaron mediante ANOVA, seguido de la prueba de Tukey ($p < 0.05$) utilizando el programa estadístico InfoStat/E (Universidad Nacional de Córdoba).

III.3.3.2. Sensibilidad de los aislamientos de *L. monocytogenes* a diferentes dosis de UV-C en placa

Se estudió para diferentes dosis de UV-C (0, 4, 7, 11, 16 y 31 mJ/cm²) la sobrevivencia de *L. monocytogenes*: ATCC 19111, L100A1 y L101E3 en cultivos en placas de TSA-YE. Para ello, se sembraron las placas con 100 μ L del inóculo de 10³ ufc/mL de la cepa seleccionada y se dejó 10 minutos para su fijación. Inmediatamente, se realizó la exposición de las placas sembradas abiertas a las diferentes dosis de UV-C. Se utilizó la lámpara UV-C con las siguientes especificaciones: potencia 30 W T6 tubular double-ended 254 nm UV germicidal lamp (Código ZW30S19W-Z894, Cnlight Co., Ltd., Guangdong, China), diámetro 19 mm, largo 894 mm e Intensidad de UV a 7 cm de 3.137 W/cm². Luego de finalizada la aplicación de UV-C, las placas se incubaron en estufa a 37 °C por 24 h para el posterior recuento de éstas. Estos ensayos se realizaron por triplicado para cada cepa. Los recuentos obtenidos de las diferentes dosis de UV-C para cada nivel de inoculación se promediaron y se calculó el porcentaje de sobrevivencia (% S) para cada caso. Luego usando el programa estadístico InfoStat/E se graficaron los % S en función de la dosis de UV-C para cada cepa

en estudio y se realizó el análisis de regresión no lineal. Utilizando los modelos de mejor ajuste resultantes se calculó la dosis letal 50 (DL50) para cada cepa.

III.3.4. Efecto inhibitorio de la aplicación del ácido láctico y del UV-C en carne envasada al vacío sobre el crecimiento de L100A1

*III.3.4.1 Preparación de las muestras de carne inoculadas con *L. monocytogenes**

Se utilizó la cepa de *L. monocytogenes* (L100A1) para los estudios en carne. El cultivo de L100A1 se cultivó hasta la fase estacionaria toda la noche a 35 °C en caldo TSB (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) suplementado con extracto de levadura al 0.6 % (Oxoid Ltd., Hampshire, UK). Luego se centrifugó y se diluyó con Buffer Buterfield hasta una concentración aproximada de 6 log ufc/mL. Se utilizó bife angosto (músculo largo dorsal) envasado al vacío adquirido en una carnicería de Montevideo, del cual se cortaron trozos de 10 gramos (5 cm x 5 cm). Luego se colocaron sobre una superficie limpia, previamente expuesta a radiación UV-C durante 20 minutos y se inocularon superficialmente de forma aséptica con 1 mL de L100A1 de 1×10^6 ufc/mL esparcido con rastrillo. Se dejaron reposar 20 minutos a temperatura ambiente (20 °C) para permitir la fijación del inóculo a la superficie de cada trozo de carne (Carpenter et al., 2011) previo a aplicar los tratamientos.

III.3.4.2. Tratamiento con ácido láctico

Doce trozos de 10 gramos (5 cm x 5 cm) inoculados con *L. monocytogenes* se trataron por duplicado con ácido láctico al 0, 2.5 % y 5 % m/v cubriendo la superficie de la carne con 1.5 mL del ácido, a razón de 0.06 mL de ácido por cm² de carne (Youssef et al., 2012). Las soluciones de ácido láctico se prepararon diluyendo una solución concentrada de ácido láctico 85 % m/v (PURAC®, Corbion, Montevideo, Uruguay) con agua destilada esterilizada. Se prepararon soluciones frescas antes de cada prueba. Transcurridos 20 minutos, los trozos

de carne tratados se envasaron al vacío individualmente en bolsas Cryovac T7335B, utilizando una envasadora SAMMIC modelo V-410SGI. Un grupo de muestras se analizó inmediatamente (tiempo cero) y el segundo grupo fue almacenado a 4 °C y analizado a los 14 días.

III.3.4.3. Tratamiento con UV-C

Doce trozos de 10 gramos (5 cm x 5 cm) de carne inoculados se envasaron al vacío individualmente en bolsas Cryovac T7335B utilizando la envasadora SAMMIC modelo V-410SGI. Luego se expusieron a diferentes dosis de UV-C sobre ambas caras (0, 47 y 94 mJ/cm²). Los tratamientos se realizaron por duplicado.

La intensidad de aplicación UV-C a la distancia de trabajo fue de 3.137 mW/cm² medida con un ZED Smart Meter s/N 800,009 (EN61326-1-2013) y el sensor de referencia D-SICONORM-LP-REF-500 W/m². Antes de cada prueba, la lámpara UV-C se acondicionó durante 20 minutos para estabilizar la emisión de UV-C. Los tratamientos UV-C no aumentaron la temperatura de la superficie de la carne a más de 20 °C. Un grupo de muestras se analizó inmediatamente (tiempo cero) y el segundo grupo fue almacenado a 4 °C y analizado a los 14 días.

III.3.4.4 Recuento de *L. monocytogenes*

Para el análisis de cada muestra se transfirió asépticamente cada trozo de carne a una bolsa estéril para stomacher, y se homogeneizó con 90 mL de buffer Butterfield en Stomacher Seward 400C LabBlenders, a 230 rpm durante 2 minutos. Se plaquearon 100 µL del homogeneizado en placas de agar Palcam con agregado del suplemento selectivo para Palcam (SR0150 Thermo), y se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Se realizaron los recuentos de *L. monocytogenes* y los resultados se expresaron como log ufc/g de carne. Las diferencias entre los tratamientos se determinaron mediante ANOVA, seguido de la prueba de Tukey con un nivel de significación del 5 % ($p < 0.05$) utilizando el programa Infostat/E.

III.3.5. Efecto y optimización de la aplicación combinada de UV-C y AL en carne sobre L100A1

Se evaluó el efecto combinado de la aplicación de ácido láctico y radiación UV-C para reducir *Listeria monocytogenes* en un corte de carne (peceto: músculos *Bíceps femoral* y *Semitendinoso*) utilizando la cepa L100A1. Para ello, se usó un diseño experimental central compuesto de dos factores con cinco puntos centrales, utilizando el Design-Expert® (Versión 10, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, E.E.U.U.). Las variables independientes fueron: concentración de ácido láctico (0 – 5 % m/v) y dosis de UV-C (0-330 mJ/cm²) y las variables dependientes: reducción de *L. monocytogenes* respecto al control en log ufc/g y color de la carne. En la Tabla 1 se muestra la matriz de diseño.

Para este ensayo, se inocularon 21 trozos de carne de 10 gramos con 5.8 log ufc de L100A1 y luego de 10 minutos se asperjaron con 1.5 mL de ácido láctico a la concentración que indicó el diseño para cada caso e inmediatamente se envasaron al vacío y se aplicaron dosis variables de UV-C también según el diseño. Se usaron bolsas termocontraíbles multilaminar (EVA, PVDC, PE) con una tasa de transmisión UV-C del 76% (Cryovac® BB 2620; 50 m de espesor, permeabilidad al oxígeno de 20 cm³m⁻², 24 h, a 23 °C, y 75 % de humedad relativa; y permeabilidad máxima al dióxido de carbono de 100 cm³m⁻², 24 h, a 23 °C, y 75 % HR) mediante el uso de una envasadora al vacío SAMMIC modelo V-410SGI (España). Después del envasado, cada lado de las muestras se expuso a 3.137 mW/cm², a 7 cm de la lámpara emisora, durante 53, 105 y 127 segundos, consiguiendo dosis de UV-C de 165, 330 y 398 mJ/cm² respectivamente. El rango de dosis de UV-C se seleccionó teniendo en cuenta las dosis de UV-C aplicadas en carne vacuna reportada por Kalchayanand et al. (2020) que no afectaron su color.

Tabla 1. Matriz de diseño experimental (Design-Expert®) con 21 corridas experimentales que incluyen 8 puntos factoriales y 8 axiales con cinco repeticiones en el punto central.

Corrida	Ac. Láctico (% m/v)	Dosis UV-C (mJ/cm ²)
1	2.5	398
2	0.0	165
3	2.5	0
4	2.5	0
5	2.5	165
6	5.0	330
7	5.0	330
8	5.0	0
9	2.5	165
10	0.0	0
11	2.5	165
12	2.5	398
13	0.0	165
14	6.0	165
15	0.0	0
16	5.0	0
17	2.5	165
18	6.0	165
19	0.0	398
20	0.0	398
21	2.5	165

Se realizaron los recuentos de L100A1 en placas de Agar Palcam. Los resultados de los recuentos se promediaron, se transformaron en logaritmos y se expresaron como reducción en log de L100A1 por gramo de carne en comparación con la muestra sin tratamiento. Se realizó un set adicional de muestras para efectuar las medidas instrumentales de color usando un

colorímetro (medidor de Cromo Minolta C10) en el espacio de color L*, a*, b*. Las medidas de color se expresaron con el valor Cromo, el cual se calculó como $C^* = \sqrt{a^2 + b^2}$. Una vez obtenido el modelo predictivo de respuesta, se calculó la concentración óptima de AL y dosis de UV-C que maximizan la reducción de *Listeria monocytogenes* en carne sin modificar de manera apreciable el color en relación con la carne sin tratamiento, Cromo > 20 (MacDougall, 1982). Para validar el modelo obtenido, se aplicaron los valores óptimos calculados de AL y UV-C a trozos de carne por triplicado de la misma forma que se realizó anteriormente y se compararon los valores de reducción de *L. monocytogenes* obtenidos con los resultados predichos por el modelo.

III.3.6. Estudio del efecto en el tiempo a 4 °C del tratamiento combinado de 2.6 % de AL y 330 mJ/cm² de UV-C sobre L. monocytogenes, BAL, enterobacterias y coliformes.

Con los valores óptimos de porcentaje de AL y dosis de UV-C dados por el modelo predictivo, que minimizan la reducción de *L. monocytogenes* en carne sin modificar de manera apreciable el color, se realizó un seguimiento en el tiempo. Para ello, se aplicó a trozos de 10 gramos del mismo tipo de carne usada en el punto 3.7 (Peceto) e inoculados con la cepa de *L. monocytogenes* L100A1 2.6 % de AL, se envasaron al vacío y se sometieron a dosis de UV-C de 330 mJ/cm². Se realizó un set de muestras control, inoculadas, pero sin la adición de AL ni aplicación de UV-C. Las muestras se almacenaron a 4 °C y se realizaron los recuentos de *L. monocytogenes* en placas de Agar Palcam, bacterias ácido lácticas en placas de MRS, enterobacterias y coliformes en placas 3M™ Petrifilm™ para cada tiempo de estudio (0, 14, 28, 42 y 56 días). Para cada tiempo de análisis y para cada condición (con y sin tratamiento) se realizaron 3 muestras. A su vez, también se realizó por separado dos sets de muestras (con muestras control y tratadas en cada uno) para efectuar las medidas de color y pH superficial en carne para cada tiempo de estudio. Para las medidas de pH se utilizó un pHmetro Hanna® modelo 9025c con un electrodo de superficie.

III.4. Resultados y Discusión

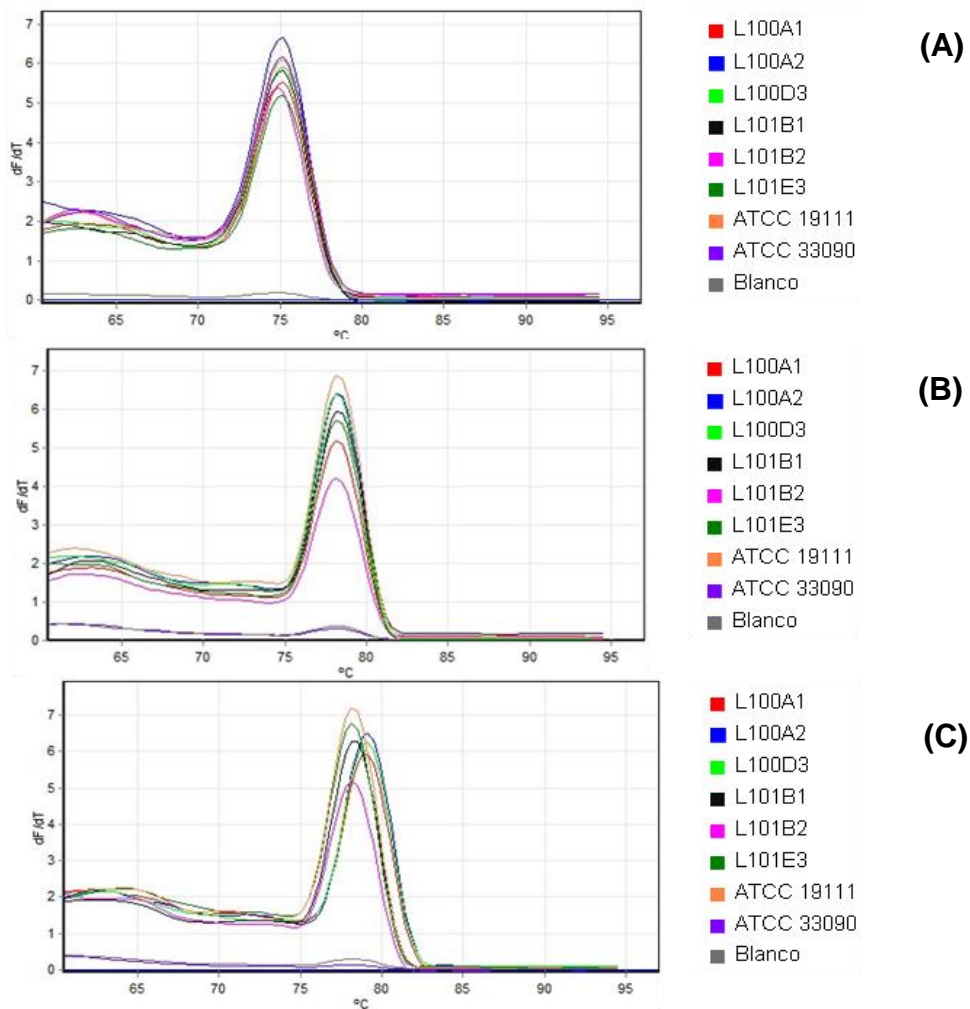
III.4.1. Resultados de la búsqueda, aislamiento y caracterización de los aislamientos de *Listeria spp.*

Del muestreo realizado de la superficie de canales antes de ingresar a la cámara de maduración, no se recuperó *Listeria spp.*, pero sí se recuperó de todas las muestras de carne tomadas en la sala de desosado de ambos establecimientos frigoríficos. A pesar de haber analizado un número bajo de muestras, los resultados concuerdan con lo reportado por Nychas et al. (2008) y Mclauchlin et al. (2004) mostrando que la presencia de *Listeria spp.* en carne se debe principalmente a la contaminación que se produce durante la manipulación por cepas presentes en ambiente y equipos. Por otro lado, el hecho de que se haya recuperado *Listeria* de todas las muestras de carne analizadas en ambos establecimientos se debe a que las muestras se tomaron en sitios de alto riesgo de contaminación y a la existencia de una elevada prevalencia. En este sentido, Bosilevac et al. (2007) determinaron en carne uruguaya exportada a Estados Unidos una prevalencia de *Listeria* del 29 %, es decir, 66 de las 226 muestras analizadas contenían al menos una especie de *Listeria*.

Se obtuvieron 35 aislamientos, todos fueron Gram y catalasa positivos, características propias del género *Listeria*. En el análisis molecular utilizando la PCR multiplex desarrollada por Bubert et al. (1999) se obtuvieron amplicones con el número de pares de bases esperados para *L. innocua* (870 bp) y para *L. monocytogenes* (660 pb). No se observaron amplicones correspondientes a las especies *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. La secuencia de los amplicones de los aislados L100A1 y L101B2 identificados por PCR como *L. monocytogenes* presentaron 100 % de homología con secuencias para la misma región de cepas de *L. monocytogenes* reportadas en el banco genómico de datos de NCBI. También se obtuvo 100 % de similitud con la secuencia de los amplicones de dos aislados identificados por PCR como *L. innocua* (L10 y L80) y secuencias de la misma región de cepas de *L. innocua* reportadas en NCBI.

Coincidiendo con los resultados de las galerías API, de los 35 aislamientos obtenidos, 29 correspondieron a *L. innocua* y 6 a *L. monocytogenes*. Los 6 aislados de *L. monocytogenes* provinieron del mismo frigorífico y presentaron el perfil numérico API 6510 siendo este uno de los dos perfiles numéricos más frecuentemente aislado de alimentos (Ballesteros et al., 2009).

A los seis aislamientos identificados como *L. monocytogenes* por PCR multiplex y galerías API se les determinó la presencia de los genes *prs* y *hlyA* (Gráfica 1A y Gráfica 1B). Utilizando el par de cebadores *hlyA*-146-deg-tronc(F) y *hlyA*-146(R) se observó que las curvas de disociación de los amplicones correspondientes a los seis aislamientos se separaron en dos grupos (Gráfica 1C). Los aislados L100A1, L100A2 y L100D3 presentaron una T_m de 79 °C, mientras que L101B1, L101B2, L101E3 y la ATCC 19111 una T_m de 78.2 °C. De acuerdo con Barbau-Piednoir et al. (2013) se puede inferir que se encontraron por lo menos dos serotipos distintos de *L. monocytogenes*. La serotipificación molecular, según la PCR multiplex reportada por Doumith et al. (2004), permitió identificar a los aislados L100A1, L100A2 y L 100D3 como perteneciente al serogrupo molecular IVb, mientras que los aislados L101B1, L101B2 y L101E3 al serogrupo IIa. (Figura 1).



Gráfica 1. Curvas de disociación de qPCR obtenidas con SYBR® Green Los diferentes ensayos de qPCR son **A:** *prs-2-deg*, **B:** *hlyA-177* y **C:** *hlyA-146-deg-tronc*.

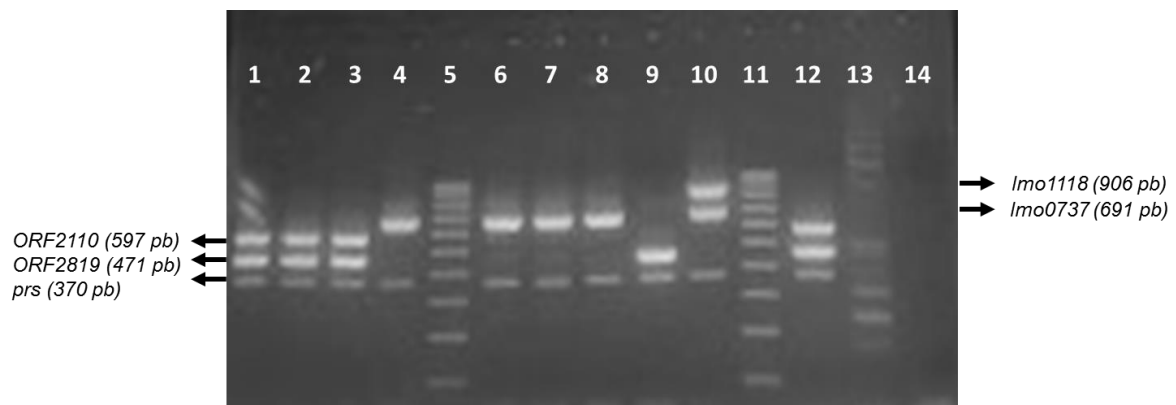


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de fragmentos de ADN generados por PCR multiplex con los aislamientos de *L. monocytogenes*. Carriles 1 a 8: Aislados L100A1, L100A2, L100D3, L101B1, Marcador de peso molecular (100-1000 pb), aislados L101B2, L101E3 y cepa de referencia ATCC® 19111™ serotipo 1/2a; Carriles 9 a 14: *L. monocytogenes* 1/2b, *L. monocytogenes* 1/2c, marcador de peso molecular (100-1000 pb), cepa de referencia ATCC® 13932™ serotipo 4b, Control negativo (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC® 14028™) y Blanco de PCR respectivamente. Los genes correspondientes a los fragmentos amplificados se indican a la derecha e izquierda de la figura.

Se determinaron los serogrupos IIa y IVb. De los resultados de la PCR en 4.2.2 (posible 1/2b, 3b, 4b ó 4c) y de la serotipificación molecular (serogrupo IVb) se concluye que L100A1, L100A2 y L100D3 pertenecen al serotipo 4b. Ambos resultados obtenidos (PCR molecular y serotipificación molecular) para L101B1, L101B2 y L101E3 indican que podrían pertenecer tanto al serotipo 1/2a como al serotipo 3a. Sin embargo, este último rara vez es aislado a partir de alimentos, por lo que podemos inferir que L101B1, L101B2 y L101E3 pertenecen al serotipo 1/2a. Los serotipos 1/2a y 4b son los más frecuentemente aislados de alimentos y pacientes (Doumith et al., 2004). Las cepas de *L. monocytogenes* pertenecientes al serotipo 4b (PCR serogroups IVb) se asocian con el 50% de los brotes de listeriosis, mientras que cepas del serotipo 1/2a son las más frecuente aisladas de alimentos (Burall et al., 2017; Maury et al., 2016). Sumado a esto, Bosilevac et al. (2007) reportaron que de las cepas de *L. monocytogenes* encontradas en carne uruguaya, 5 % pertenecían al serotipo 1/2a y 38 % al 4b, sugiriendo que estos serotipos son frecuentes en el ambiente frigorífico.

Los perfiles obtenidos por electroforesis en campos pulsados con las enzimas de restricción *Apal* y *Ascl* de los seis aislados de *L. monocytogenes* mostraron dos patrones o pulsotipos distinguibles. Un pulsotipo correspondió a los aislados L100A1, L100A2 y L100D3 que mostraron el mismo patrón de bandas para ambas enzimas (pulsotipo 1) y el otro a los aislados L101B1, L101B2 y L101E3 (pulsotipo 2). A su vez, la cepa ATCC® 19111™ presentó un pulsotipo diferente (pulsotipo 3) a los 6 aislados antes mencionados.

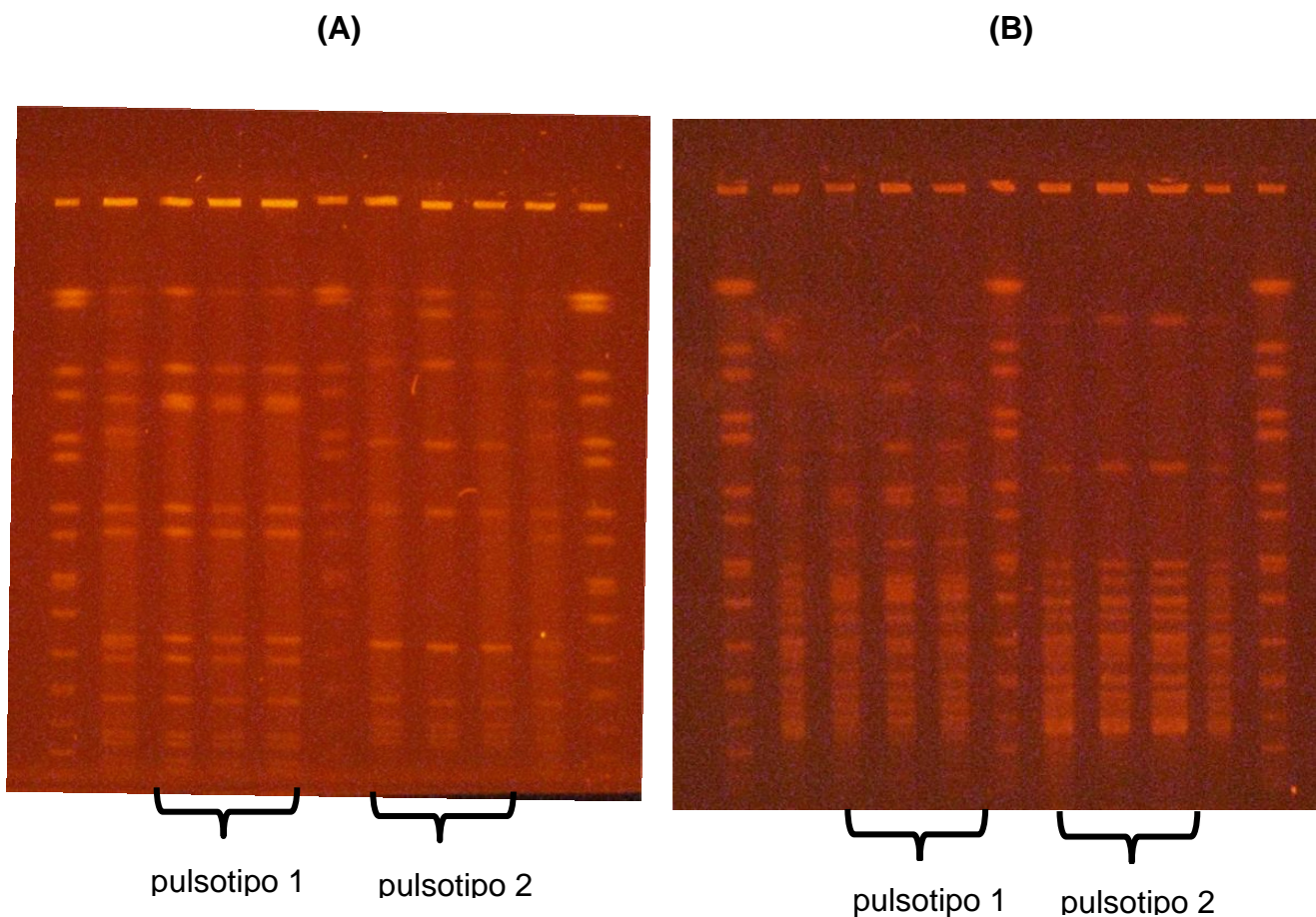


Figura 2. Perfiles genotípicos por PFGE de ADN genómico aislado de *L. monocytogenes*, obtenidos con **(A)** enzima *Ascl*. **(B)** enzima *Apal*. Carriles 1, 6, 11: Marcador molecular de *Salmonella enterica* serotipo Braenderup cepa H9812 digerida con *XbaI*. Carriles 2-5: ATCC® 19111™ y los aislados de *L. monocytogenes* L100A1, L100A2 y L100D3. Carriles 7-10: aislados de *L. monocytogenes* L101B1, L101B2, L101E3 y ATCC® 19111™.

De los resultados de caracterización molecular y tomando en cuenta el origen de los aislamientos se sugiere que, de los 6 aislamientos de *L. monocytogenes*

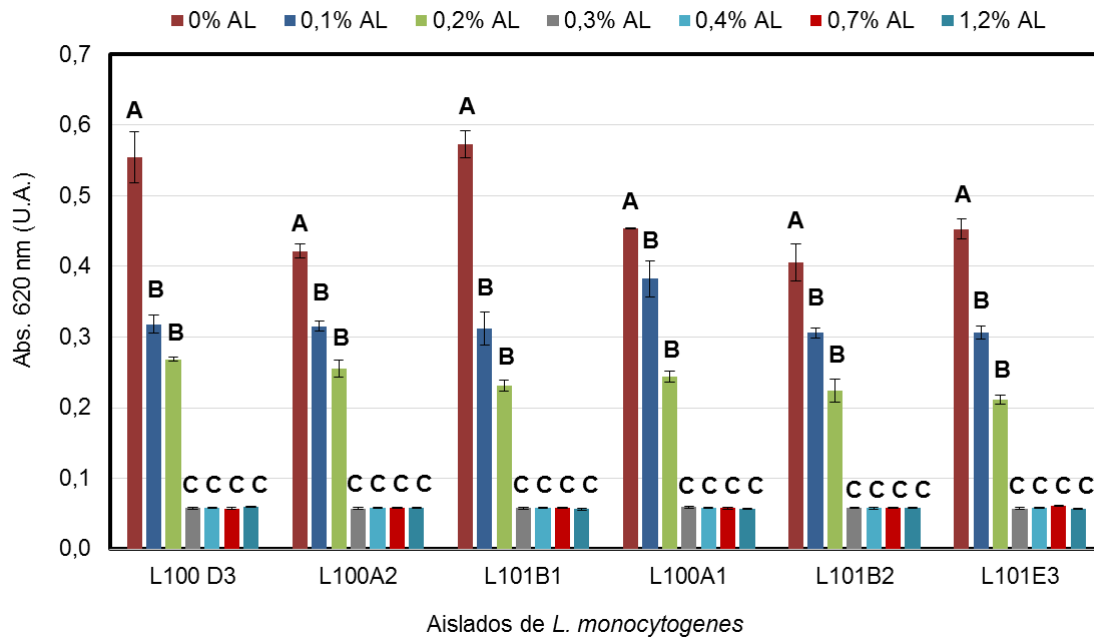
obtenidos, L100A1, L100A2 y L100D3 de serotipos 4b corresponden a una misma cepa, mientras que los aislados L101B1, L101B2 y L101E3 de serotipo 1/2a son también aislados de una misma cepa, pero diferente a la anterior. En suma, estos resultados muestran la coexistencia en la misma zona de producción y en el mismo establecimiento frigorífico de por lo menos dos cepas de *L. monocytogenes* de diferente serotipo (una 4b y otra 1/2a). Los resultados de la caracterización molecular de los 6 aislamientos de *L. monocytogenes*, provenientes del mismo establecimiento frigorífico, se resumen en la Tabla 2

Tabla 2. Caracterización molecular de los aislamientos de *L. monocytogenes* encontrados.

Aislado	Especie	Serotipo	Pulsotipo con	
			Apal	Ascl
L100A1	<i>L. monocytogenes</i>	4b	1	1
L100A2	<i>L. monocytogenes</i>	4b	1	1
L100D3	<i>L. monocytogenes</i>	4b	1	1
L101B1	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	2	2
L101B2	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	2	2
L101E3	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	2	2

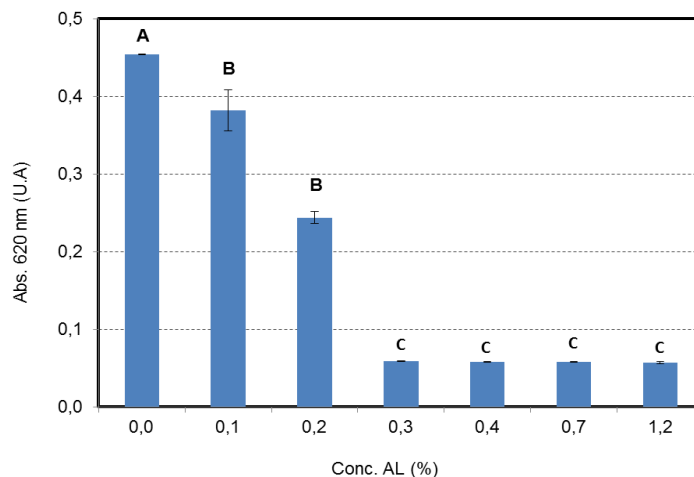
II.4.2. Sensibilidad de los aislamientos de *L. monocytogenes* al ácido láctico en microplaca

Todos los aislados de *L. monocytogenes* (6) expuestos al ácido láctico presentaron el mismo patrón de inhibición de crecimiento (Gráfica 2). La mínima concentración de ácido láctico en el pocillo a partir de la cual no se observó crecimiento fue de 0.3 % (Gráfica 3). La siembra en placas de agar Palcam de los cultivos provenientes de los pocillos de la microplaca en los que hubo inhibición de crecimiento mostró que a partir de una concentración de 0.7 % de AL ya no se recuperan colonias viables. Valores similares fueron reportados por Oh (1993), quien observó que una concentración de 0.25 % de ácido láctico inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes* en caldo de TSB-YE a 35 °C.



Gráfica 2. Sensibilidad de los aislamientos de *L. monocytogenes* frente a diferentes concentraciones de ácido láctico. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres medidas independientes. Para cada aislamiento letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Para la condición ensayada con 0,7 % de ácido láctico donde no se observaron colonias viables (Tabla 3), el pH fue de 4,5 acorde con los resultados de Sorrells (1989), que no observó crecimiento de ninguna de las cepas estudiadas de *L. monocytogenes* en un medio con AL cuando el pH es menor a 4,4 - 4,6. a 35 °C.



Gráfica 3. Curvas de inhibición en TSB-YE en función de la concentración de ácido láctico (AL) para L100A1 (*L. monocytogenes*). Las barras de error representan el error estándar de la media de tres medidas independientes. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Tabla 3. Recuperación de células viables en placas de agar Palcam provenientes del cultivo de la microplaca para L100A1.

% AL	1.2	0.7	0.4	0.3	0.2
Crecimiento	-	-	+	+	+

(-) ausencia de crecimiento visible de L100A1 en placas, (+) crecimiento visible de L100A1 en placas.

Los valores definidos como CMI y CMB para L100A1 se visualizan en la Gráfica 3 y en la Tabla 6, respectivamente. La CMI fue de 0.3 % de AL y la CMB de 0.7 %.

III.4.3. Sensibilidad de los aislamientos de *L. monocytogenes* al UV-C en placa.

Tanto L100A1 como L101E3 son sensibles al UV-C y en ambos casos, los valores de % S en función de la dosis de UV-C ajustaron a un modelo exponencial (Anexo II). Los valores calculados de LD50 para cada cepa se presentan en la Tabla 7. Para L100A1 el LD50 fue 3.47 mJ/cm², para L101E3 fue de 5.39 y para ATCC® 19111 fue de 2.10 mJ/cm². La sensibilidad frente al UV-C de las cepas L100A1 y L101E3 no presentaron diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$) (Tabla 4). Si bien, se ha reportado que la resistencia al UV-C es variable entre cepas y que hay una mayor resistencia de cepas de *L. monocytogenes* al UV-C cuando son sometidas a pre-stress (Gayán et al., 2015; McKinney et al., 2009), en las condiciones ensayadas no se observó diferencia entre cepas. Dado que no se observaron diferencias en sensibilidad entre cepas frente al AL y UV-C en placa para los estudios en carne se seleccionó el aislado L100A1.

Tabla 4. Valores de DL50 calculados para cada cepa.

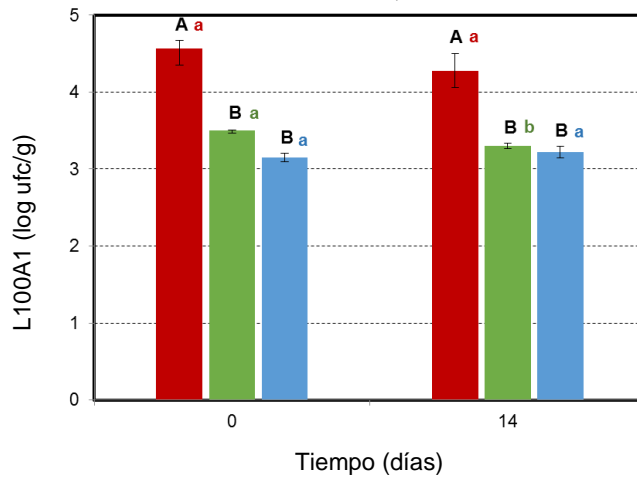
Cepa	DL50 (mJ/cm ²)
ATCC®19111	2.10 ^A
L100A1	3.47 ^A
L101E3	5.39 ^A

^A Letras iguales indican que no hay diferencias significativas según Kruskal-Wallis ($p > 0.05$).

III.4.4. Efecto del AL y UV-C en carne envasada al vacío

III.4.4.1. Estudio del efecto de la aplicación del ácido láctico sobre los recuentos de L100A1 en carne envasada al vacío a tiempo cero y 14 días.

La aplicación de ácido láctico en carne tiene un efecto inmediato sobre los recuentos de *L. monocytogenes* L100A1 para las dos concentraciones de ácido láctico ensayadas a tiempo cero. La mayor disminución en los recuentos de L100A1 se produjo con 5 % de AL (Gráfica 4). La aplicación de ácido láctico al 2.5 % redujo en 1.1 log, y al 5 % la reducción fue de 1.4 log, ambas reducciones fueron significativas ($p < 0.05$) con respecto al control (Gráfica 4). Varios estudios mostraron el efecto bactericida del ácido láctico sobre *L. monocytogenes*. En este sentido, DeGeer et al. (2016) obtuvieron reducciones similares de *L. monocytogenes* en carne fresca tratada con soluciones de 2 y 4 %, 0.85 log ufc/cm² y 1.3 log, respectivamente, mientras que Ariyapitipun et al. (2000) lograron una reducción de 1.56 log ufc/cm² aplicando una solución de ácido láctico al 2 %. Las diferencias en la magnitud de la reducción entre este estudio y Ariyapitipun et al. (2000) puede deberse, entre otros factores, a las diferencias entre las cepas utilizadas y al modo de aplicación de las soluciones de ácido láctico. En este estudio la cepa usada, L100A1, fue aislada de ambiente frigorífico luego de haber sufrido diferentes tipos de estrés que, según Skandamis et al. (2008), pueden afectar la tolerancia en medios ácidos. Por otro lado, en este estudio el ácido láctico fue aplicado por aspersión, mientras que en el trabajo de Ariyapitipun et al. (2000) fue por inmersión, logrando posiblemente obtener una mayor cantidad de ácido sobre la superficie de la carne.



Gráfica 4. Recuentos promedios de *L. monocytogenes* L100A1 a tiempo 0 y a los 14 días en carnes con 0 (■), 2.5 % (■) y 5 % (■) de ácido láctico, Las barras de error representan el error estándar de la media de dos medidas independientes. ^{A,B} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en un mismo tiempo para diferentes tratamientos. ^{a,b} Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) para un mismo tratamiento en diferentes tiempos.

A los 14 días, las muestras envasadas al vacío y conservadas a 4 °C presentaron un descenso no significativo en los recuentos de L100A1 para las muestras sin tratar y significativo ($p < 0.05$) para las muestras tratadas con 2.5 % de ácido láctico (Gráfica 4) con respecto a su valor al tiempo 0. Para las muestras tratadas con 5 % de ácido láctico no hubo cambios significativos al final de los 14 días. En las muestras tratadas con 5 % de ácido láctico, la carne evidenció cambios de color no deseados (Figura 3). Dichos cambios en el color de la carne también fueron reportados por Rodríguez-Melcón et al. (2017), el cual también evidenció cambios de color al tratar carne con 5 % de AL, a razón de 0.06 mL/cm² (misma relación usada en este trabajo).

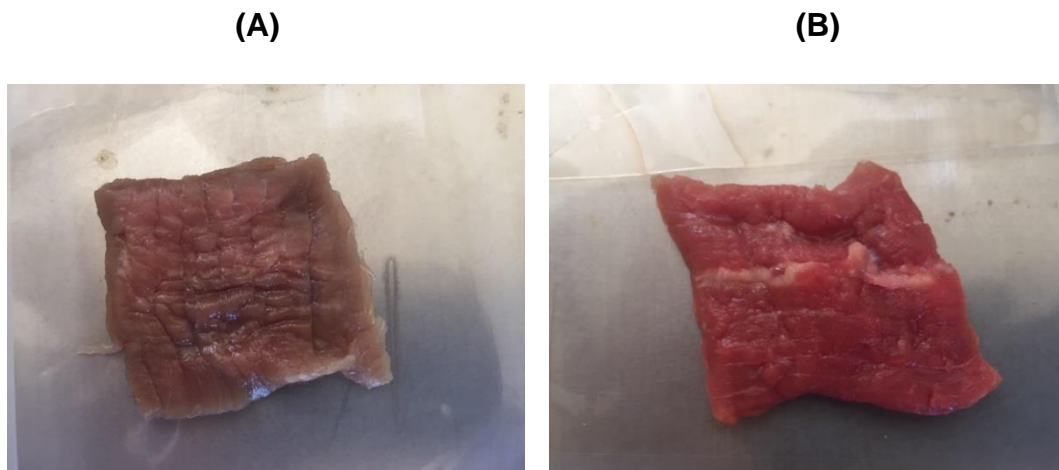
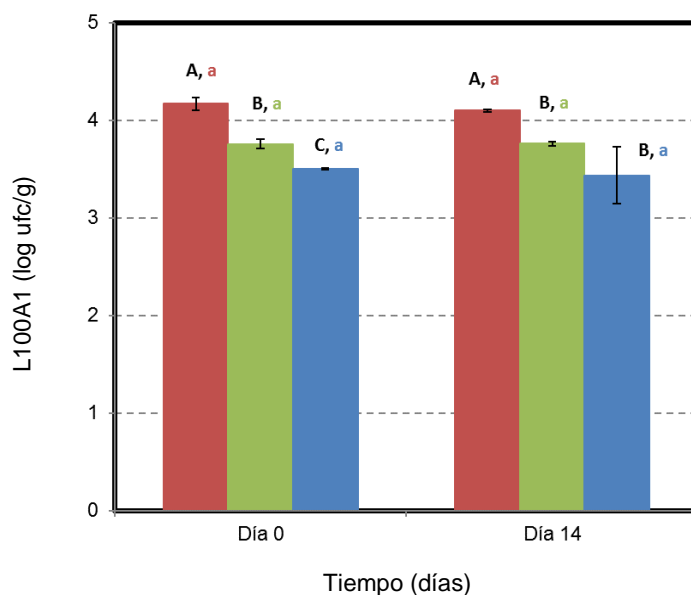


Figura 3. (A) Carne tratada con 5 % de AL. (B) Carne sin tratamiento.

III.4.4.2. Efecto de la aplicación de UV-C en carne sobre L100A1 a tiempo cero y 14 días.

La aplicación de UV-C a través del envase en carne de 47 y 94 mJ/cm² redujo significativamente ($p < 0.05$) los recuentos de L100A1 a tiempo cero. La mayor disminución en los recuentos de L100A1 se produjo con la dosis de UV-C mayor. La aplicación de 47 mJ/cm² de UV-C redujo en 0.3 log/g, y para la de 94 mJ/cm² de UV-C la reducción fue de 0.6 log, ambas reducciones fueron significativas ($p < 0.05$) con respecto al control (Gráfica 5) y se mantuvieron con esta diferencia al final de los 14 días.

A los 14 días, las muestras envasadas al vacío y conservadas a 4 °C presentaron un descenso no significativo en los recuentos de L100A1 para las muestras sin tratar y tratadas con ambas dosis de UV-C (Gráfica 5) con respecto a su valor al tiempo 0.



Gráfica 5. Recuentos promedio de *L. monocytogenes* L100A1 a tiempo 0 y a los 14 días en carnes sometidas a 0 (■), 47 (■) y 94 mJ/cm² de UV-C (■). Las barras de error representan el error estándar de la media de dos medidas independientes. ^{A,B,C} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en un mismo tiempo para diferentes tratamientos. ^a Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) para un mismo tratamiento en diferentes tiempos.

En las muestras de carne tratadas con UV-C no se observaron visualmente cambios en el color, por lo tanto, se plantea en la siguiente etapa aumentar la dosis de UV-C a aplicar en carne para lograr mayores reducciones en los recuentos de *Listeria*.

III. 4. 4. 3. Estudio de la aplicación combinada de UV-C y AL en carne mediante RSM

La reducción logarítmica de *L. monocytogenes* (Y_1) varió de 0 a 1.74 log ufc/g, y el Croma (Y_2) varió de 14.51 a 26.90 (Anexo III). Los resultados del diseño central compuesto de dos factores con cinco puntos centrales mostraron que la reducción logarítmica de *L. monocytogenes* se ajustó a un modelo cuadrático con una significancia de $p < 0.0001$ y un valor de R^2 de 0.9038, lo que explica el 90.38 % de la variabilidad en la respuesta (Tabla 5). La similitud entre los valores R^2 y R^2 ajustado indica que el modelo es adecuado para predecir la respuesta

estudiada. La relación señal-ruido resultante, medida por el término “precisión adecuada” (arriba de 4), indicó que el modelo podría usarse para navegar por el espacio de diseño (Tabla 5). La falta de ajuste del modelo cuadrático no fue significativa ($F = 0.26$, $P = 0.8522$).

Tabla 5 Resumen del análisis de regresión de ambas respuestas donde y_1 = reducción de *Listeria* (log ufc/g) e y_2 = valor croma.

Respuesta	Modelo	Significancia	R^2	R^2 Ajustado	R^2 Predicho	Precisión Adecuada
Y_1	Cuadrático	< 0.0001	0.9038	0.8718	0.8111	16.646
Y_2	Lineal	< 0.0001	0.8002	0.7780	0.7314	14.571

El color se ajustó a un modelo lineal con una significancia de $p < 0.0001$, un valor de R^2 de 0.8002 similar al R^2 ajustado (Tabla 5). Sin embargo, la falta de ajuste de este modelo fue significativa ($F = 6.74$, $P = 0.0026$), sugiriendo que además de AL y UV-C hay otros factores que afectan el color de la carne que no fueron considerados en el diseño experimental.

Los resultados del ANOVA de la aplicación combinada de AL y UV-C en carne indicaron que tanto la aplicación de ácido láctico como de UV-C en los rangos estudiados tuvieron un efecto significativo ($p < 0.0001$) en la reducción de L100A1 en carne con un nivel de confianza del 95 %, mientras que para la medida de color el ácido láctico fue la única variable significativa que afectó negativamente la medida de color: al aumentar el porcentaje de AL, la medida de color (valor croma) disminuye. Los cambios no deseados de croma en carne se debieron principalmente a la disminución en el valor de enrojecimiento (a^*) (Anexo IV), efecto que se ha reportado que produce el ácido láctico en carne vacuna (Rodríguez-Melcón et al., 2017; Salim et al., 2017).

Las ecuaciones generadas para cada respuesta, incluyendo sólo los términos con significancia estadística ($p < 0.05$), fueron los siguientes:

$$\text{Red. } Listeria \text{ (log ufc/g)} = - 0.033819 + 0.35890 * AL + 6.054 \times 10^{-3} * \text{Dosis UV-C} \\ - 0.043525 * AL^2 - 9.17 \times 10^{-6} * \text{Dosis UV}^2$$

$$\text{Croma} = 23.63579 - 1.41044 * \text{AL}$$

Las Figuras 4 (A) y 4 (B) muestran las superficies de la reducción de *Listeria* (log ufc/g) y valor croma en función de la concentración de AL y dosis de UV-C generadas por sus respectivos modelos

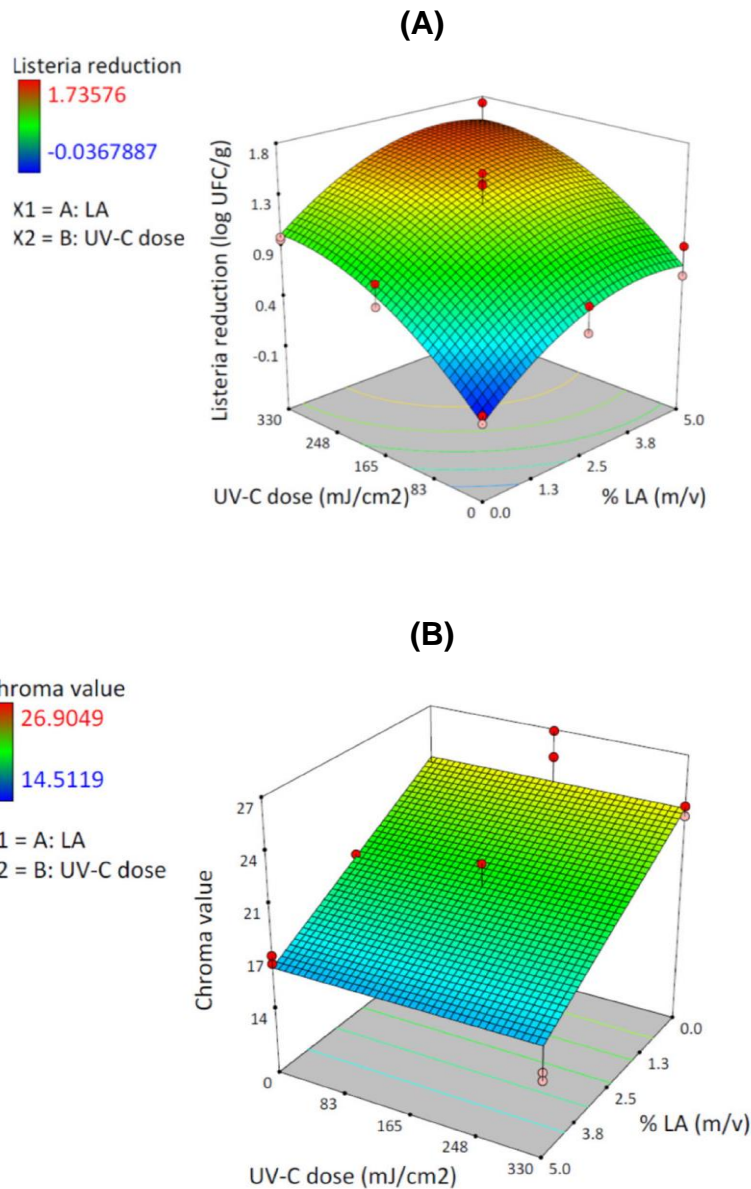


Figura 4. Superficie de respuesta generada del diseño central compuesto donde se visualiza **(A)** efecto de la concentración de AL y dosis de UV-C en la reducción de *Listeria* L100A1 (log ufc/g) **(B)** efecto del comportamiento del color (expresado como Croma) en función de la aplicación de distintas concentraciones de AL y dosis de UV-C.

Tanto el AL como UV-C fueron factores significativos ($p < 0.05$) para la reducción de *Listeria* en carne y tuvieron efectos independientes (sin interacción significativa ($p > 0.05$)), lo que indica que los efectos fueron aditivos. Este efecto aditivo entre el AL y la radiación UV-C también fue observado para la inactivación de *Salmonella* en una matriz alimentaria diferente (Rosario et al., 2021).

Según el modelo obtenido (polinomial de segundo orden) y con las restricciones impuestas para la optimización, la máxima reducción de L100A1 en log ufc/g sin cambios de color significativo respecto al control se obtiene cuando se aplica 2.6 % de AL en combinación con UV-C a razón de 330 mJ/cm². En estas condiciones la reducción es de 1.55 ± 0.41 log de ufc/g. Como esta combinación de valores no fue parte de la matriz de diseño experimental, se realizó la verificación de este punto, obteniéndose una reducción de 1.24 ± 0.18 log de ufc/g en comparación con las muestras sin tratamiento, valor comprendido dentro del intervalo de confianza (95 %) del predicho por el modelo.

Este nivel de reducción fue superior a los niveles de reducción obtenidos con la mayor concentración de AL usada o de UV-C aplicada por separado.

Si bien no hay otros estudios que informan la acción combinada de AL y UV-C sobre *Listeria monocytogenes* en carne fresca, se observaron patrones de inactivación similares en carne fresca tratada por separado con AL o con UVC (Brugnini et al., 2018; DeGeer et al., 2016; Kalchayanand et al., 2020). En este sentido, en un estudio previo de nuestro grupo se obtuvo una reducción de 1.13 log con 2.5 % de AL, DeGeer et al. (2016) utilizando una solución de AL 4 % redujo en 1.3 log a un inóculo de *L. monocytogenes* de 8 log y, Kalchayanand et al. (2020) utilizando una dosis de UV-C de 590 mJ/cm² redujo un inóculo de *L. monocytogenes* de 6 log en 0.89 log.

De acuerdo con el modelo, la combinación de los niveles máximos de AL (5.0 %) y UV-C (330 mJ/cm²) redujo el inóculo de 5.8 log en 1.73 log, quedando una fracción de microorganismos viables en la muestra de carne. Esto se representa en el gráfico de superficie de respuesta 3D (Figura 5), donde la reducción logarítmica de *L. monocytogenes* tuvo una tasa de aumento brusco inicial y luego se estabilizó en una meseta con dosis más altas de UV-C y concentraciones de AL. El hecho de que, en carne a diferencia que en placa, no se logre una inactivación total de *Listeria* puede explicarse por la capacidad de la carne para

amortiguar la solución de AL y también de ocluir a *L. monocytogenes* en las fibras musculares protegiendo de este modo a las bacterias de la radiación UV-C y de la acción del AL (DeGeer et al., 2016; McLeod et al., 2018).

Concentraciones altas de AL de 5 % produjeron cambios de color no deseados en la carne (croma > 20). Con respecto a aumentar la dosis de UV-C, los datos de este estudio sugirieron que un aumento en la dosis de UV-C en carne no logra una mayor reducción en la población de *L. monocytogenes*. Aunque el modelo no permite predecir la reducción de *Listeria* fuera del espacio de diseño, el nivel de reducción de *L. monocytogenes* obtenido en el punto experimental + α aplicando 2.5 % de AL y 368 mJ/cm² (Anexo III) fue similar al nivel de reducción alcanzado con 2.5 % AL y 330 mJ/cm². De acuerdo con esta observación, McLeod et al. (2018) informó que la aplicación de 3 J/cm² no aumentó el nivel de reducción de *Listeria monocytogenes* en pechuga de pollo más allá de la reducción obtenida con 0.3 J/cm².

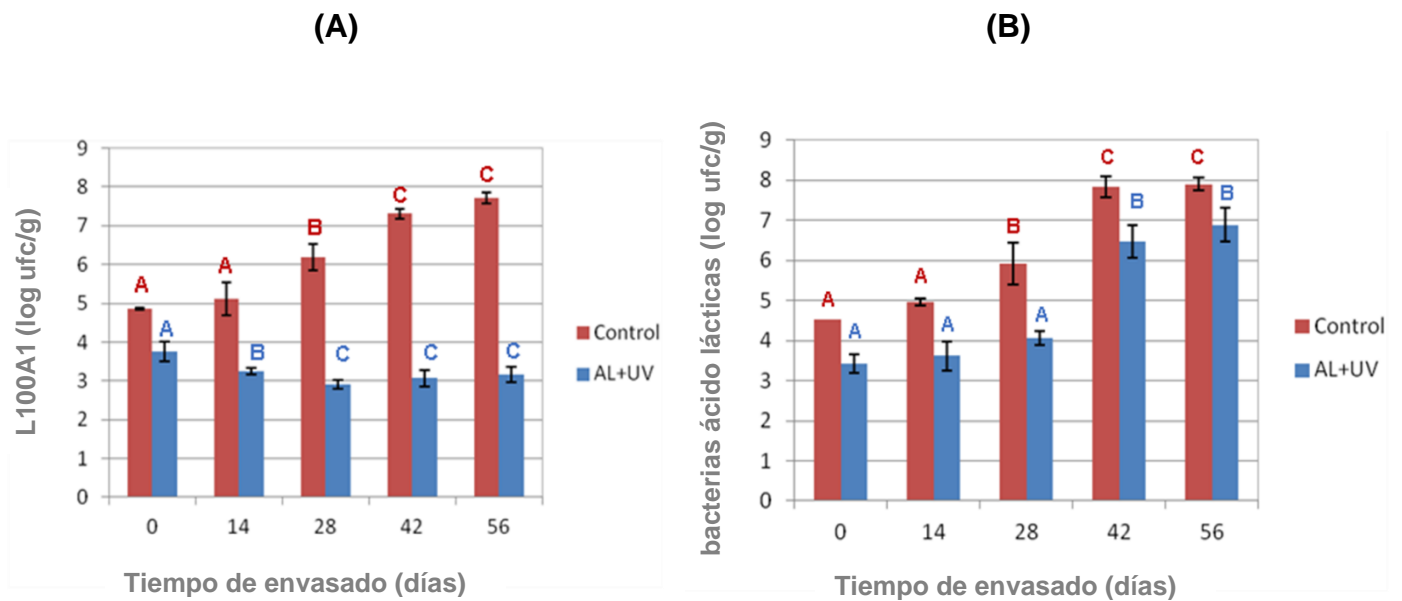
III. 4. 4. 4. Aplicación de las condiciones óptimas de UV-C y AL en carne y su efecto durante 56 días.

III. 4.4.4.1. Recuentos microbiológicos en carne

La aplicación combinada de 2.6 % de AL y UV-C en 330 mJ/cm² redujo en 1.2 y 1.3 log de ufc/g los recuentos iniciales de L100A1 y BAL respectivamente, en comparación con las muestras sin tratamiento. Las muestras de carne tratadas tuvieron recuentos logarítmicos de *L. monocytogenes* y BAL significativamente más bajos ($p < 0.05$) que las muestras control durante los 56 días (Gráficas 6 A y B). Los recuentos de *L. monocytogenes* en la carne tratada con AL/UV-C disminuyeron de 3.6 log ufc/g a 3.0 ($p < 0.05$), mientras que en las muestras control se observó un aumento de 4.86 a 7.38 log ufc/g ($p < 0.05$) (Gráfica 6). Los recuentos de BAL en las muestras tratadas permanecieron constantes hasta los 28 días ($p > 0.05$), luego se observó un aumento a los 42 días alcanzando 6.89 log ufc/g a los 56 días. En las muestras control, los recuentos de BAL

permanecieron sin cambios durante los primeros 14 días, y luego aumentaron con el tiempo hasta 7.85 log ufc/g (Gráfica 6).

En la carne envasada al vacío y conservada a 4 °C se generan condiciones, pH 5.4 o inferior y baja temperatura donde proliferan las bacterias ácido lácticas presentes en la carne, que producen ácidos orgánicos y bacteriocinas (Castellano et al., 2008; Vignolo et al., 2012) inhibiendo el crecimiento de *Listeria* (Chaillou et al., 2005; Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas, 2004; Guerrieri et al., 2009; Holzapfel et al., 1995; Jones, 2004). En este trabajo, la población de bacterias ácido lácticas aumentó, tanto en las muestras tratadas como en las no tratadas con ácido láctico y UV-C. Sin embargo, para las muestras tratadas el crecimiento de BAL fue más lento comparado con las muestras control e incluso alcanzó recuentos menores al final de los 56 días (Gráfico 6 B), probablemente porque una fracción de las células vivas restantes fueron dañadas por el UV-C y presenten una tasa de crecimiento más lenta o sean incapaces de replicarse bajo estrés (Gailunas et al., 2008). El recuento final de BAL en las muestras control alcanzó 8 log ufc/g mientras que en las muestras tratadas con AL/UV-C alcanzó 7 log ufc/g. La carne envasada al vacío presenta olores y sabores no deseados cuando los recuentos de BAL alcanzan 7 log ufc/g, por lo que se sugiere que la reducción en los recuentos de BAL podría mejorar la vida útil del producto.



Gráfica 6. Recuentos de L100A1 (log ufc/g) (A) y bacterias ácido lácticas (log ufc/g) (B) en los trozos de carne durante 56 días en muestras tratadas (AL+UV) y muestras control (sin tratamiento). ^{A,B,C} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el tiempo para las muestras control. ^{A,B,C} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el tiempo para las muestras con tratamiento.

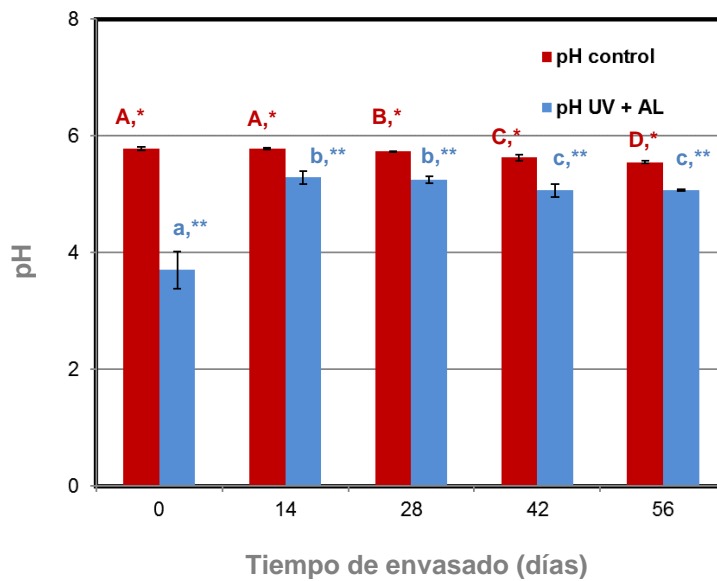
El tratamiento con 2.6 % de AL y 330 mJ/cm² de UV-C al momento del envasado impidió que prosperara la fracción sobreviviente de la población inoculada de *L. monocytogenes*, mostrando una tendencia a disminuir con el tiempo cuando se almacena a 4 °C, mientras que en las muestras no tratadas aumentaron los recuentos de *L. monocytogenes*. La aplicación de AL/UV-C posiblemente causó lesiones celulares en la fracción de sobrevivientes, lo que les impidió superar el estrés adicional impuesto por el oxígeno y la baja temperatura. Si bien no hay estudios del efecto de la aplicación combinada de AL y UV-C sobre *Listeria* en carne, se reporta un comportamiento similar para *L. monocytogenes* a lo largo del tiempo en carne vacuna tratada con AL (Ariyapitipun et al., 2000; Brugnini et al., 2018). Con respecto al comportamiento de *L. monocytogenes* en las muestras control, estudios previos indicaron tanto crecimiento (Dickson, 1989; Tsigarida et al., 2000) como inhibición (Ariyapitipun et al., 2000; Brugnini et al., 2018; Duffy et al., 2000) durante el almacenamiento a 4 °C. Las diferencias en el comportamiento de *L. monocytogenes* pueden deberse a variaciones en las condiciones experimentales como la humedad y el pH de las muestras de carne, la permeabilidad al oxígeno de las bolsas de vacío y las cepas de *L.*

monocytogenes utilizadas. En este estudio, la cepa utilizada se aisló de un ambiente refrigerado después de haber sufrido diferentes tipos de estrés que, según Skandamis et al. (2008), puede afectar la tolerancia al estrés posterior. Los recuentos iniciales de enterobacterias y coliformes totales fueron $< 0.6 \log$ ufc/g, valor dentro de las especificaciones que se manejan para este tipo de productos ($2 \log$ ufc/g). A lo largo del estudio la población de enterobacterias y coliformes no cambió en ninguno de los dos grupos de muestras (control y tratadas). En carne, en ausencia de oxígeno y a un pH inferior a 5.8, si no existe una microbiota competitiva, las enterobacterias psicrótrofas se multiplican y pueden constituir una parte importante de la microbiota total (Hernández-Macedo et al., 2011). En este trabajo el recuento inicial de enterobacterias fue muy bajo, y además la carne fue inoculada con 10^5 ufc/g de *L. monocytogenes*, por tanto, ambos factores podrían explicar que los recuentos de enterobacterias durante los 56 días de estudio no aumentaran.

III. 4.4.4.2. Medias de pH en carne

La aplicación de ácido láctico redujo en promedio el pH de la superficie de la carne en el tiempo inicial de 5.78 a 3.70 (valor menor al pKa) para las muestras tratadas con 2.6 % de ácido láctico y sometidas a 330 mJ/cm^2 de UVC (Gráfica 7). El pH de las muestras tratadas aumentó hasta 5.29 (valor mayor al pKa) a los 14 días, evidenciando que el efecto de la disminución del pH por la adición del AL es inmediato (Gráfica 7). Sin embargo, las muestras que sufrieron descenso de pH inicial mostraron un control del crecimiento de *L. monocytogenes* que perduró en el tiempo (Gráfica 6 A).

Después de los 14 días, el pH superficial de las muestras tratadas y no tratadas disminuyó con el tiempo. El valor de pH de la carne tratada con AL /UV-C siempre fue más bajo ($p < 0.05$) que el control. El pH final para las muestras de control fue 5.55 y para las muestras tratadas fue de 5.07.



Gráfica 7. Evolución en el tiempo de los valores de pH superficial promedio de los trozos de carne envasados al vacío y conservadas a 4 °C. Valores corresponden a la media \pm desviación estándar (n = 3). **A,B,C,D** Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el tiempo para las muestras control. **a,b,c** Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el tiempo para las muestras tratadas con AL/UV-C (2.6 % y 330 mJ/cm² de UV-C).*,** Diferentes * indican diferencias significativas ($p < 0.05$) para cada tiempo entre las muestras control y con tratamiento (AL/UV-C).

III. 4.4.4.3. Medidas de color en carne

Los cambios en L*, a*, b* y el valor croma (C*) en carnes tratadas y no tratadas con AL/UV-C a la semana 0 y a las 8 semanas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. *Parámetros de color instrumentales (L^* , a^* , b^*) medidos y valor croma (C^*) en muestras de carne control y tratadas con AL/UV-C en el momento inicial y a las 8 semanas.*

<i>Tiempo (semanas)</i>		<i>Control</i>	<i>AL+UV-C</i>
0	L^*	47.69 ± 2.94 ^A	46.71 ± 3.51 ^A
	a^*	20.21 ± 2.85 ^A	15.43 ± 1.92 ^B
	b^*	13.07 ± 0.77 ^A	13.36 ± 0.63 ^A
	C^*	24.10 ± 2.48 ^A	20.44 ± 1.56 ^A
8	L^*	46.94 ± 2.71 ^A	40.95 ± 1.81 ^B
	a^*	13.53 ± 1.63 ^A	9.92 ± 0.69 ^B
	b^*	11.08 ± 0.27 ^A	11.62 ± 0.56 ^A
	C^*	17.52 ± 1.14 ^A	15.28 ± 0.66 ^A

L^* , luminosidad; a^* , intensidad de rojo; b^* , intensidad de amarillo; C^* , valor Croma.

^{A, B} Diferentes letras entre filas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre muestras de carne tratadas y no tratadas. Datos registrados como media ± desviación estándar.

En el momento inicial, los valores L^* , b^* y C^* de la carne tratada y no tratada con AL/UV-C no mostraron variaciones significativas entre sí ($p > 0.05$); el valor a^* de la carne control fue significativamente ($p < 0.05$) mayor que el valor de la carne tratada con AL/UV-C (Tabla 6). Esta disminución en a^* se atribuye principalmente a la acción del AL (Rodríguez-Melcón et al., 2017; Salim et al., 2017). En la semana 8, los valores de b^* y C^* en carne tratada y sin tratar no fueron significativamente diferentes ($p > 0.05$). Sin embargo, los valores L^* y a^* de la carne tratada con AL/UV-C fue menor ($p < 0.05$) que el control (Tabla 6). La mayor disminución en el valor de L^* y a^* en la semana 8 en las muestras tratadas puede deberse a que tanto el AL como la radiación UV-C tienen la capacidad de oxidar la mioglobina y provocar la oxidación de lípidos con la consiguiente pérdida de color en la carne (Faustman et al., 2010; Rosario et al., 2021). Tanto para el control como para la carne tratada con AL/UV-C, los valores L^* , a^* , b^* y C^* fueron más bajos ($p < 0.05$) a las 8 semanas en comparación con los valores de la semana 0, excepto el valor L^* de las muestras de control que no mostró cambios significativos ($p > 0.05$).

III. 5. Conclusión

La estrategia planteada de aplicar en forma combinada AL/UV-C en las condiciones ensayadas demostró ser útil para reducir la contaminación por *L. monocytogenes* en carne envasada al vacío y refrigerada sin alterar su color. La máxima reducción logarítmica de *L. monocytogenes* (1.55 ± 0.41 log ufc/g) con un impacto mínimo en el color de la carne se logró con 2.6 % AL y 330 mJ/cm² de UV-C. Considerando que habitualmente la contaminación por *L. monocytogenes* en carne es baja, este nivel de reducción alcanzado es significativo para lograr un producto seguro en lo que a este patógeno se refiere. La estrategia de aplicar de forma combinada AL/UV-C en carne envasada al vacío para la reducción de la contaminación de *L. monocytogenes* es la primera vez que se reporta.

Además, este tratamiento no permitió el aumento en los recuentos de *L. monocytogenes* en carne envasada al vacío durante 8 semanas de almacenamiento a 4 °C, y retrasó el crecimiento de BAL en 2 semanas en comparación con las muestras sin tratar sugiriendo que esta estrategia también podría contribuir a mejorar la vida útil. Aunque estos resultados fueron relevantes, se necesitan realizar más estudios para comprender el impacto de la aplicación combinada de AL/UV-C a lo largo del tiempo de almacenamiento.

IV CAPÍTULO II.

Estudio a escala piloto del efecto sobre la sobrevivencia de L. monocytogenes que tiene la temperatura de fermentación, la temperatura de secado y el uso de reguladores de pH en la elaboración de salames en las condiciones de producción nacional.

IV.1. Introducción

En la fabricación de embutidos fermentados secos el crecimiento de *L. monocytogenes* se controla por la acción combinada de los ingredientes adicionados a la mezcla, la acidificación producida por las bacterias ácido lácticas durante la fermentación y la reducción de la actividad de agua durante el proceso de secado (Drosinos et al., 2006). Se consideran condiciones restrictivas de crecimiento para *L. monocytogenes* un pH \leq 5.0 y aw \leq 0.94 o a una aw \leq 0.92 (ICMSF, 2005).

IV. 1.1 Fermentación

La fermentación y su capacidad de reducir la contaminación por *Listeria* en producto final va a depender del tipo y cantidad de microorganismos que se utilicen, de la presencia de reguladores de acidez y de la temperatura a la cual se realice. La fermentación puede ser lenta si ocurre a menos de 15 °C, intermedia entre 15 y 20 °C y rápida si ocurre a más de 25 °C. Una fermentación rápida permite comercializar el producto antes, pero puede presentar problemas de contaminación microbiológica. Estos problemas pueden ser mayores si se fermenta con la flora asociada a la carne ya que el tiempo hasta alcanzar la concentración de bacterias ácido lácticas necesaria (aproximadamente 10⁶ ufc/g) y reducir el pH a valores restrictivos genera una ventana de oportunidad para el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

IV.1.1.1. Lactato de sodio

El uso lactato de sodio como regulador de pH para la elaboración de salames es usual (Degenhardt & Anna, 2007; Ordóñez et al., 1999; Pellicer et al., 2011). Se ha reportado que el lactato de sodio retarda el crecimiento de varios microorganismos, dentro de los que se incluyen a *L. monocytogenes* (Houtsma et al., 1993; Shelef, 1994; Weaver & Shelef, 1993), y bacterias ácido lácticas (Deumier & Collignan, 2003; Lin & Lin, 2002; Stekelenburg & Kant-Muermans, 2001; Wang, 2000). Este retardo en el crecimiento bacteriano es debido a la

reducción del pH intracelular que produce la porción no disociada del AL del lactato de sodio al penetrar en las células (Shelef, 1994). Varias marcas comerciales de salames producidos en Uruguay reportan contener lactato en su formulación. En lo que respecta a la cantidad a agregar a la mezcla, en la legislación nacional no se establece un límite máximo, siendo 2 % la cantidad que habitualmente se usa en estos productos según lo reporta (Degenhardt & Anna, 2007).

liV.1.1.2. Cultivos iniciadores

Los cultivos iniciadores o starters son microorganismos seleccionados que influyen de manera beneficiosa sobre la fermentación o maduración. Permiten acelerar la producción agregando calidad e inocuidad. Están compuestos en general por bacterias ácido lácticas homofermentativas que convierten los azúcares principalmente en ácido láctico y por bacterias con actividad nitrato reductasa como el *S.xylosus*. Con el tiempo, se han desarrollado cultivos iniciadores que contienen BAL productoras de bacteriocinas con actividad listericida (Castellano et al., 2008; Martín et al., 2022). Las bacteriocinas son péptidos bacterianos constituidos principalmente por aminoácidos cargados positivamente que interactúan con las membranas celulares bacterianas formando poros e inhibiendo su crecimiento (Heng et al., 2007). Las especies de BAL más utilizadas para controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* en embutidos fermentados son *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus curvatus* (Drosinos et al., 2006). De acuerdo a la nueva clasificación del género *Lactobacillus* publicada por Zheng et al. (2020) *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus curvatus* se denominan *Latilactobacillus sakei* y *Latilactobacillus curvatus* respectivamente. Por otro lado, también es habitual el uso de *Staphylococcus carnosus* y *xylosus* para impartir las características sensoriales deseadas al producto final (Casaburi et al., 2007; Lucke, 1998). En nuestro país al momento de realizar esta tesis se comercializaban principalmente 3 cultivos indicadores recomendados para uso en embutidos cárnicos: uno compuesto de una combinación de *L. sakei*, *S. carnosus* y *S.*

xylosum, otro compuesto de *S. xylosum* y *P. pentosaceus* y un tercero que contiene *S. xylosum*, *L. curvatus* y *P. acidilactici*. La elección del cultivo iniciador adecuado, además de producir las características sensoriales deseadas, debe garantizar la eficacia del proceso en el control de *Listeria monocytogenes*.

IV.1.1.3. Temperatura de fermentación

La temperatura de fermentación tiene una incidencia directa en la velocidad de crecimiento de las BAL, en la velocidad de producción de AL y por consiguiente en la velocidad de descenso de pH. Algunos autores reportan que a mayores temperaturas de fermentación mayor probabilidad de crecimiento de *Listeria* (Brusa et al., 2021). En Uruguay las temperaturas de fermentación oscilan entre 24 y 29 °C y la humedad relativa del aire entre 80 y 95 % (Repiso, 2018). Debido a que las temperaturas en esta etapa superan los 60°F (15.5 °C), se establece una máxima cantidad de horas que puede estar un proceso por encima de esta temperatura antes de alcanzar un pH < 5.3 para no permitir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 ni *S. aureus* (American Meat Institute Foundation, 1997). Por lo que reducir el pH rápidamente durante la fermentación no solamente es importante para el control de *L. monocytogenes*, sino también para otros patógenos.

IV.1.2. Secado

En la etapa de secado se produce la disminución de aw. Para no permitir el crecimiento de *Listeria* la aw en el producto final debe ser menor a 0.92. El tiempo para alcanzar este valor final dependerá, entre otros factores, de la temperatura y velocidad de aire en la cámara de secado y del calibre del salame, ya que para alcanzar el mismo valor de aw, un aumento en el tamaño del calibre requiere períodos más prolongados de secado (De Souza et al., 2018). Tiempos prolongados de secado producen una mayor reducción de *L. monocytogenes* en salame (Hussein et al., 2022). En Uruguay el secado se realiza entre 14 y 20 °C (comunicación oral) y según la normativa (Decreto 588/008, 2008) a la salida de

fábrica el producto debe cumplir con el criterio de ausencia de *Listeria* en 25 gramos durante su vida útil.

IV.1.3. Modelos

Los modelos predictivos describen cuantitativamente la respuesta de los microorganismos en función de las condiciones ambientales que los afectan y permiten simular el comportamiento del patógeno en condiciones no ensayadas experimentalmente. Varios autores han desarrollado modelos del tipo crecimiento/no crecimiento para productos fermentados que predicen si *Listeria monocytogenes* podrá crecer según pH, aw y temperatura (Mataragas et al., 2015; Mataragas et al., 2015b; Polese et al., 2011). Hay modelos más complejos que incorporan el factor tiempo como plantea Polese et al. (2017) que recopila datos de la literatura y modela la probabilidad de crecimiento en función de pH, aw, ácido láctico y presencia de cultivos iniciadores. Estos modelos no incluyen la variabilidad existente entre los diferentes cultivos iniciadores y generalmente están desarrollados para fermentaciones más largas que se realizan a temperaturas inferiores que no son las que se utilizan habitualmente en nuestro país. A su vez, estos modelos están elaborados para poder verificar que se alcanzaron los criterios establecidos en el Reglamento (UE) 2073. Cuando aw y pH están en continuo cambio los estudios de desafío, inoculando con el microorganismo de interés, brindan información más confiable. Sin embargo, los estudios de desafío deben hacerse para cada condición de producción y su aplicabilidad es restringida a la misma (Adams & Mitchell, 2002; Mataragas et al., 2015).

También existen modelos terciarios como ComBase (Baranyi and Tamplin 2004) y PMP (<https://pmp.errc.ars.usda.gov/PMPOnline.aspx>). Estos modelos terciarios son los más reconocidos para modelar el crecimiento y/o inactivación de patógenos en distintas condiciones y estimar los parámetros de crecimiento: tasa máxima de crecimiento y fase de latencia. Estos modelos utilizan la ecuación de *Baranyi & Roberts* (Anexo V) (Baranyi & Roberts, 1994) para modelar datos experimentales en caldo y en algunas matrices alimentarias. La ecuación de *Baranyi & Roberts* también es usada para modelar la inactivación

no térmica de microorganismos (Den Besten et al., 2006; Dogan et al., 2022). El software DMFit 3.5 para Excel® disponible gratuitamente (https://browser.combase.cc/DMFit_Excel.aspx) permite ajustar curvas experimentales de recuentos microbianos utilizando la ecuación de *Baranyi & Roberts*.

Otra metodología que permite vincular cuantitativamente varias variables independientes y su interacción sobre una respuesta es la metodología de superficie de respuesta (RSM). Esta metodología fue utilizada para predecir el comportamiento de *L. monocytogenes* en función de variables ambientales en cultivo (Buchanan & Phillips, 1990) y en productos cárnicos (Brugnini et al., 2021; Dussault et al., 2016; Seman et al., 2002).

IV.1.4. Hipótesis y estrategia de trabajo

En nuestro país, no hay estudios disponibles que muestren la evolución de *L. monocytogenes* durante el proceso de elaboración de salames en las condiciones comúnmente utilizadas. Tampoco hay, a la fecha, parámetros de producto establecidos en la normativa, como valores de pH y a_w , que indiquen cuándo es seguro comercializar el producto cumpliendo el criterio de ausencia en 25 gramos. En este sentido, el Reglamento (CE) 2073/2005 establece que las condiciones inhibitorias para el crecimiento de *L. monocytogenes* en un alimento son: $pH \leq 4.4$ o $a_w \leq 0.92$ o $pH \leq 5.0$ y $a_w \leq 0.94$. Estos criterios se manejan a nivel nacional, pero sin conocer la evolución del patógeno durante el proceso y sin la certeza de que alcanzar estos parámetros indique ausencia de *L. monocytogenes* en 25.

En este trabajo se propone evaluar el agregado de lactato de sodio y tres cultivos iniciadores diferentes en la reducción de *Listeria* durante la fermentación para luego, utilizando la RSM evaluar su comportamiento durante la elaboración de los salames en función de los parámetros de proceso que condicionan la fermentación y el secado. Para ello, se tendrán que producir salames a escala piloto inoculados con *Listeria*. El uso de una instalación industrial no permite trabajar con *L. monocytogenes*, por lo que se plantea utilizar una cepa de *L. innocua* (ATCC® 33090) como microorganismo sustituto (Friedly et al., 2008; Tirloni et al., 2019). A partir de datos experimentales de recuentos de *Listeria* se

estimarán utilizando el software DMFit la tasa máxima de inactivación, y la cantidad del microorganismo al final del proceso en las distintas condiciones. Una vez obtenidos estos parámetros, se puede calcular el nivel de reducción de *Listeria* total del proceso. Un nivel de reducción de por lo menos 3 log ufc/g de *Listeria* en los salames producidos en las condiciones de fabricación en Uruguay se estima que sería adecuado para garantizar ausencia de *Listeria* en el producto final, considerando que 3 log ufc/g es la concentración máxima encontrada en carne cruda (Mataragas et al., 2006; Polese et al., 2017; Pouillot & Lubran, 2011; Ross et al., 2009)

De este modo, se podrá obtener un RSM que vincule parámetros operacionales (temperatura de fermentación, temperatura de secado y calibre) con el comportamiento de *L. monocytogenes* durante la producción de salames simulando las condiciones de fabricación nacional que hasta el momento no se ha reportado. A su vez, se pretende determinar las condiciones de proceso que garanticen una reducción de por lo menos 3 log ufc/g de *Listeria* en salames.

IV.2. Objetivo general

Estudiar el efecto de la temperatura de fermentación, temperatura de secado y el uso de reguladores de pH sobre la sobrevivencia de *Listeria* durante la producción de salame en la industria nacional y determinar las condiciones de proceso que garanticen una reducción de por lo menos 3 log ufc/g de *Listeria* en salame.

IV.2.1. Objetivos específicos

- Seleccionar el cultivo iniciador con mayor potencial de reducción de *Listeria* en la fermentación.
- Evaluar el efecto del lactato de sodio sobre la evolución de *Listeria* y pH durante la fermentación.
- Determinar el efecto de la temperatura de fermentación, la temperatura de secado y el calibre sobre la evolución de *Listeria* durante el proceso (fermentación y secado).
- Obtener un modelo matemático que vincule las variables de proceso con el nivel de reducción de *Listeria* logrado en la elaboración de salames.

IV.3. Materiales y métodos

IV.3.1. Materiales

Para la elaboración de los salames se utilizó carne y grasa suina (pulpa de paleta sin hueso y back fat respectivamente) congeladas y envasadas al vacío que se adquirieron en La Bordona (Montevideo, Uruguay). Los demás ingredientes utilizados en la elaboración fueron: nitrito de sodio (INS 250), sal (cloruro de sodio), ácido ascórbico (INS 300), polifosfato (INS 452i), lactato de sodio (INS 325) y especias (pimienta en grano, nuez moscada molida, coriandro y ajo deshidratado) y fueron adquiridas en La Molienda (Montevideo, Uruguay). Para el embutido de los salames se adquirió tripa artificial en Prinzi (Montevideo, Uruguay) de 3 tipos según el diámetro o calibre a embutir (fibrosa 11/2 para 5.1 cm, fibrosa 5N para 9.15 cm y fibrosa D9 para 13.2 cm). Los 3 cultivos iniciadores ensayados fueron adquiridos en el mercado local; el cultivo iniciador 1 (CI1) contiene *L. sakei*, *S. carnosus* y *S. xylosus*; el cultivo iniciador 2 (CI2) contiene *S. xylosus* y *P. pentosaceus*, y el cultivo iniciador 3 (CI3) contiene *S. xylosus*, *L. curvatus* y *P. acidilactici*.

IV.3.2. Preparación del inóculo de *L. innocua*

El cultivo de *L. innocua* ATCC® 33090 se cultivó a 35 °C en 10 mL de caldo TSB (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) suplementado con extracto de levadura al 0.6 % (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) durante 8 horas. Luego, cada tubo se sub-cultivó en 90 mL de TSB durante 12 - 16 horas. Las células se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron con solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 7.4) para obtener una concentración de 8 - 9 log ufc/mL. El inóculo así obtenido se conservó refrigerado y fue usado en el día.

IV.3.3. Selección del cultivo iniciador

Se colocaron 500 g de carne picada de cerdo con aproximadamente 25 % de grasa en bolsas Cryovac T7335B, se adicionaron los cultivos iniciadores CI1, CI2 y CI3 y los azúcares de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se inocularon con 8 log ufc/g de *Listeria innocua* ATCC® 33090 y se homogeneizaron manualmente durante 1 minuto. Las muestras se sellaron e incubaron a 25 °C durante 48 horas. Se prepararon muestras por duplicado para cada tiempo de estudio, 0, 24 y 48 horas. Para la determinación de *Listeria* se tomaron 10 gramos de la masa, se colocaron en bolsas estériles de stomacher se homogeneizó con 90 ml de buffer butterfield a 230 rpm durante 2 minutos. Las diluciones apropiadas se sembraron en agar Palcam e incubaron a 37 °C durante y se contaron a las 48 horas. Los recuentos se transformaron en logaritmos y se compararon mediante un ANOVA seguido por LSD Fisher para seleccionar el cultivo iniciador que produjera la mayor reducción de *L. innocua*. Para la determinación de pH, se preparó otro set de muestras. El pH se midió en 6 puntos distintos de la masa a tiempos 0, 24 y 48 horas. Los valores se promediaron y se analizaron mediante ANOVA seguido por LSD de Fisher.

IV.3.4. Elaboración de los salames inoculados con Listeria innocua ATCC® 33090

Los salames se prepararon en batch de 25 Kg en la planta piloto de Latitud. Se trabajó con una proporción de carne y grasa 75:25, que se picó en *cutter* (LASKA KR 60-2 MV) entre 15-17 vueltas con una velocidad de cuchilla y de plato en 1 para obtener un picado fino. Luego, se transfirió la mezcla de carne y grasa picada a la mezcladora (LASKA T WU5 Vac/P) y se agregó nitrito de sodio 150 ppm; cloruro de sodio 2.6 %; ácido ascórbico 0.1 %; polifosfato 0.40 %; pimienta en grano 0.03 %; nuez moscada molida 0.10 %; coriandro 0.30 %; ajo deshidratado 0.10 %, dextrosa 1 %, el cultivo iniciador y lactato de sodio de acuerdo al diseño. Esta mezcla fue homogeneizada durante 1 minuto (30 segundos en sentido horario y 30 segundos antihorario). Transcurrido dicho tiempo, se inoculó la mezcla con 10^7 ufc/g de *Listeria innocua* ATCC® 33090, nivel suficiente para poder cuantificar una reducción de al menos 3 log ufc/g y se

mezcló por 1 minuto adicional. Luego de mezclado se embutieron los salames con una embudidora HANDTMANN VF 12 – 100. Para la fermentación se utilizó la cámara del módulo 8 del LATU ALFA LAVAL LR-6 (humedad relativa de 90 ± 5 %) y para el secado se utilizó la cámara del módulo 3 del LATU ALFA LAVAL kkt 21021 (humedad relativa a 78 ± 5 %).

IV.3.5. Estudio del efecto del agregado de lactato de sodio durante la fermentación

Se elaboraron salames con 2 % de lactato de sodio y sin lactato de sodio de calibre 9.15 cm inoculados con *Listeria innocua* ATCC® 33090 de acuerdo al proceso descrito en IV.3.4. Los salames se incubaron durante 48 horas en la cámara de fermentación (humedad relativa 90 %) a 24, 27 y 30 °C. Se realizaron los recuentos de *L. innocua* a tiempo 0 y 48 horas. Las medidas de pH se realizaron a tiempo 0, 24 y 48 horas. Para cada caso se calculó: 1) la reducción en los recuentos de *Listeria innocua* a las 48 horas de fermentación (Red.List.48h) expresada en log ufc/g de salame; 2) la variación de pH total al final de la fermentación ($\Delta\text{pH}_{0-48\text{h}}$) definido como la diferencia entre el pH inicial y el pH a las 48h); 3) la variación de pH a las 24 horas de la fermentación ($\Delta\text{pH}_{0-24\text{h}}$) definido como la diferencia entre el pH inicial y el pH a las 24 h y 4) la variación de pH entre las 24 y 48 horas ($\Delta\text{pH}_{24-48\text{h}}$) definido como la diferencia entre el pH a las 24 horas y el pH a las 48h.

IV.3.6. Diseño experimental para evaluar condiciones de producción

Se realizó un diseño Box-Behnken utilizando el programa Design Expert 13.0 donde las variables independientes fueron: temperatura de fermentación (24, 27 y 30 °C), diámetro del producto (5.1, 9.15 y 13.2 cm) y temperatura de secado (14, 17 y 20 °C). En la Tabla 7 se muestra la matriz experimental con las corridas experimentales definidas por el diseño.

Para cada corrida experimental se determinaron los recuentos de *L. innocua*, el pH y el peso de los salames a los 0, 1, 2, 7, 14, 21 y 28 días. La actividad de agua se midió a los 0, 2, 7, 14, 21 y 28 días.

Los resultados de los recuentos para cada tiempo de ensayo se promediaron, se transformaron en logaritmos, y se modeló el comportamiento de *Listeria* según la ecuación de Baranyi & Roberts (Baranyi & Roberts, 1994) utilizando el software DMFit versión 3.5 Excel® disponible en el portal libre Combase (https://browser.combase.cc/DMFit_Excel.aspx). De este modo se obtuvo el parámetro μ (tasa de inactivación de *L. innocua*) para cada condición de ensayo expresado en log ufc/g/día, el valor inicial de *L. innocua* (Y_0) y el valor final alcanzado (Y_{END}) expresados en log ufc/g. Con estos valores se calculó para cada condición la variación en los recuentos de *Listeria innocua* entre el tiempo inicial y el tiempo final del proceso ($Y_0 - Y_{END}$) en log ufc/g. Además, se calculó la diferencia entre los recuentos de *Listeria* a la salida de la fermentación y al final del secado ($Y_{48h} - Y_{END}$) expresada en log ufc/g. Valores de ($Y_{48h} - Y_{END}$) menores que 0.5 indicaron reducciones en los recuentos de *Listeria* y valores de ($Y_{48h} - Y_{END}$) mayores que - 0.5 indicaron aumentos en los recuentos de *Listeria*. Cuando ésta diferencia en los recuentos de *Listeria* estuvo entre - 0.5 y 0.5 se consideró que *Listeria* permaneció constante durante ese período (Novelli et al., 2017).

Las respuestas estudiadas usando el diseño Box-Behnken fueron: 1) μ (log ufc/g/día); 2) Y_{END} y 3) $Y_0 - Y_{END}$ (log ufc/g).

Tabla 7. Matriz del diseño de Box-Behnken con las corridas experimentales.

<i>T</i> _{ferm} (°C)	<i>Calibre</i> (cm)	<i>T</i> _{secado} (°C)
27	9.15	17
24	5.1	17
27	5.1	14
30	5.1	17
24	9.15	14
30	13.2	17
30	9.15	20
27	5.1	20
27	13.2	14
27	9.15	17
27	9.15	17
30	9.15	14
24	9.15	20
27	13.2	20
27	9.15	17
24	13.2	17

*T*_{ferm}: Temperatura en la cámara de fermentación, *T*_{sec}: Temperatura en la cámara de secado

IV.3.7. Recuentos de L. innocua en salames

Se transfirió asépticamente 10 gramos de salame a una bolsa con filtro estéril, se homogeneizó con 90 mL de buffer Butterfield en Stomacher Seward 400C LabBlenders, a 230 rpm durante 2 minutos. Para cada muestra de salame se realizaron tres diluciones en buffer Butterfield. Se plaquearon por duplicado 100 µL de las diluciones correspondientes del homogeneizado en placas de agar Palcam con agregado del suplemento selectivo para Palcam (SR0150 Thermo),

se incubaron a 37 °C y luego a las 48 horas se realizaron los recuentos de *L. innocua* y se expresaron como log ufc/g de salame.

IV.3.8. Determinación de la actividad de agua y el pH en salames

El pH se midió con un pHmetro Hanna® modelo 9025c con electrodo de pincho calando en 3 puntos diferentes hasta una profundidad similar a la mitad del grosor del salame. Las medidas de actividad de agua se realizaron según la norma ISO 21807: 2004 con un equipo portátil HP23-AW-A-set-40 marca Rotronic. Tanto para las medidas de pH como para las de actividad de agua en los salames de calibre chico (5.1 cm) se utilizaron dos piezas por tiempo de medida, mientras que en los salames de calibre intermedio y grande (9.15 y 13.5 cm) se dividió imaginariamente la pieza a la mitad transversalmente de tal forma que cada lado se trató como una muestra independiente.

IV.4. Resultados y Discusión

IV.4.1. Selección del cultivo iniciador

Los tres cultivos iniciadores redujeron significativamente ($p < 0.05$) el pH de la mezcla alcanzando valores inferiores a 5 a las 48 horas (4.79 el cultivo CI1, 4.70 el CI2 y 4.76 el CI3) (Tabla 8), indicando que el proceso de fermentación fue adecuado (Ordóñez et al., 1999). Sin embargo, la capacidad de reducir la población de *Listeria* fue diferente para cada cultivo iniciador (Tabla 8)

Tabla 8. Valores de pH medidos a tiempo cero, 24 y 48 horas en muestras de carne picada usando distintos cultivos iniciadores a 25°C.

Cultivo iniciador	pH inicial	pH a las 24 h	pH a las 48 h
CI1	5.53 ± 0.02 ^A	5.07 ± 0.01 ^B	4.79 ± 0.01 ^C
CI2	5.43 ± 0.05 ^A	4.97 ± 0.03 ^B	4.70 ± 0.04 ^C
CI3	5.59 ± 0.01 ^A	5.12 ± 0.03 ^B	4.76 ± 0.02 ^C

^{A, B, C} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) para un mismo cultivo iniciador en diferentes tiempos de medida. CI1 contiene *L. sakei*, *S. carnosus* y *S. xylosum*; CI2 contiene *S. xylosum* y *P. pentosaceus*; CI3 contiene *S. xylosum*, *L. curvatus* y *P. acidilactici*.

Los CI1 y CI3 redujeron el contenido de *L. innocua* en la carne en forma significativa ($p < 0.05$), mientras que CI2 tuvo una capacidad de reducción despreciable en las condiciones del ensayo (Tabla 9). El nivel de reducción para CI1 y CI3 obtenido a las 48 horas fue significativamente mayor que el obtenido a las 24 horas (Tabla 9). CI1 produjo una reducción significativa de *Listeria* de 1.88 ± 0.34 log ufc/g, y el CI3 de 3.72 ± 0.05 log ufc/g a las 48 horas.

Tabla 9. Reducción de *L. innocua* ATCC® 33090 obtenida en muestras de carne picada usando distintos cultivos iniciadores a 25°C.

Cultivo iniciador	Red. <i>L. innocua</i> a las 24 h (log ufc/g)	Red. <i>L. innocua</i> a las 48 h (log ufc/g)
CI1	0.98 ± 0.05 ^{A, a}	1.88 ± 0.34 ^{B, a}
CI2	0.51 ± 0.02 ^{A, b}	0.56 ± 0.03 ^{A, b}
CI3	2.01 ± 0.23 ^{A, c}	3.72 ± 0.05 ^{B, c}

CI1, contiene *L. sakei*, *S. carnosus* y *S. xylosus*; CI2, contiene *S. xylosus* y *P. pentosaceus*; CI3, contiene *S. xylosus*, *L. curvatus* y *P. acidilactici*.; Inóculo inicial de *L. innocua* 1x10⁸ ufc/g; ^{A, B} Diferentes letras indican diferencias significativas (p < 0.05) para un mismo cultivo iniciador en diferentes tiempos de medida; ^{a, b, c} Diferentes letras indican diferencias significativas (p < 0.05) entre los distintos cultivos iniciadores para el mismo tiempo de medida.

CI1 y CI3 contienen especies de BAL con potencial producción de bacteriocinas como *L. sakei*, *L. curvatus* y *P. acidilactici* (Castellano et al., 2008; Martín et al., 2022); la mayor reducción de *L. innocua* producida por CI3 puede deberse a la acción bactericida conjunta de *Pediococcus acidilactici* y *Lactobacillus curvatus*. En lo que a esto respecta, Nielsen et al. (1990) reportaron que *Pediococcus acidilactici* produce una bacteriocina con efecto inhibitorio y bactericida frente a *L. monocytogenes* asociada a carne fresca y Casaburi et al. (2016) reportaron que la cepa *Lactobacillus curvatus* 54M16 produce una bacteriocina activa contra *L. monocytogenes* en medios de cultivo, sugiriendo que su uso como cultivo iniciador podría contribuir a mejorar la inocuidad de los embutidos fermentados. Posteriormente, Giello et al. (2018) confirmaron que la cepa *Lactobacillus curvatus* 54M16 fue capaz de inhibir *L. monocytogenes* en salchichas fermentadas durante el transcurso de la fermentación.

Por otro lado, CI2 redujo el pH de forma similar que CI3, pero no controló *Listeria*. CI2 contiene *P. pentosaceus*, que a pesar de ser una especie potencialmente productora de bacteriocina (Olaoye et al., 2011) en este trabajo no se observó un efecto listericida importante. Esto puede explicarse por la dependencia que tiene la producción de bacteriocinas con la cepa de *P. pentosaceus* utilizada y la matriz alimentaria (Cosansu et al., 2010; de Souza Barbosa et al., 2015).

Estos resultados muestran que un valor de pH menor o igual a 5 al final de la fermentación, no es un indicador suficiente de proceso para garantizar la reducción de *Listeria* en el producto y evidencian la importancia de testear los cultivos iniciadores en las condiciones de producción. Para continuar el estudio de esta tesis se seleccionó el CI3.

IV.4.2. Efecto de la adición de lactato de sodio sobre la reducción de Listeria y el pH durante la fermentación

La reducción de *L. innocua* a las 48 horas del inicio de la fermentación varió entre 1.68 y 3.23 en presencia de lactato de sodio y entre 4.29 y 4.45 log ufc/g en ausencia de lactato de sodio, en el rango de temperatura de fermentación ensayado (24 a 30 °C), para salames de calibre 9.15 cm y utilizando el cultivo iniciador 3 (Tabla 10).

Tabla 10. Reducción de *Listeria* a las 48 horas de fermentación para salmes de calibre 9.15 cm para diferentes temperaturas de fermentación y en presencia/ausencia de lactato de sodio.

<i>T</i> _{ferm} (°C)	Lactato de sodio (% m/m)	Red.Lis _{48h} (log ufc/g) ¹
30	0	4.45±0.10
	2	3.23±0.04
27	0	4.29±0.07
	2	1.68±0.07
24	0	4.45±0.19
	2	2.01±0.07

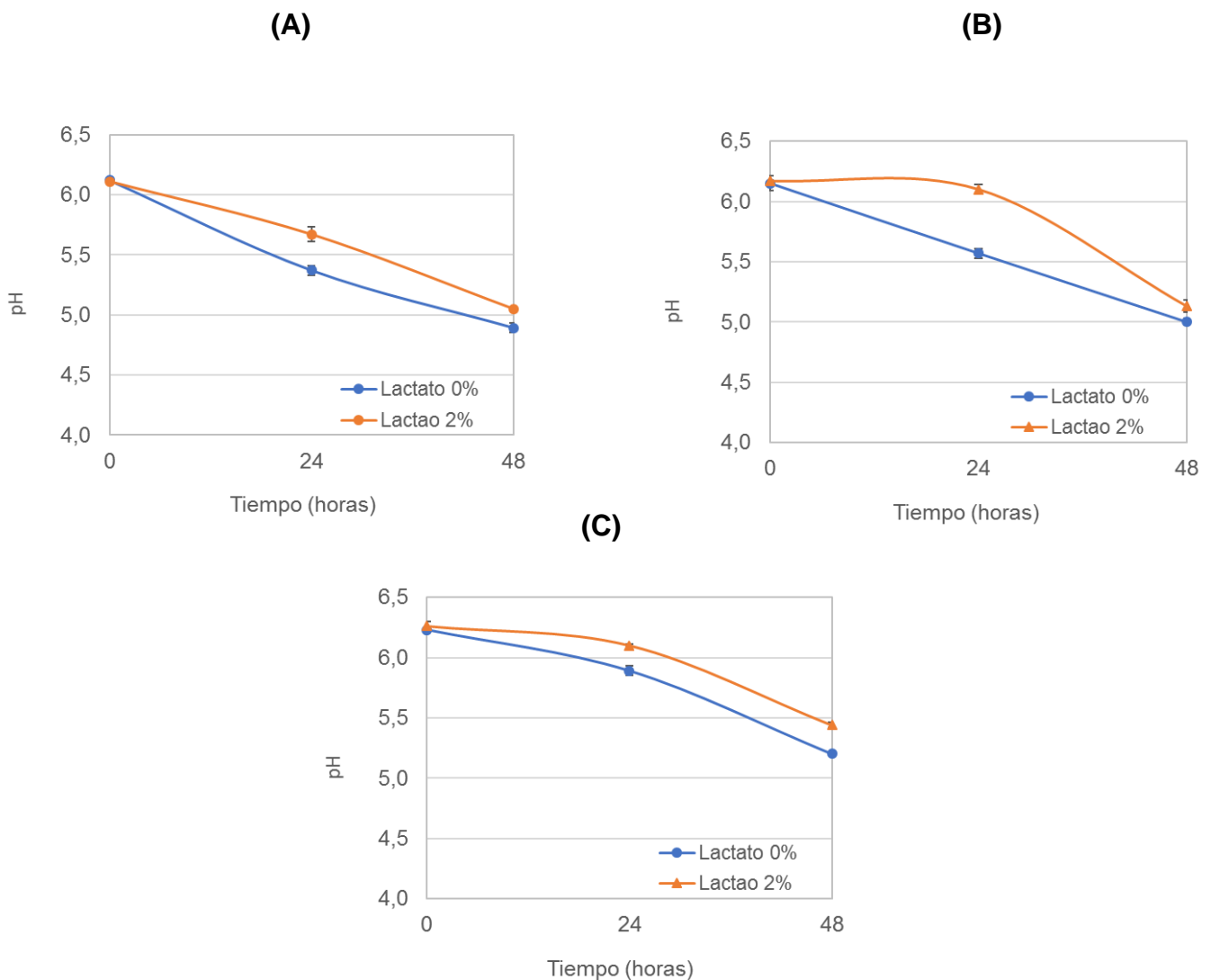
*T*_{ferm}, temperatura de la cámara de fermentación en °C; ¹ Red.Lis_{48hs}, reducción de *Listeria innocua* a las 48 horas de fermentación; Valores promedio ± desviación estándar de duplicados.

Independientemente de la temperatura, para todas las condiciones ensayadas con 2 % de lactato de sodio la reducción en los recuentos de *L. innocua* a las 48 horas fue siempre significativamente menor ($p < 0.05$) que para las condiciones sin lactato de sodio. Con 2 % de lactato de sodio se obtuvo un valor de reducción promedio de *L. innocua* a las 48 horas de fermentación de 2.31 ± 0.81 log ufc/g, mientras que en ausencia de lactato esta reducción fue de 4.39 ± 0.09 log ufc/g. Además, la reducción de *Listeria* en los salames adicionados con 2 % de lactato de sodio aumentó al aumentar la temperatura de fermentación, y se alcanzó una reducción de *L. innocua* mayor a 3 log ufc/g únicamente a 30 °C (Tabla 10).

En cuanto al pH, el valor alcanzado a las 48 horas, para cada temperatura ensayada siempre fue menor en los salames sin lactato (Gráfica 9). Para su estudio, la caída de pH se asimiló a un comportamiento en dos tramos: un primer tramo de descenso de pH entre el tiempo cero y las 24hs ($\Delta\text{pH}_{0-24\text{h}}$) y un segundo tramo entre las 24 y las 48 horas de fermentación ($\Delta\text{pH}_{24-48\text{h}}$). La presencia de lactato retrasó el descenso de pH, resultando en menores valores de $\Delta\text{pH}_{0-24\text{h}}$. Las condiciones de 24 y 27 °C con lactato son las que presentaron el descenso inicial de pH más lento correspondiente a valores de ($\Delta\text{pH}_{0-24\text{h}}$) de 0.07 y 0.16 respectivamente (Gráfica 8). Deumier & Collignan (2003) reportaron también que la presencia de 1.8 % de lactato de sodio produjo un descenso en la acidificación de 0.70 a 0.15 unidades de pH por día en salames fermentando entre 20 y 25 °C utilizando, igual que en este estudio, un cultivo iniciador que contenía *L. sakei*, *S. carnosus* y *S. xylosus*.

Si bien el lactato de sodio tiene acción bacteriostática contra varios patógenos como *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium spp* (Houtsma et al., 1993; Shelef, 1994; Weaver & Shelef, 1993), su rol principal es el de regular la acidificación (Ordóñez et al., 1999), inhibiendo el crecimiento de las BAL y prolongando la fase de latencia (Deumier & Collignan, 2003; Lin & Lin, 2002; Stekelenburg & Kant-Muermans, 2001; Wang, 2000). Por lo tanto, con el agregado de lactato de sodio se obtuvo una menor reducción de pH a las 48 horas (Gráfica 8) y posiblemente una menor producción bacteriocinas por parte de *L. curvatus* y *P. acidilactici* comprometiendo la inocuidad de los salames.

A temperaturas de fermentación por encima de 20 °C el factor principal que incide en la reducción de *L. monocytogenes* es el descenso de pH y su lenta reducción resulta en una supervivencia prolongada de este patógeno (Mataragas et al., 2015b). El uso de lactato de sodio en las condiciones ensayadas prolongó el tiempo que los salames estuvieron en condiciones de pH y temperatura favorables para el crecimiento *Listeria* y de otros patógenos, como *E. coli* y *Staphylococcus aureus* (pH > 5.3 y temperatura > 15.5 °C) (American Meat Institute Foundation, 1997).



Gráfica 8. Evolución de pH en salames con y sin lactato de sodio para diferentes temperaturas de fermentación (A) 30 °C, (B) 27 °C y (C) 24 °C. Barra de error ± una desviación estándar.

En nuestro estudio el uso de lactato de sodio en las condiciones trabajadas no fue seguro para garantizar un producto inocuo, mientras que sin lactato de sodio se aseguró una reducción de por lo menos 3 log ufc/g de *L. innocua* luego de 48 horas de fermentación, lo que es deseable desde el punto de vista de inocuidad. Por tanto, para los siguientes estudios se trabajó con salames sin lactato de sodio.

IV.4.3. Comportamiento de L. innocua durante la producción de salames.

IV.4.3.1. Estimación de tasa de inactivación de *Listeria* (μ), cantidad de *Listeria* al inicio (Y_0) y al final (Y_{END}) del proceso según la ecuación de Baranyi & Roberts.

Para cada condición de ensayo se modelaron los recuentos de *Listeria* en función del tiempo de acuerdo a la ecuación de Baranyi & Roberts. El R^2 del ajuste varió entre 0.73 y 0.94 (Tabla 11), indicando un ajuste adecuado para modelos microbiológicos experimentales (Gan et al., 2007; Mataragas et al., 2011). En el modelado no se consideró la fase de latencia debido a la falta de datos experimentales en ese período. Los parámetros estimados (μ , Y_0 e Y_{END}) a partir de los modelos para cada condición con sus errores se muestran en la Tabla 11. La tasa de inactivación de *Listeria* varió entre -2.04 y -3.17 log ufc/g/día y los recuentos finales de *L. innocua* variaron entre 2.71 y 3.92 log ufc/g (Tabla 11). En general las curvas de temperatura de fermentación de 30 °C presentaron un mejor ajuste que las de temperatura de fermentación de 24 °C, posiblemente porque a menores temperaturas no considerar la fase de latencia en el modelo tenga un impacto mayor.

Tabla 11. Parámetros estimados de acuerdo a la ecuación de Baranyi & Roberts utilizando el software DMFit

T_{ferm} (°C)	Calibre (cm)	T_{secado} (°C)	μ (log ufc/g/día ⁻¹)	R^2 modelo	Y_{END} (log ufc/g)	Y_o (log ufc/g)
27	9.15	17	-2.29±0.34	0.94	3.18±0.13	7.37
24	5.1	17	-2.04±0.72	0.73	3.92±0.29	7.72
27	5.1	14	-2.13±0.52	0.86	3.82±0.19	7.61
30	5.1	17	-3.17±0.26	0.97	2.72±0.08	7.08
24	9.15	14	-2.18±0.36	0.93	3.55±0.15	7.67
30	13.2	17	-2.64±0.47	0.92	2.60±0.16	7.08
30	9.15	20	-2.68±0.23	0.98	2.71±0.08	7.30
27	5.1	20	-2.30±0.42	0.90	3.20±0.17	7.50
27	13.2	14	-2.23±0.61	0.81	3.56±0.27	7.88
27	9.15	17	-2.42±0.36	0.94	3.23±0.12	7.33
27	9.15	17	-2.37±0.38	0.94	3.27±0.14	7.49
30	9.15	14	-2.81±0.41	0.93	3.48±0.13	7.41
24	9.15	20	-2.29±0.59	0.79	3.36±0.26	7.46
27	13.2	20	-2.21±0.41	0.89	3.17±0.21	7.71
27	9.15	17	-2.24±0.45	0.93	3.18±0.15	7.45
24	13.2	17	-2.14±0.69	0.73	3.63±0.33	7.80

μ , tasa de inactivación de *Listeria* con su error estándar; Y_{END} , *L. innocua* al final del proceso (28 días) con su error estándar; Y_o , *L. Innocua* al inicio del proceso.

Los parámetros estimados μ e Y_{END} se incorporaron como respuestas en un RSM para modelar su comportamiento en las condiciones de proceso definidas en este estudio. A la vez, se construyó la respuesta $Y_o - Y_{END}$ que representa el nivel de reducción total del proceso (Tabla 12).

IV.4.3.2. Modelado de la tasa de inactivación de *Listeria* (μ), cantidad final de *Listeria* (Y_{END}) y nivel de reducción total ($Y_0 - Y_{END}$) del proceso mediante un RSM.

Tabla 12: Matriz experimental del diseño de superficie de respuesta (RSM) de Box-Behnken con los parámetros de acuerdo al modelo calculado según la ecuación de Baranyi & Roberts utilizando el software DMFit con sus respuestas.

T_{ferm} (°C)	Calibre (cm)	T_{secado} (°C)	μ (log ufc/g/día ⁻¹)	Y_{END} (log ufc/g)	$Y_0 - Y_{END}$ (log ufc/g)
27	9.15	17	-2.29	3.18	4.02
24	5.1	17	-2.04	3.92	3.82
27	5.1	14	-2.13	3.82	3.79
30	5.1	17	-3.17	2.72	4.36
24	9.15	14	-2.18	3.55	4.12
30	13.2	17	-2.64	2.60	4.48
30	9.15	20	-2.68	2.71	4.59
27	5.1	20	-2.30	3.20	4.30
27	13.2	14	-2.23	3.56	4.32
27	9.15	17	-2.42	3.23	4.10
27	9.15	17	-2.37	3.27	4.22
30	9.15	14	-2.81	3.48	3.93
24	9.15	20	-2.29	3.36	4.10
27	13.2	20	-2.21	3.17	4.54
27	9.15	17	-2.24	3.18	4.27
24	13.2	17	-2.14	3.63	4.17

μ , tasa de inactivación de *Listeria*; Y_{END} , *L. innocua* al final del proceso; $Y_0 - Y_{END}$, nivel de reducción total de *Listeria* alcanzada

IV.4.3.2.1. Análisis de la tasa de inactivación (μ , en log ufc/g/día)

El comportamiento de la tasa de inactivación en respuesta a la temperatura de fermentación, temperatura de secado y calibre ajustó a un modelo cuadrático con una significancia de $p < 0.0001$, que permitió explicar el 89.18 % de la varianza ($R^2 = 0.8918$) y donde temperatura de fermentación, temperatura de fermentación² y la interacción entre temperatura de fermentación*calibre (T_{ferm} *calibre) fueron los términos significativos ($p < 0.05$). El modelo no presentó falta de ajuste ($F = 2.42$, $p = 0.2516$) y los parámetros R^2 ajustado, R^2

predicho y precisión adecuada fueron satisfactorios (0.8525, 0.6777 y 15.2466 respectivamente). La ecuación generada para la tasa de inactivación (μ) fue la siguiente

$$\mu \text{ (log ufc/g/día)} = -14.02861 + 1.09097 * T_{\text{ferm}} - 0.337037 * \text{Calibre} \\ + 0.012963 * T_{\text{ferm}} * \text{Calibre} - 0.024444 * T_{\text{ferm}}^2$$

Un aumento en la temperatura de fermentación produjo un aumento en la tasa de inactivación, siendo este aumento más pronunciado a temperaturas de fermentación mayores (Figura 5). Contrario a estos resultados, Brusa et al. (2021) mediante un análisis de riesgo basado en las ecuaciones de Polese (Polese et al., 2017) estimaron que la probabilidad de crecimiento de *L. monocytogenes* en embutidos fermentados secos es mayor a 30 °C que a 20 °C, trabajando a temperaturas constantes. Si bien en el modelo de Brusa et al. (2021) se considera el uso de cultivos iniciadores, no se incorpora el tipo de cepas ni su capacidad de producir bacteriocinas y disminución de pH con las variables del proceso. Como ya se mostró en este estudio (tabla 10), y en otras investigaciones (de Souza Barbosa et al., 2015; Leroy & De Vuyst, 1999) la capacidad listericida es muy variable entre distintos cultivos iniciadores y condiciones del medio.

A su vez, si bien el calibre no fue una variable significativa, sí lo fue su interacción con la temperatura de fermentación. Dicho efecto fue despreciable a temperaturas menores de 26 °C, haciéndose más notorio con el aumento de temperatura (Figura 5). A 30 °C μ disminuye a medida que aumenta el calibre (Figura 5). De Souza et al. (2018) fermentando a una temperatura entre 24 y 26 °C no observó diferencias entre calibres de 3.2, 5.5 y 8.0 cm. Mohamed et al. (2022) trabajando con calibres entre 5.0 y 8.0 cm tampoco observó efecto en la reducción de *L. monocytogenes* durante la etapa de fermentación a 32 °C, no reportando resultados a calibres mayores.

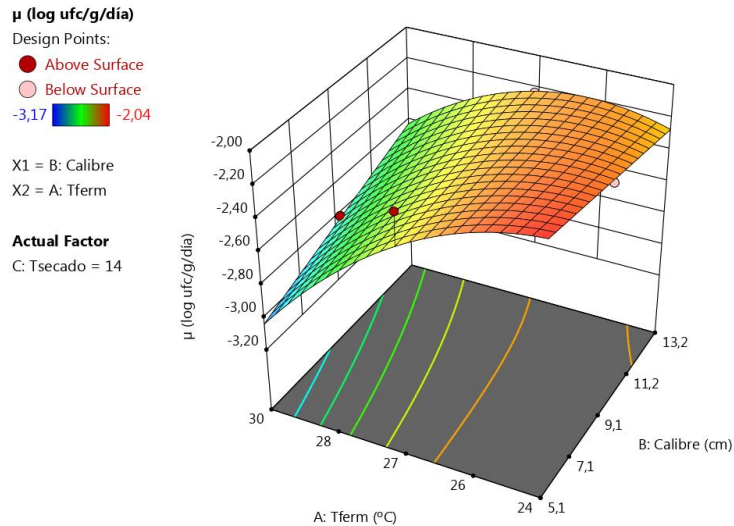


Figura 5. Superficie de respuesta generada del diseño cuadrático donde se visualiza el efecto de la temperatura de fermentación y del calibre en la tasa de inactivación de *Listeria* (μ) para una temperatura de secado de 14 °C.

IV.4.3.2.2. Análisis de la cantidad de *Listeria* final (Y_{END} , en log ufc/g)

Dicha respuesta se ajustó a un modelo lineal con una significancia de $p = 0.0002$, que permitió explicar el 72.73 % de la varianza ($R^2 = 0.7273$), donde tanto la temperatura de fermentación como la temperatura de secado fueron variables significativas ($p < 0.05$). El modelo presentó falta de ajuste ($F = 30.74$, $p = 0.0084$), lo que sugiere que hay otros factores que afectan esta respuesta que no fueron considerados en el diseño experimental. A pesar de esta falta de ajuste se observó que, tanto a mayor temperatura de fermentación como a mayor temperatura de secado, los recuentos de *Listeria* al final del proceso (Y_{END}) fueron menores (Figura 6).

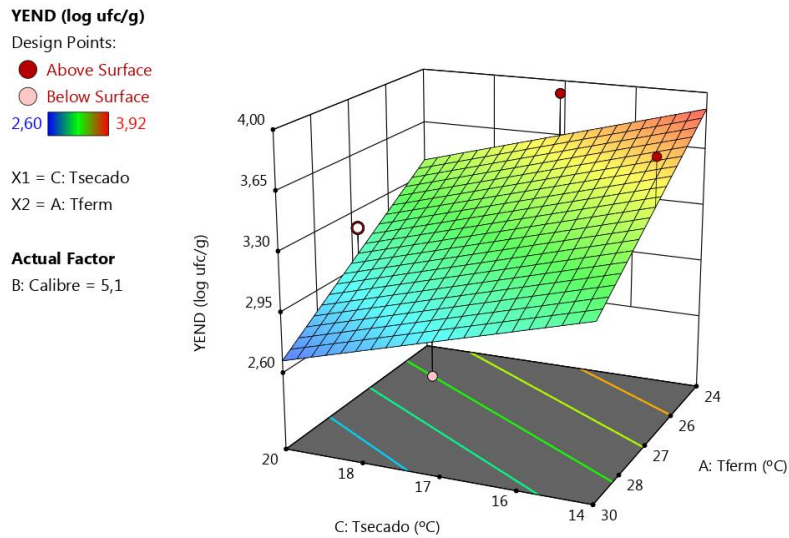


Figura 6. Superficie de respuesta generada del diseño cuadrático donde se visualiza el efecto de la temperatura de fermentación y temperatura de secado en los recuentos de *L. innocua* a los 28 días del inicio de la producción (Y_{END}) para salames de calibre 5.1 cm

IV.4.3.2.3. Análisis del nivel de reducción ($Y_0 - Y_{END}$ en log ufc/g)

El nivel de reducción se ajustó a un modelo 2FI reducido con un $p < 0.0001$, un R^2 de 0.9362 y un R^2 predicho de 0.7468, similar al R^2 ajustado de 0.8936. El término “Precisión adecuada” fue de 17.4031, por lo que este modelo se puede utilizar para navegar por el espacio de diseño. La temperatura de fermentación, el calibre, la temperatura de secado y la interacción entre temperatura de fermentación*calibre y temperatura de fermentación*temperatura de secado fueron términos significativos del modelo ($p < 0.05$). A su vez, la falta de ajuste no fue significativa ($F = 1.26$, $p = 0.4607$).

Tanto la temperatura de secado como la de fermentación tuvieron un efecto positivo en el valor de $Y_0 - Y_{END}$. A medida que aumentó la temperatura de secado para la misma temperatura de fermentación el valor de $Y_0 - Y_{END}$ fue mayor y por tanto la reducción total de *Listeria* del proceso también (Figura 7). A su vez, a medida que la temperatura de fermentación aumentó, también aumentó la incidencia de la temperatura de secado en el valor de $Y_0 - Y_{END}$. Del mismo modo,

a medida que la temperatura de secado aumentó también se incrementó la incidencia de la temperatura de fermentación en el valor de Y_0-Y_{END} . Este comportamiento se registró para los tres calibres ensayados (Figura 7 A). Con respecto al calibre, a temperaturas de fermentación de 24°C se observa una tendencia a que cuanto mayor es el calibre mayor es Y_0-Y_{END} .

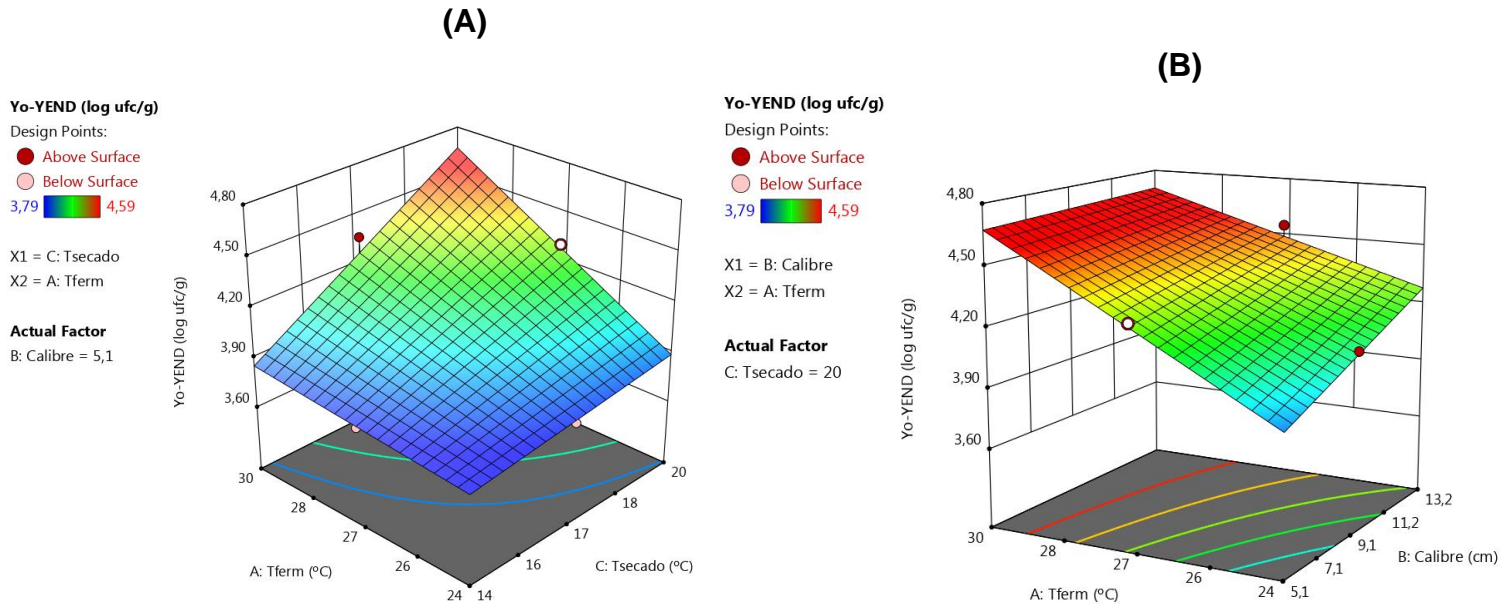


Figura 7. Superficie de respuesta generada del diseño 2FI reducido donde se visualiza el efecto las distintas variables en la respuesta Y_0-Y_{END} : **(A)** Temperatura de fermentación y temperatura de secado para salames de calibre 5.1 cm, **(B)** Temperatura de fermentación y calibre para una temperatura de secado de 17 °C.

La ecuación generada para la respuesta (Y_0-Y_{END}) fue la siguiente:

$$(Y_0-Y_{END}) (\log ufc/g) = +7.46179 - 0,204028*Tferm + 0.341152*Calibre - 0.392701*Tsecado - 0.007407*Tferm*Calibre + 0.018611*Tferm*Tsecado - 0.005761 Calibre*Tsecado$$

La obtención de los dos modelos matemáticos, una para la tasa de inactivación de *Listeria* (μ) y el otro para el nivel total de reducción de *Listeria* alcanzada (Y_0-Y_{END}) permitieron predecir estas respuestas en función de la temperatura de fermentación, la temperatura de secado y el calibre del salame. Las condiciones

de proceso que maximizan μ e $(Y_0 - Y_{END})$ para los tres calibres ensayados son temperatura de fermentación 30 °C y temperatura de secado 20 °C. Los valores de μ e $(Y_0 - Y_{END})$ predichos fueron -3.04 log ufc/g/día y 4.60 log ufc/g para salames de calibre 5.1 cm, -2.83 log ufc/g/día y 4.69 log ufc/g para salames de calibre 9.15 cm y -2.62 log ufc/g/día y 4.77 log ufc/g para salames de calibre 13.2 cm respectivamente.

Se realizó la verificación de los modelos para éstas temperaturas y para salames de calibre 9.15 cm, obteniéndose una tasa de reducción de -2.62 log ufc/g/día y una reducción de *Listeria* de 4.52 log ufc/g, valores comprendidos dentro del intervalo (95 %) predicho por ambos modelos.

IV.4.3.3. ¿Podrá *Listeria* crecer durante el secado?

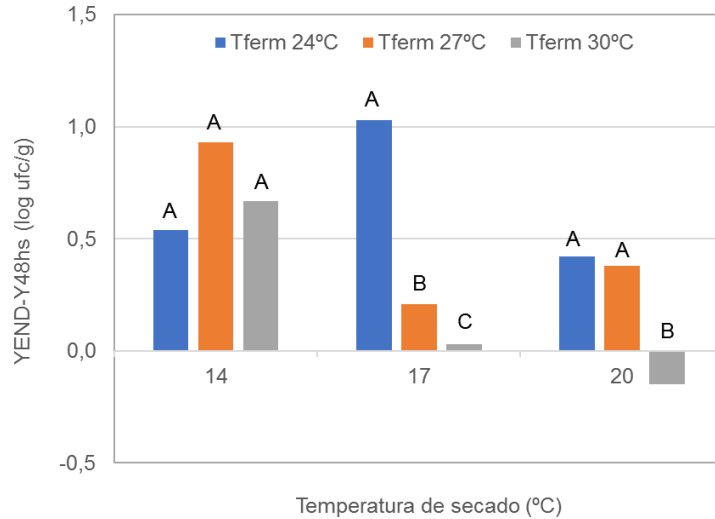
A pesar de haber alcanzado una reducción de *Listeria* mayor a 3 log ufc/g al final del proceso (28 días), se observó que en algunas de las corridas los recuentos a los 28 días (Y_{END}) fueron mayores que a la salida de la fermentación (Y_{48h}), sugiriendo que existen condiciones que durante el secado permiten el crecimiento de *L. monocytogenes*. Se calculó la variación entre los recuentos al final del secado y a la salida de la fermentación ($Y_{END} - Y_{48h}$) (Tabla 13) y se consideró que existió un crecimiento de *Listeria* cuando $Y_{END} - Y_{48h}$ fue ≥ 0.5 (Novelli et al., 2017).

Tabla 13. Variación en los recuentos de *Listeria* entre el inicio y el final de la etapa de secado ($Y_{END}-Y_{48h}$) para las diferentes condiciones de ensayo (Temperatura de fermentación, Temperatura de secado y calibre).

T_{ferm} (°C)	Calibre (cm)	T_{secado} (°C)	$Y_{END}-Y_{48h}$ (log ufc/g)
27	9.15	17	0.30
24	5.1	17	1.11*
27	5.1	14	0.86*
30	5.1	17	0.02
24	9.15	14	0.54*
30	13.2	17	0.03
30	9.15	20	-0.15
27	5.1	20	0.39
27	13.2	14	0.99*
27	9.15	17	0.18
27	9.15	17	0.21
30	9.15	14	0.67*
24	9.15	20	0.42
27	13.2	20	0.37
27	9.15	17	0.15
24	13.2	17	0.94*

T_{ferm} , Temperatura de fermentación; T_{secado} , Temperatura de secado. * Valores de $Y_{END}-Y_{48h} \geq 0.5$ indicaron un aumento en los recuentos de *Listeria* durante la etapa de secado (Novelli et al., 2017).

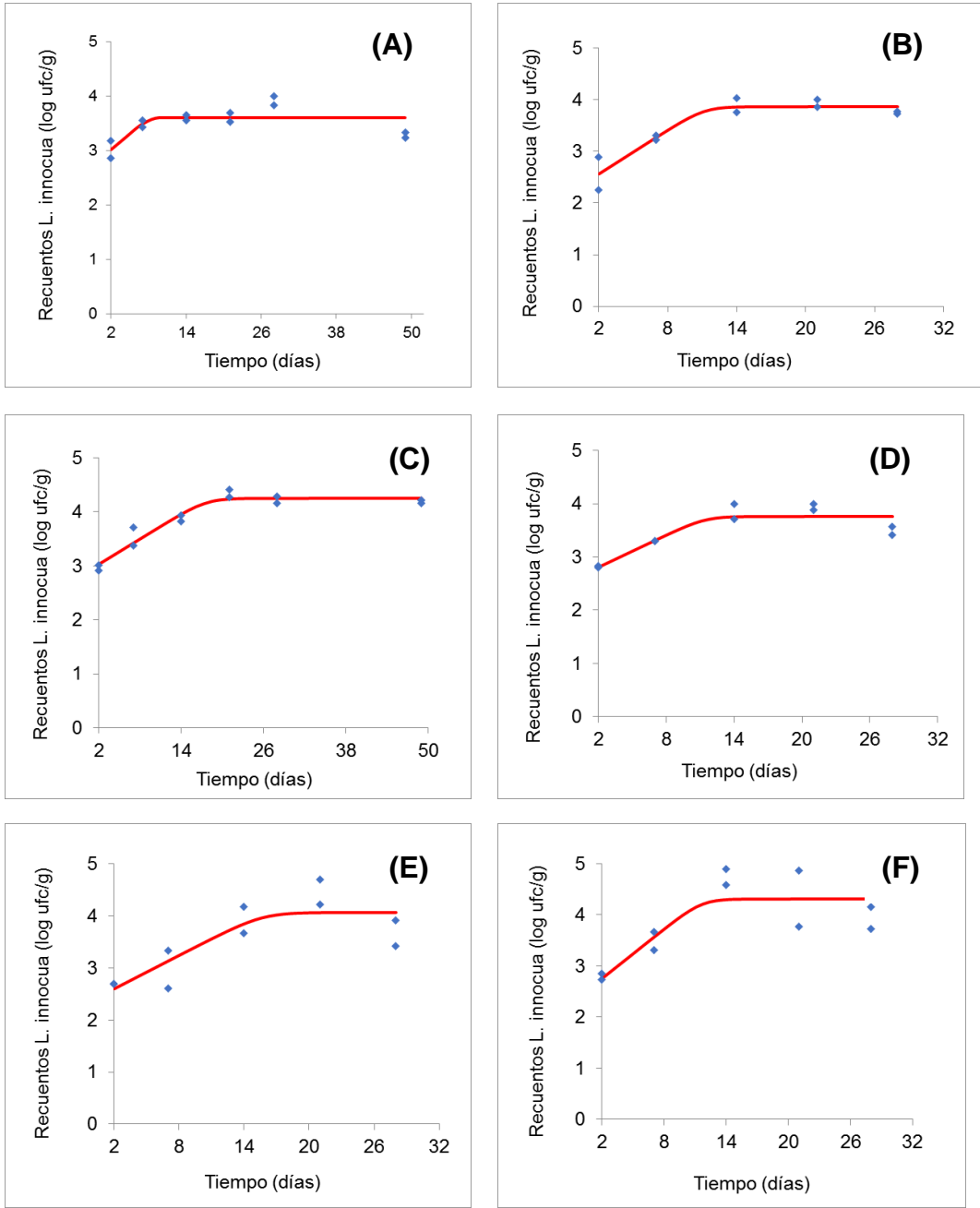
Se observó mediante un análisis de ANOVA que el calibre no fue una variable significativa ($p > 0.05$) para $Y_{END} - Y_{48h}$. Se realizó un nuevo ANOVA agrupando por temperatura de secado para las diferentes temperaturas de fermentación (Gráfica 9).



Gráfica 9. Variación en los recuentos de *Listeria* entre el inicio y el final de la etapa de secado ($Y_{END} - Y_{48h}$) agrupados por temperatura de secado para diferentes temperaturas de fermentación. ^{A, B, C} Letras diferentes entre una misma temperatura de secado indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por LSD de Fischer.

Para todas las condiciones con temperaturas de secado de 14 °C $Y_{END} - Y_{48h}$ fue ≥ 0.5 . Para la temperatura de secado a 17 °C la única condición que presentó crecimiento fue la temperatura de fermentación a 24 °C. Cuando el secado fue a 20 °C para todas las temperaturas de fermentación $Y_{END} - Y_{48h}$ fue < 0.5 . (Gráfica 9). A las temperaturas de secado de 17 °C y 20 °C fermentar a 30°C presentan el $Y_{END} - Y_{48h}$ significativamente ($p < 0.05$) menor (Gráfica 9). Este efecto de la temperatura de secado en los recuentos de *Listeria* en el secado también se observó en el modelado de $Y_0 - Y_{END}$.

Para las seis condiciones de ensayo donde $Y_{END} - Y_{48h}$ fue ≥ 0.5 , se modeló el comportamiento de *Listeria* usando los recuentos de *L. innocua* medidos para cada tiempo en la etapa de secado, según la ecuación de Baranyi & Roberts con el software DMFit y se estimó la tasa de crecimiento. Se observa que *Listeria* creció con tasas entre 0.08 y 0.16 log ufc/g/día para luego estabilizarse. Los recuentos se estabilizaron entre el día 7 y el día 14, salvo para la condición de calibre 5.1 cm, temperatura de fermentación 27 °C, secado a 14 °C y calibre 13.2 cm, fermentación 24 °C, secado a 17 °C que se estabilizaron entre los 14 y 21 días (Gráfica 10).



Gráficas 10. Recuentos de *L. innocua* para cada tiempo en la etapa de secado con su ajuste según la ecuación de Baranyi & Roberts usando el software DMFit para diferentes condiciones de proceso variando calibre/temperatura de fermentación/temperatura de secado: **(A)** 9.15 cm/ 24 °C / 14 °C, **(B)** 13.2 cm/ 27 °C /14 °C, **(C)** 5.1 cm/ 27 °C /14 °C, **(D)** 9.15 cm/ 30 °C / 14 °C, **(E)** 13.2 cm/ 24 °C / 17 °C y **(F)** 5.1 cm/ 24 °C / 17 °C.

Se observó que en las seis condiciones que permitieron el crecimiento de *Listeria* durante el secado se alcanzaron las condiciones de $\text{pH} \leq 5.0$ y $\text{aw} \leq 0.94$ o a una $\text{aw} \leq 0.92$, restrictivas para el crecimiento de *Listeria* en alimentos, en tiempos mayores comparado con las condiciones que no mostraron crecimiento durante el secado (Tabla 14 y Anexo VI).

Tabla 14. Evolución de las condiciones de pH y aw en salames según permitan o no el crecimiento de *L. monocytogenes* para diferentes condiciones de corrida.

T _{ferm} (°C)	Calibre (cm)	T _{secado} (°C)	Tiempo de proceso (días)							
			0	1	2	7	14	21	28	
27	9.15	17	■	■	■	■	■	■	■	■
30	5.1	17	■	■	■	■	■	■	■	■
24	5.1	17	■	■	■	■	■	■	■	■
30	13.2	17	■	■	■	■	■	■	■	■
24	13.2	17	■	■	■	■	■	■	■	■
24	9.15	14	■	■	■	■	■	■	■	■
30	9.15	14	■	■	■	■	■	■	■	■
27	13.2	14	■	■	■	■	■	■	■	■
27	5.1	14	■	■	■	■	■	■	■	■

T_{ferm}, Temperatura de fermentación; T_{secado}, Temperatura de secado; ■ Control por aw ($\text{aw} < 0.92$); ■ Control por pH y aw ($\text{pH} < 5$ y $\text{aw} < 0.94$); ■ No hay control por pH y/o aw.

Para los salames que no presentaron crecimiento de *L. innocua* durante el secado (27 °C / 9.15 cm / 17 °C, 30 °C / 5.1 cm / 17 °C y 30 °C / 13.2 cm / 17 °C) se alcanzaron valores de pH y aw restrictivos a la salida de la fermentación (día 2), mientras que en los salames que evidenciaron crecimiento las condiciones restrictivas se alcanzaron a tiempos mayores (Tabla 14 y Anexo VI).

Posiblemente en las condiciones que permitieron el crecimiento de *Listeria* en el secado, tanto las temperaturas bajas de fermentación (24 °C) como una amplitud

mayor en el cambio entre la fermentación y el secado, enlentecieron el metabolismo de las BAL, produciendo menor cantidad de ácido láctico y bacteriocinas (de Souza Barbosa et al., 2015; Leroy & De Vuyst, 1999).

IV.4.3.4. Tiempo de secado

Entre los 21 y 28 días, habiendo alcanzado la condición restrictiva de a_w menor a 0.92, no se evidenció aumento en los recuentos de *Listeria*, pero tampoco reducción (Tabla 15). Esto puede deberse a que el control del crecimiento de *Listeria* por efecto del pH y/o a_w no es instantáneo, sugiriendo que faltó tiempo de secado para evidenciar un descenso en los recuentos de *Listeria*. Para evaluar si un tiempo adicional de secado de 28 días reduce los recuentos de *Listeria*, se analizó *Listeria* a los 56 días en salames de calibre 13.2 cm, fermentados a 27 °C para dos temperaturas de secado (14 y 20 °C). En ambos casos se obtuvieron reducciones significativas ($p < 0.05$) en los recuentos de *Listeria* a los 56 días. Hussein et al.(2022) también reportó que en salames inoculados con *L. monocytogenes*, extender el secado de 30 a 60 días a 21 °C aumenta la reducción de *Listeria* en aproximadamente 2 log ufc/g. La eficacia de realizar un secado extra para reducir los patógenos en salames puede atribuirse a una mayor reducción de la actividad de agua en combinación con la mayor eficacia antimicrobiana de los ácidos orgánicos a altas temperaturas (Lindqvist & Lindblad, 2009; Quinto et al., 2014; Zaika, 2002).

Tabla 15. Recuentos de *L. innocua* a los 28 días y 56 días en salames de calibre 13.2 cm, fermentados a 27 °C y secados a 20 y 14 °C.

<i>T</i> _{ferm} (°C)	Calibre (cm)	<i>T</i> _{secado} (°C)	<i>L. innocua</i> 28 días (log ufc/g) ¹	<i>L. innocua</i> 56 días (log ufc/g) ²
27	13.2	20	3.01±0.05 ^{A, a}	1.95±0.00 ^{B, a}
27	13.2	14	3.75±0.03 ^{A, b}	3.33±0.04 ^{B, b}

*T*_{ferm}, temperatura de fermentación; *T*_{secado}, temperatura de secado; ^{1,2} promedio ± desviación estándar de duplicados. ^{A, B} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el tiempo para la misma condición de proceso. ^{a, b} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) en el mismo tiempo para diferentes condiciones de proceso.

La reducción adicional de *Listeria* obtenida por la extensión del tiempo de secado fue mayor a 20 °C que a 14 °C (tabla 15), siendo la tasa de inactivación de 0.038 log ufc/g/día y 0.015 log ufc/g/día respectivamente. Estos valores son similares a las tasas de inactivación no térmicas estimadas usando el modelo predictivo para productos cárnicos fermentados disponible en PMP para temperaturas de secado de 14 °C y 20 °C con pH 5.2 y aw 0.91 (restrictivos para el crecimiento de *Listeria*) de 0.017 log ufc/día para 14 °C y 0.031 log ufc/día a 20 °C (<https://pmp.errc.ars.usda.gov/PMPOnline.aspx?ModelID=19>). La inactivación no térmica de *Listeria* en presencia de altas concentraciones de sal se ha reportado que es mayor a 30 °C que a 10 °C, debido a que a bajas temperaturas el metabolismo y el crecimiento se reducen permitiendo que *L. monocytogenes* sobreviva a valores bajos de pH (Cole et al., 1990).

IV.5. Conclusión

La fermentación y el secado son procedimientos que deben realizarse dentro de ciertos límites para garantizar la seguridad del producto. La acción listericida se dio mayoritariamente en la etapa de fermentación producto del rápido descenso del pH producido por el cultivo iniciador utilizado, que a su vez produce bacteriocinas con acción contra *L. monocytogenes*. En este estudio, se evidenció que tanto el uso de lactato de sodio como del tipo de cultivo iniciador afectan la eficacia de la fermentación en reducir la contaminación por *Listeria*. Basados en estos resultados no se recomienda el uso de 2 % de lactato de sodio ya que compromete la inocuidad del producto. A su vez, no todos los cultivos iniciadores produjeron el mismo nivel de reducción de *Listeria*, sin embargo, se obtuvieron a las 48 horas valores similares de pH. Esto pone de manifiesto que la medida de pH a la salida de la fermentación no es un indicador suficiente de proceso para el control de *Listeria*.

En las condiciones ensayadas en este estudio que considera las temperaturas habituales de fermentación y secado generalmente utilizadas en Uruguay (Repiso, 2018) el nivel máximo de reducción de *Listeria* se alcanzó con temperatura de fermentación de 30 °C y temperatura de secado de 20 °C. Sin embargo, Brusa et al. (2021) plantean mediante una evaluación de riesgo en embutidos fermentados que a mayor temperatura de fermentación aumenta la probabilidad de crecimiento de *Listeria*. El estudio de Brusa et al. (2021) se basa en el modelo desarrollado por Polese et al. (2017) para salames artesanales italianos que considera condiciones de proceso y microbiota nativa en la carne diferente a la que se encuentra en nuestro país. Por tanto, es posible que existan discrepancias.

En este estudio, se observaron algunas combinaciones de temperatura de fermentación y secado que durante el secado no permitieron el crecimiento de *Listeria* y otras condiciones que sí lo hicieron. Para las condiciones de proceso que no se registraron aumentos en los recuentos de *Listeria* durante el secado se alcanzaron valores de pH y a_w restrictivos al final de la fermentación. En las condiciones que permitieron el crecimiento de *Listeria* los salames alcanzaron condiciones restrictivas en tiempos mayores (entre los 7 y 14 días).

Los resultados de este estudio evidenciaron que, aunque se alcancen valores de actividad de agua menor a 0.92 en el secado, dicho patógeno permanecerá en el producto por un tiempo que puede extenderse por varias semanas, requiriendo tiempos adicionales de secado para comenzar a observar una disminución en los recuentos. Por tanto, si bien la disminución del pH a través de la fermentación y disminución de la actividad del agua durante el secado son parámetros que se deben controlar durante la producción de salames, estos controles no son suficiente para asegurar un producto inocuo (Hussein et al., 2022). Recientemente un estudio de un brote de *Salmonella tyhimurium* vinculado con “salami sticks” al estilo italiano prontos para el consumo (USDA. Food Safety and Inspection Service., 2022) realizado por el Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos (FSIS) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) determinó que a pesar de que se cumplía con los parámetros recomendados de pH, tiempo y temperatura durante la fermentación y alcanzar los valores de actividad de agua requerido al final del secado se encontraron muestras que dieron positivas para *Salmonella*.

Por consiguiente, los elaboradores de embutidos fermentados secos deberían validar su formulación (cultivo iniciador usado, ingredientes y cantidades adicionadas) y condiciones de procesamiento (temperatura de fermentación, temperatura de secado y calibre) para demostrar que logran la inactivación deseada de *Listeria* (3 log ufc/g) y de otros patógenos y por tanto de la seguridad de su proceso. Esta validación debería realizarse al comienzo del procesamiento y después de cualquier cambio en la formulación y/o condiciones de procesamiento del producto. Una vez validado el proceso para el control de *Listeria*, la evolución de pH y aw durante el proceso se convierten en indicadores válidos de inocuidad.

V CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

En esta tesis, la estrategia planteada de aplicar en forma conjunta AL/UV-C en las condiciones ensayadas demostró ser útil para reducir la contaminación por *L. monocytogenes* en carne sin alterar su color y hasta el momento no ha sido reportado. A su vez, la aplicación combinada de AL/UV-C retrasó el crecimiento de BAL dos semanas en carne envasada al vacío en comparación con muestras no tratadas, sugiriendo que esta estrategia podría también ser favorable para extenderla la vida útil. Sin embargo, se ve necesario continuar con los estudios respecto a la posible adaptación de *L. monocytogenes* a los tratamientos subletales, su incidencia en otros microorganismos presentes en carne, así como posibles cambios sensoriales para poder evaluar riesgo-beneficio de su aplicación.

Si bien hay que estudiar también la forma de implementar en la industria esta estrategia combinada de AL/UV-C en carne, esta implementación puede contribuir a que *L. monocytogenes* no se propague a lo largo de la cadena, en especial a los derivados cárnicos como los embutidos secos fermentados.

En lo que respecta a salames, es el primer estudio en Uruguay que reporta el comportamiento de *Listeria* en función de diferentes condiciones de proceso habitualmente usadas en nuestro país durante la producción de salames a escala piloto. Se debe continuar generando estudios explorando las condiciones de producción nacional y la evolución de otros patógenos que también están presentes en carne.

VI REFERENCIAS

Acquistapace, M. J. (2015). *Efecto de la aplicación de ácido láctico sobre el crecimiento de Listeria spp. aisladas de establecimientos frigoríficos nacionales*. Montevideo: Facultad de Ciencias. (Tesina de Grado).

Adams, M., & Mitchell, R. (2002). Fermentation and pathogen control: a risk assessment approach. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 75–83. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00181-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00181-2)

Adu-gyamfi, A., Torgby-tetteh, W., & Appiah, V. (2012). Microbiological Quality of Chicken Sold in Accra and Determination of D10 -Value of E . coli. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 693–698. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4236/fns.2012.35094>

Alfaia, C. M., Lopes, A. F., & Prates, J. A. M. (2013). Diet quality: An evidence-based approach. In *Diet Quality: An Evidence-Based Approach* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7339-8>

American Meat Institute Foundation. (1997). *Good Manufacturing Practices for Fermented Dry and Semi-Dry Sausage Products*. Disponible En: https://Meathaccp.Wisc.Edu/Model_Haccp_Plans/Assets/GMP%20Dry%20Sausage.Pdf (Consulta El 3 de Mayo de 2022).

Ariyapitipun, T., Mustapha, A., & Clarke, A. D. (2000). Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on Vacuum-Packaged Raw Beef Treated with polylactic Acid, Lactic Acid and Nisin. *Journal of Food Protection*, 63(1), 131–136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb11395.x>

Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Nou, X., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Kent, M. P., Jaroni, D., Pauling, B., Allen, D. M., & Koohmaraie, M. (2004). Escherichia coli O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, Enterobacteriaceae, and Escherichia coli O157 at various steps in commercial beef processing plants. *Journal of Food Protection*, 67(4), 658–665.

Ballesteros, L., Moreno, Y., Cuesta, G., & Ferrús, M. A. (2009). *Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de Listeria monocytogenes aisladas de*

vegetales congelados. Univeridad Politécnica de Valencia (Teiss de Maestría)
Disponibe En:
https://Riunet.Upv.Es/Bitstream/Handle/10251/14317/Tesis_de_...Pdf?Sequence=1.

Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3–4), 277–294. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90157-0](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90157-0)

Barbau-Piednoir, E., Botteldoorn, N., Yde, M., Mahillon, J., & Roosens, N. H. (2013). Development and validation of qualitative SYBR®Green real-time PCR for detection and discrimination of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(9), 4021–4037. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4477-2>

Barbuti, S., & Parolari, G. (2002). Validation of manufacturing process to control pathogenic bacteria in typical dry fermented products. *Meat Science*, 62(3), 323–329. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00124-9](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00124-9)

Bell, R. G., Penney, N., & Moorhead, S. M. (1996). The retail display life of steaks prepared from chill stored vacuum and carbon dioxide-packed sub-primal beef cuts. *Meat Science*, 42(2), 165–178. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(95\)00031-3](https://doi.org/10.1016/0309-1740(95)00031-3)

Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Richard K. Robinson. (2010). Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 637–645. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.05.016>

Blatter, S., Giezendanner, N., Stephan, R., & Zweifel, C. (2010). Phenotypic and molecular typing of *Listeria monocytogenes* isolated from the processing environment and products of a sandwich-producing plant. *Food Control*, 21(11), 1519–1523. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.04.025>

Bosilevac, J. M., Guerini, M. N., Brichta-harhay, D. M., Arthur, T. M., Hruska, R. L., & Animal, U. S. M. (2007). *Microbiological Characterization of Imported and Domestic Boneless Beef Trim Used for Ground Beef*. 70(2), 440–449.

Bozkurt, H., & Erkmen, O. (2004). Effect of nitrate/nitrite on the quality of sausage

(sucuk) during ripening and storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(3), 279–286. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1638>

Braga, V., Vázquez, S., Vico, V., Pastorino, V., Mota, M. I., Legnani, M., Schelotto, F., Lancibidad, G., & Varela, G. (2017). Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Montevideo-Uruguay. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), 689–694. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.010>

Branen, J. K., & Davidson, P. M. (2004). Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 63–74. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00172-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00172-7)

Brugnini, G., Acquistapace, M. J., Rodriguez, S., & Rufo, C. (2018). Efecto de la aplicación de ácido láctico sobre *Listeria monocytogenes* en carne envasada al vacío en Uruguay. *INNOTEC*, 15(15), 7–14. <https://doi.org/10.26461/15.06>

Brugnini, G., Rodríguez, S., Rodríguez, J., & Rufo, C. (2021). Effect of UV-C irradiation and lactic acid application on the inactivation of *Listeria monocytogenes* and lactic acid bacteria in vacuum-packaged beef. *Foods*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/foods10061217>

Brusa, V., Prieto, M., Campos, C. A., Epszteyn, S., Cuesta, A., Renaud, V., Schembri, G., Vanzini, M., Michanie, S., Leotta, G., & Signorini, M. (2021). Quantitative risk assessment of listeriosis associated with fermented sausage and dry-cured pork shoulder consumption in Argentina. *Food Control*, 123(October 2020), 107705. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107705>

Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., Yoon, B., Goebel, W., & Wagner, M. (1999). *Detection and Differentiation of Listeria spp. by a Single Reaction Based on Multiplex PCR*. 65(10), 4688–4692.

Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., & Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>

Buchanan, R. L., & Phillips, J. G. (1990). Response Surface Model for Predicting

the Effects of Temperature pH , Sodium Chloride Content , Sodium Nitrite Concentration and Atmosphere on the Growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 53(5), 370–376. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-53.5.370>

Bucur, F. I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C. U., & Nicolau, A. I. (2018). Resistance of *Listeria monocytogenes* to Stress Conditions Encountered in Food and food processing environments. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02700>

Burall, L. S., Grim, C. J., & Datta, A. R. (2017). A clade of *Listeria monocytogenes* serotype 4b variant strains linked to recent listeriosis outbreaks associated with produce from a defined geographic region in the US. *PLoS ONE*, 12(5), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176912>

Byelashov, O. A., Daskalov, H., Geornaras, I., Kendall, P. A., Belk, K. E., Scanga, J. A., Smith, G. C., & Sofos, J. N. (2010). Reduction of *Listeria monocytogenes* on frankfurters treated with lactic acid solutions of various temperatures. *Food Microbiology*, 27(6), 783–790. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.04.003>

Cabrera, M. C., Ramos, A., Saadoun, A., & Brito, G. (2010). Selenium, copper, zinc, iron and manganese content of seven meat cuts from Hereford and Braford steers fed pasture in Uruguay. *Meat Science*, 84(3), 518–528. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.10.007>

Carpenter, C. E., Smith, J. V., & Broadbent, J. R. (2011). Efficacy of washing meat surfaces with 2% levulinic, acetic, or lactic acid for pathogen decontamination and residual growth inhibition. *Meat Science*, 88(2), 256–260. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.12.032>

Casaburi, A., Aristoy, M.-C., Cavella, S., Di, R., Ercolini, D., Toldrá, F., & Villani, F. (2007). Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures. *Meat Science*, 76, 295–307. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.11.011>

Casaburi, A., Di Martino, V., Ferranti, P., Picariello, L., & Villani, F. (2016). Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus*

54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. *Food Control*, 59, 31–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.016>

Casaburi, A., Di, R., Cavella, S., Toldrá, F., Ercolini, D., & Villani, F. (2008). Proteolytic and lipolytic starter cultures and their effect on traditional fermented sausages ripening and sensory traits. *Food Microbiology*, 25, 335–347. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.006>

Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., & Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79(3), 483–499. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.10.009>

CDC. (2014). *CDC national health report: Leading causes of morbidity and mortality and associated behavioral risk and protective factors — United States, 2005–2013*. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/25809>

CDC. (2017). *Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Listeria monocytogenes* (Issue PNL04 Last Updated July 2017). Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/listeria-pfge-protocol-508c.pdf>

Chaillou, S., Champomier-Vergès, M.-C., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A.-M., Dudez, A.-M., Martin, V., Beaufils, S., Darbon-Rongère, E., Bossy, R., Loux, V., & Zagorec, M. (2005). The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nature Biotechnology*, 23(12), 1527–1533. <https://doi.org/10.1038/nbt1160>

Chen, B., Pyla, R., Kim, T., Silva, J. L., & Jung, Y.-S. (2010). *Incidence and Persistence of Listeria monocytogenes in the Catfish Processing Environment and Fresh Fillets*. 73(9), 1641–1650.

Codex Alimentarius. (2005). *Code of hygienic practice for meat CAC/RCP 58-2005* (Vol. 1, Issue 1985, pp. 1–51).

Cole, M. B., Jones, M. V., & Holyoak, C. (1990). The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 69(1), 63–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02912.x>

Comisión Europea. (2013). REGLAMENTO (UE) N° 101/2013 DE LA COMISIÓN de 4 de febrero de 2013 relativo a la utilización de ácido láctico para reducir la contaminación de superficie de las canales de bovinos. *Diario Oficial de La Unión Europea*, 9(7), 3. http://www.aditivosalimentarios.es/php_back/documentos/archivos/32013R0101.pdf

Cosansu, S., Geornaras, I., Ayhan, K., & Sofos, J. N. (2010). Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* 13 and its antimicrobial substance in a dry fermented sausage sucuk and in turkey breast. *Journal of Food and Nutrition Research*, 49(4), 206–214.

de Noordhout, C. M., Devleeschauwer, B., Angulo, F. J., Verbeke, G., Haagsma, J., Kirk, M., Havelaar, A., & Speybroeck, N. (2014). The global burden of listeriosis: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(11), 1073–1082. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70870-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70870-9)

de Souza Barbosa, M., Todorov, S. D., Ivanova, I., Chobert, J. M., Haertlé, T., & de Melo Franco, B. D. G. (2015). Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. *Food Microbiology*, 46, 254–262. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.004>

De Souza, J., Ahmed, R., Strange, P., Barbut, S., & Balamurugan, S. (2018). Effect of caliber size and fat level on the inactivation of *E. coli* O157:H7 in dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 266(September 2017), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.024>

Decreto 210/18. (n.d.). *Modificación del Reglamento Bromatológico Nacional*. Retrieved October 12, 2022, from <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-reglamento/210-2018/1>.

Decreto 588/008. (2008). *Modificación del Reglamento Bromatológico Nacional. Chacinados*.

DeGeer, S. L., Wang, L., Hill, G. N., Singh, M., Bilgili, S. F., & Bratcher, C. L. (2016). Optimizing application parameters for lactic acid and sodium metasilicate against pathogens on fresh beef, pork and deli meats. *Meat Science*, 118, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.008>

Degenhardt, R., & Anna, E. S. S. (2007). Survival of *Listeria monocytogenes* in low acid italian sausage produced under Brazilian conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 309–314. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822007000200024>

Den Besten, H. M. W., Mataragas, M., Moezelaar, R., Abee, T., & Zwietering, M. H. (2006). Quantification of the effects of salt stress and physiological state on thermotolerance of *Bacillus cereus* ATCC 10987 and ATCC 14579. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5884–5894. <https://doi.org/10.1128/AEM.00780-06>

Deumier, F., & Collignan, A. (2003). *The effects of sodium lactate and starter cultures on pH, lactic acid bacteria, Listeria monocytogenes and Salmonella spp. levels in pure chicken dry fermented sausage.* 65, 1165–1174. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00346-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00346-7)

Dickson, J. S. (1989). Survival and Growth of *Listeria monocytogenes* on Beef Tissue Surfaces As Affected By Simulated Processing Conditions. *Journal of Food Safety*, 10(3), 165–174. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1989.tb00017.x>

Dogan, O. B., Stratton, J., Arciniega, A., Clarke, J., Tamplin, M. L., Bianchini, A., & Wang, B. (2022). Quantitative modeling of the survival of *Listeria monocytogenes* in soy sauce-based acidified food products. *International Journal of Food Microbiology*, 370(May 2021), 109635. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109635>

Dorsa, W. J. (1997). New and Established Carcass Decontamination Procedures Commonly Used in the Beef-Processing Industry. *Journal of Food Protection*, 60(9), 1146–1151.

Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., & Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3819–3822. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004>

Doumith, M., Jacquet, C., Gerner-Smidt, P., Graves, L. M., Loncarevic, S., Mathisen, T., Morvan, A., Salcedo, C., Torpdahl, M., Vazquez, J. A., & Martin, P.

(2005). Multicenter validation of a multiplex PCR assay for differentiating the major *Listeria monocytogenes* serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: Toward an international standard. *Journal of Food Protection*, 68(12), 2648–2650. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.12.2648>

Doyle, M. E., Mazzotta, A. S., Wang, Ti., Wiseman, D. W., & Scott, V. N. (2001). Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in vegetables: Evaluation of blanching processes. *Journal of Food Protection*, 64(3), 385–387. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.3.385>

Drosinos, E. H., Mataragras, M., Anin, S. V.-M., Gasparik-Reichardt, J., Mirza, H., & Alagic, D. (2006). Quantifying Nonthermal Inactivation of *Listeria monocytogenes* in European Fermented Sausages Using Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria or Their Bacteriocins: A Case Study for Risk Assessment. *Journal of Food Protection*, 69(11), 2648–2663. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-69.11.2648>

Duffy, G., Walsh, D., Sheridan, J. J., Logue, C. M., Harrington, D., Blair, I. S., & McDowell, D. A. (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua* during storage of minced beef under vacuum or in air at 0°C and 10°C. *Food Microbiology*, 17(6), 571–578. <https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0354>

Dussault, D., Dang, K., & Lacroix, M. (2016). Development of a model describing the inhibitory effect of selected preservatives on the growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. *Food Microbiology*, 53, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.011>

Dussurget, O., Pizarro-Cerda, J., & Cossart, P. (2004). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annual Review of Microbiology*, 58, 587–610. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090934>

Eagerman, B. A., Clydesdale, F. M., & Francis, F. J. (1977). Determination of fresh meat by objective methods. *Journal of Food Science*, 42(3), 707–710.

EFSA-ECDPC. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12), 4634. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2597>

Egan, A. F., Eustace, I. J., & Shay, B. J. (1988). Meat packaging - maintaining the quality and prolonging the storage life of chilled beef, pork and lamb. www.meatupdate.csiro.au.

Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., Villani, F., Ercolini, D., Russo, F., Torrieri, E., Masi, P., & Villani, F. (2006). Changes in the Spoilage-Related Microbiota of Beef during Refrigerated Storage under Different Packaging Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(7), 4663–4671. <https://doi.org/10.1128/AEM.00468-06>

European Commission. RASSF Portal. (n.d.). *European Commission*. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/>

European Food Safety Authority (EFSA). (2011). Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of lactic acid for the removal of microbial surface contamination of beef carcasses, cuts and. *The EFSA Journal*, *9*(7), 2317, 35 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2317>.

European Food Safety Authority (EFSA). (2014). European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. In *EFSA Journal* (Vol. 12, Issue 2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3547>

Farber, J. M., & Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes* , a Food-Borne Pathogen. *Microbiological Reviews*, *55*(3), 476–511.

Faustman, C., & Cassens, R. G. (1990). the Biochemical Basis for Discoloration in Fresh Meat: a Review. *Journal of Muscle Foods*, *1*(3), 217–243. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.1990.tb00366.x>

Faustman, Cameron, Sun, Q., Mancini, R., & Suman, S. P. (2010). Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Science*, *86*(1), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.025>

FDA. (2000). Irradiation in the production, processing and handling of food. In *Federal Register* (Vol. 65, Issue 230, pp. 71056–71058).

Fennema, O. R. (2012). Food chemistry. In *Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1201/b18894-16>

- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: Epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of Food Protection*, 77(1), 150–170. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>
- Friedly, E. C., Crandall, P. G., Ricke, S., O'Bryan, C. A., Martin, E. M., & Boyd, L. M. (2008). Identification of *Listeria innocua* Surrogates for *Listeria monocytogenes* in Hamburger Patties. *Food Microbiology and Safety*, 73(4), 174–178. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00719.x>
- Gailunas, K. M., Matak, K. E., Boyer, R. R., Alvarado, C. Z., Williams, R. C., & Sumner, S. S. (2008). Use of UV light for the inactivation of *Listeria monocytogenes* and lactic acid bacteria species in recirculated chill brines. *Journal of Food Protection*, 71(3), 629–633. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.3.629>
- Gan, H. E., Karim, R., Muhammad, S. K. S., Bakar, J. A., Hashim, D. M., & Rahman, R. A. (2007). Optimization of the basic formulation of a traditional baked cassava cake using response surface methodology. *Lwt*, 40(4), 611–618. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.05.005>
- García, A. L., Brugnini, G., Rodríguez, S., Mir, A., Carriquiry, J., Rufo, C., & Briano, B. (2015). Vida útil de carne fresca de res envasada al vacío a 0°C y +4°C. *Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, 4, 27–45. <https://doi.org/10.5377/payds.v4i0.3962>
- Gayán, E., Serrano, M. J., Pagán, R., Álvarez, I., & Condón, S. (2015). Environmental and biological factors influencing the UV-C resistance of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 46, 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.011>
- Giello, M., La Stora, A., De Filippis, F., Ercolini, D., & Villani, F. (2018). Impact of *Lactobacillus curvatus* 54M16 on microbiota composition and growth of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages. *Food Microbiology*, 72, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.003>
- Girard, J. P. (1991). *Tecnología de la carne y de los productos cárnicos*. Editorial Acribia. ISBN: 978-84-200-0700-7.

- Guerrero-Beltrán, J. A., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2004). Review: Advantages and limitations on processing foods by UV light. *Food Science and Technology International*, 10(3), 137–147. <https://doi.org/10.1177/1082013204044359>
- Guerrieri, E., Niederhäusern, S. De, Messi, P., Sabia, C., Iseppi, R., Anacarso, I., & Bondi, M. (2009). Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. *Food Control*, 20(9), 861–865. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.11.001>
- Ha, J., & Ha, S. (2011). Synergistic Effects of Sodium Hypochlorite and Ultraviolet Radiation in Reducing the Levels of Selected Foodborne Pathogenic Bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(5), 587–591. <https://doi.org/10.1089=fpd.2010.0761>
- Haughton, P. N., Lyng, J. G., Cronin, D. A., Morgan, D. J., Fanning, S., & Whyte, P. (2011). Efficacy of UV Light Treatment for the Microbiological Decontamination of Chicken , Associated Packaging , and Contact Surfaces. *Journal of Food Protection*, 74(4), 565–572. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-356>
- Heng, N. C. K., Wescombe, P. A., Burton, J. P., Jack, R. W., & Tagg, J. R. (2007). The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In M. A. Riley & M. A. Chavan (Eds.), *Bacteriocins: Ecology and Evolution* (pp. 45–92). Springer-Verlag Berlin. https://doi.org/10.1007/978-3-540-36604-1_4
- Hernández- Macedo, M. L., Barancelli, G. V., & Contreras-Castillo, C. J. (2011). Microbial deterioration of vacuum-packaged chilled beef cuts and techniques for microbiota detection and characterization: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(1), 1–11. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100001>
- Holzapfel, W. H., Geisen, R., & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures , bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 343–362.
- Houtsma, P. C., de Wit, J. C., & Rombouts, F. M. (1993). Minimum inhibitory concentration (MIC) of sodium lactate for pathogens and spoilage organisms occurring in meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 20(4), 247–257. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90169-H](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90169-H)
- Huis In't Veld, J. H. J. H. I. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods:

An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01139-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01139-7)

Hussein, M. H. M., Burroughs, S., Emch, A. W., & Waite-Cusic, J. (2022). Enhancing the reduction of Salmonella and *Listeria monocytogenes* during traditional salami processing by adding a finishing phase. *Food Control*, 131(March 2021), 108432. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108432>

Hutkins, R. W. (2006). Meat fermentation. In *Microbiology and Technology of Fermented Foods* (pp. 207–232). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780470277515>

INAC. (2004). *Instituto Nacional de Carnes (INAC). Productos comerciales de la faena y desosado del ganado vacuno* (Issue 33, pp. 1–34). https://www.inac.uy/innovaportal/file/10810/1/productos_comerciales.pdf

INAC. (2021). *Anuario Estadístico 2021*. <https://doi.org/https://www.inac.uy/inac/diae/faena.html>

Intendencia Municipal de Montevideo. Resoluciones. (n.d.). *IMM*. <http://www.montevideo.gub.uy/aplicacion/resoluciones>

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (2005). Microorganisms in foods. In *Book 5*.

Isohanni, P. M. I., & Lyhs, U. (2009). Use of ultraviolet irradiation to reduce *Campylobacter jejuni* on broiler meat. *Poultry Science*, 88, 661–668. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00259>

Jay, J. M. (1996). Microorganisms in Fresh Ground Meats : the Relative Safety of Products with Low Versus High Numbers. *Meat Science*, 43(S), 59–66.

Jones, R. J. (2004). Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef. *International Journal of Food Microbiology*, 90(3), 273–282. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00310-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00310-6)

Kalchayanand, N., Bosilevac, J. M., King, D. A., & Wheeler, T. L. (2020). Evaluation of UVC radiation and a UVC-ozone combination as fresh beef interventions against Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, salmonella, and *Listeria monocytogenes* and their effects on beef quality. *Journal of Food*

Protection, 83(9), 1520–1529. <https://doi.org/10.4315/JFP-19-473>

Koohmaraie, M., Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Guerini, M., Shackelford, S. D., & Wheeler, T. L. (2005). Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. *Meat Science*, 71, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.03.012>

Koohmaraie, Mohammad. (1996). Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Science*, 43(SUPPL. 1), 193–201. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(96\)00065-4](https://doi.org/10.1016/0309-1740(96)00065-4)

Koutsoumanis, K., Stamatiou, A., Skandamis, P., & Nychas, G. J. E. (2006). Development of a microbial model for the combined effect of temperature and pH on spoilage of ground meat, and validation of the model under dynamic temperature conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), 124–134. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.124-134.2006>

Kwong, J. C., Mercoulia, K., Tomita, T., Easton, M., Li, H. Y., Bulach, D. M., Stinear, T. P., Seemann, T., & Howden, B. P. (2016). Prospective whole-genome sequencing enhances national surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(2), 333–342. <https://doi.org/10.1128/JCM.02344-15>

Labadie, J. (1999). Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Science*, 52(3), 299–305. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00006-6)

Lambert, A. D., Smith, J. P., & Dodds, K. L. (1991). Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat — a review. *Food Microbiology*, 8(4), 267–297. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(05\)80002-4](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(05)80002-4)

Laranjo, M., Elias, M., & Fraqueza, M. J. (2017). The Use of Starter Cultures in Traditional Meat Products. *Journal of Food Quality*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9546026>

Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Food Microbiology*, 55, 181–186.

Leroy, F., & De Vuyst, L. (1999). Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 974–981. <https://doi.org/10.1128/aem.65.3.974-981.1999>

- Li, M. Y., Zhou, G. H. Ā., Xu, X. L., Li, C. B., & Zhu, W. Y. (2006). Changes of bacterial diversity and main flora in chilled pork during storage using PCR-DGGE. *Food Microbiology*, 23, 607–611. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.01.004>
- Lin, K. W., & Lin, S. N. (2002). Effects of sodium lactate and trisodium phosphate on the physicochemical properties and shelf life of low-fat Chinese-style sausage. *Meat Science*, 60(2), 147–154. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00116-4](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00116-4)
- Lindqvist, R., & Lindblad, M. (2009). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in fermented sausages during maturation/storage. *International Journal of Food Microbiology*, 129(1), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.011>
- Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55(6), 645–659. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46495-0>
- Lomonaco, S., Nucera, D., & Filipello, V. (2015). The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infection, Genetics and Evolution*, 35, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.08.008>
- López, V., Villatoro, D., Ortiz, S., López, P., Navas, J., Dávila, J. C., & Martínez-Suárez, J. V. (2008). Molecular tracking of *Listeria monocytogenes* in an Iberian pig abattoir and processing plant. *Meat Science*, 78, 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.002>
- Lucke, F. (1998). *14 Fermented sausages*. 1986.
- Lyon, S. A., Fletcher, D. L., & Berrang, M. E. (2007). Germicidal Ultraviolet Light to Lower Numbers of *Listeria monocytogenes* on Broiler Breast Fillets. *Poultry Science*, 86, 964–967.
- MacDougall, D. B. (1982). Changes in the colour and opacity of meat. *Food Chemistry*, 9(1–2), 75–88. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(82\)90070-X](https://doi.org/10.1016/0308-8146(82)90070-X)
- Martín, I., Rodríguez, A., Delgado, J., & Córdoba, J. J. (2022). Strategies for Biocontrol of *Listeria monocytogenes* Using Lactic Dairy-Ripened Products. *Foods*, 11(4), 542, 1–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods11040542>
- Martinez-Silveira, A., Villareal, R., Garmendia, G., Rufo, C., & Vero, S. (2019). Yeasts, Processmconditions for rapid in situ transesterification for biodiesel

production from oleaginous yeasts. *Electronic Journal of Biotechnology*, 38, 1–9.

Mataragas, M., Alessandria, V., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2015). Management of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages using the Food Safety Objective concept underpinned by stochastic modeling and meta-analysis. *Food Microbiology*, 49, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.001>

Mataragas, M., Dimitriou, V., Skandamis, P. N., & Drosinos, E. H. (2011). Quantifying the spoilage and shelf-life of yoghurt with fruits. *Food Microbiology*, 28(3), 611–616. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.11.009>

Mataragas, M., Drosinos, E. H., Vaidanis, A., & Metaxopoulos, I. (2006). Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions. *Journal of Food Science*, 71(6). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00058.x>

Mataragas, M., Rantsiou, K., Alessandria, V., & Cocolin, L. (2015). Estimating the non-thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages relative to temperature, pH and water activity. *Meat Science*, 100, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.10.016>

Matarneh, S. K., England, E. M., Scheffler, T. L., & Gerrard, D. E. (2017). The Conversion of Muscle to Meat. In *Lawrie's Meat Science: Eighth Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100694-8.00005-4>

Maury, M. M., Tsai, Y. H., Charlier, C., Touchon, M., Chenal-Francisque, V., Leclercq, A., Criscuolo, A., Gaultier, C., Roussel, S., Brisabois, A., Disson, O., Rocha, E. P. C., Brisse, S., & Lecuit, M. (2016). Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nature Genetics*, 48(3), 308–313. <https://doi.org/10.1038/ng.3501>

McKinney, J., Williams, R. C., Boardman, G. D., Eifert, J. D., & Sumner, S. S. (2009). Dose of UV light required to inactivate *Listeria monocytogenes* in distilled water, fresh brine, and spent brine. *Journal of Food Protection*, 72(10), 2144–2150. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.10.2144>

Mclauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J., & Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in*

microbiological risk assessment of foods. 92, 15–33.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00326-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00326-X)

McLeod, A., Hovde Liland, K., Haugen, J. E., Sørheim, O., Myhrer, K. S., & Holck, A. L. (2018). Chicken fillets subjected to UV-C and pulsed UV light: Reduction of pathogenic and spoilage bacteria, and changes in sensory quality. *Journal of Food Safety*, 38(1), 2421. <https://doi.org/10.1111/jfs.12421>

McMillin, K. W. (2008). Where is MAP Going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*, 80(1), 43–65. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.028>

Meloni, D. (2015). Presence of *Listeria monocytogenes* in mediterranean-style dry fermented sausages. *Foods*, 4(1), 34–50. <https://doi.org/10.3390/foods4010034>

Mor-Mur, M., & Yuste, J. (2010). Emerging bacterial pathogens in meat and poultry: An overview. *Food and Bioprocess Technology*, 3(1), 24–35. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0189-8>

Morey, A., Mckee, S. R., Dickson, J. S., & Singh, M. (2010). Efficacy of Ultraviolet Light Exposure Against Survival of *Listeria monocytogenes* on Conveyor Belts. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(6), 737–740. <https://doi.org/10.1089=fpd.2009.0464>

MSP. (2017). *Boletín Epidemiológico Mayo 2017*. Consulta: 7 de Marzo de 2018. [https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/documentos/publicaciones/Boletín epidemiológico Mayo 2017.pdf](https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/documentos/publicaciones/Boletín%20epidemiol%C3%B3gico%20Mayo%202017.pdf)

Nielsen, J. W., Dickson, J. S., & Crouse, J. D. (1990). Use of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(7), 2142–2145. <https://doi.org/10.1128/aem.56.7.2142-2145.1990>

Nightingale, K. K., Lyles, K., Ayodele, M., Jalan, P., Nielsen, R., & Wiedmann, M. (2006). Novel method to identify source-associated phylogenetic clustering shows that *Listeria monocytogenes* includes niche-adapted clonal groups with distinct ecological preferences. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3742–3751. <https://doi.org/10.1128/JCM.00618-06>

- Novelli, E., Santo, L. D., Balzan, S., Cardazzo, B., Spolaor, D., Lombardi, A., Carraro, L., & Fasolato, L. (2017). Analysis of process factors of dry fermented salami to control *Listeria monocytogenes*. *Italian Journal of Food Safety*, 6(1), 28–32. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2017.6184>
- Nychas, G. J. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C., & Koutsoumanis, K. P. (2008). Meat spoilage during distribution. *Meat Science*, 78(1–2), 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.06.020>
- Oh, D., & Marshall, D. L. (1993). *Antimicrobial activity of ethanol , glycerol monolaurate or lactic acid against Listeria monocytogenes*. 20(92), 239–246.
- Olaoye, O. A., Onilude, A. A., & Idowu, O. A. (2011). Microbiological Profile of Goat Meat Inoculated with Lactic Acid Bacteria Cultures and Stored at 30°C for 7 days. *Food and Bioprocess Technology*, 4(2), 312–319. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0343-3>
- OPYPA. (2021). *Anuario Opypa 2020. Problemas y oportunidades de la cadena de carne porcina en Uruguay*. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-opypa-2021/anuario-opypa-2021>
- Ordóñez, J. A., Hierro, E. M., Bruna, J. M., & De La Hoz, L. (1999). Changes in the components of dry-fermented sausages during ripening. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(4), 329–367. <https://doi.org/10.1080/10408699991279204>
- Parikh, P. P., Williams, R. C., Mallikarjuan, P., Eifert, J. D., & Marcy, J. E. (2011). Concurrent use of ultraviolet light and citric acid, dimethyl dicarbonate or hydrogen peroxide to inactivate *Listeria monocytogenes* in chill brine. *Journal of Food Safety*, 31, 530–537. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2011.00331.x>
- Pellicer, K., Copes, J., Leda, G., & Zaritzky, N. (2011). Behavior of *Listeria monocytogenes* type 1 355/98 (85) in meat emulsions as affected by temperature , pH , water activity , fat and microbial preservatives. *Food Control*, 22(10), 1573–1581. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.03.013>
- Pennacchia, C., Ercolini, D., & Villani, F. (2011). Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiology*,

28(1), 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.08.010>

Pistón, M., Silva, J., Suárez, A., Belluzzi, M., laquinta, F., Panizzolo, L., Méndez, C., & Cerminara, M. (2020). Estudio del contenido de selenio en carne vacuna luego del proceso de cocción. *Innotec*, 19(19), 37–51. <https://doi.org/10.26461/19.05>

Polese, P., Del Torre, M., Spaziani, M., & Stecchini, M. L. (2011). A simplified approach for modelling the bacterial growth/no growth boundary. *Food Microbiology*, 28(3), 384–391. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.09.011>

Polese, P., Del Torre, M., & Stecchini, M. L. (2017). Prediction of the impact of processing critical conditions for *Listeria monocytogenes* growth in artisanal dry-fermented sausages (salami) through a growth/no growth model applicable to time-dependent conditions. *Food Control*, 75, 167–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.002>

Pouillot, R., & Lubran, M. B. (2011). Predictive microbiology models vs. modeling microbial growth within *Listeria monocytogenes* risk assessment: What parameters matter and why. *Food Microbiology*, 28(4), 720–726. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.06.002>

Quinto, E. J., Arinder, P., Axelsson, L., Heir, E., Holck, A., Lindqvist, R., Lindblad, M., Andreou, P., Lauzon, H. L., Marteinson, V. P., & Pin, C. (2014). Predicting the concentration of verotoxin-producing *Escherichia coli* bacteria during processing and storage of fermented raw-meat sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(9), 2715–2727. <https://doi.org/10.1128/AEM.03791-13>

Rajkovic, A., Smigic, N., & Devlieghere, F. (2010). Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 141(SUPPL.), S29–S42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.019>

Red de Seguridad Alimentaria del CONICET. (2017). *Evaluación de riesgos de L. monocytogenes en chacinados embutidos secos y salazones crudas*. <http://rsa.conicet.gov.ar/wp-content/uploads/2018/04/Informe-Final-2-ECR-Listeria-en-embutidos-y-salazones-RSA.pdf>

Rees, C. E. D., Doyle, L., & Taylor, C. M. (2017). *Listeria monocytogenes*. In *Foodborne Diseases: Third Edition* (Third Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00012-7>

Reglamento (UE) 2073. (2017). Reglamento (CE) N°2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (actualizado 2017). In *EUR-Lex. Diario Oficial de la Unión Europea*. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj/spa>

Repiso, L. (2018). Productos chacinados secos fermentados vs inocuidad. *Revista Carnes y Alimentos*, 4–14.

Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., & Capita, R. (2017). Lactic acid concentrations that reduce microbial load yet minimally impact colour and sensory characteristics of beef. *Meat Science*, 129, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.01.007>

Rosario, D. K. A., Mutz, Y. S., Castro, V. S., Bernardes, P. C., Rajkovic, A., & Conte-Junior, C. A. (2021). Optimization of UV-C light and lactic acid combined treatment in decontamination of sliced Brazilian dry-cured loin: Salmonella Typhimurium inactivation and physicochemical quality. *Meat Science*, 172(January 2020), 108308. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108308>

Ross, T., Rasmussen, S., Fazil, A., Paoli, G., & Sumner, J. (2009). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meats in Australia. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2–3), 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.007>

Ruppitsch, W., Pietzka, A., Prior, K., Bletz, S., Fernandez, H. L., Allerberger, F., Harmsen, D., & Mellmann, A. (2015). Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(9), 2869–2876. <https://doi.org/10.1128/JCM.01193-15>

Salim, A. P. A. A., Canto, A. C. V. C. S., Costa-Lima, B. R. C., Simoes, J. S., Panzenhagen, P. H. N., Costa, M. P., Franco, R. M., Silva, T. J. P., & Conte-Junior, C. A. (2017). Inhibitory effect of acid concentration, aging, and different packaging on *Escherichia coli* O157:H7 and on color stability of beef. *Journal of*

Food Processing and Preservation, 42(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.13402>

Sastry, S. K., Datta, A. K., & Worobo, R. W. (2000). Ultraviolet Light. *Journal of Food Science, Supplement*(Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies), 90–92.

Seman, D. L., Borger, A. C., Meyer, J. D., Hall, P. A., & Milkowski, A. L. (2002). Modeling the Growth of *Listeria monocytogenes* in Cured Ready-to-Eat Processed Meat Products by Manipulation of Sodium Chloride , Sodium Diacetate , Potassium Lactate , and Product Moisture Content. *Journal of Food Protection*, 65(4), 651–658. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.4.651>

Senczek, D., Stephan, R., & Untermann, F. (2000). Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 155–159.

Sentandreu, M. A., Coulis, G., & Ouali, A. (2002). Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness. *Trends in Food Science and Technology*, 13(12), 400–421. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00188-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00188-7)

Shelef, L. A. (1994). Antimicrobial effects of lactates: A review. *Journal of Food Protection*, 57(5), 445–450. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-57.5.445>

Signorini, M. L., Ponce-Alquicira, E., & Guerrero-Legarreta, I. (2006). Effect of lactic acid and lactic acid bacteria on growth of spoilage microorganisms in vacuum-packaged beef. *Journal of Muscle Foods*, 17(3), 277–290. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4573.2006.00050.x>

Skandamis, P., & Gounadaki, A. (2006). *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. In P. Ho & M. M. C. Vieira (Eds.), *Case Studies in Food Safety and Environmental Health*.

Skandamis, P. N., Yoon, Y., Stopforth, J. D., Kendall, P. A., & Sofos, J. N. (2008). Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiology*, 25(2), 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.10.008>

Snowball, M. R., & Hornsey, I. S. (1988). Purification of Water Supplies Using

Ultraviolet Light. In R. K. Robins (Ed.), *Developments in Food Microbiology* (pp. 171–191). Elsevier Applied Science Publishers. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1085-3_7

Sommers, C. H., Cooke, P. H., Fan, X., & Sites, J. E. (2009). Ultraviolet light (254 nm) inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters that contain potassium lactate and sodium diacetate. *Journal of Food Science*, 74(3), 114–119. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01081.x>

Stekelenburg, F. K., & Kant-Muermans, M. L. . (2001). Effects of sodium lactate and other additives in a cooked ham product on sensory quality and development of a strain of *Lactobacillus curvatus* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 197–203. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00521-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00521-3)

Stermer, R. A., Lasater-Smith, M., & Brasington, C. F. (1987). Ultraviolet radiation--an effective bactericide for fresh meat. *J Food Prot*, 50(2), 108–111. <http://ukpmc.ac.uk/abstract/AGR/IND87024606>

Tabla de composición de alimentos de Uruguay. (2002). *Tabla de composición de alimentos de Uruguay* (p. 34,42). Ministerio de Trabajo y Seguridad Social ; Instituto Nacional de Alimentación; Universidad de la República; Facultad de Química.

http://www.mercadomodelo.net/c/document_library/get_file?uuid=4b90584d-ab86-4546-a5c8-fca03188a4b1&groupId=10157

Tarek, A. R., Rasco, B. A., & Sablani, S. S. (2015). Ultraviolet-C Light Inactivation Kinetics of *E. coli* on Bologna Beef Packaged in Plastic Films. *Food and Bioprocess Technology*, 8(6), 1267–1280. <https://doi.org/10.1007/s11947-015-1487-y>

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V, Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). GUEST COMMENTARY Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233–2239.

Theron, M. M., & Lues, J. F. R. (2007). Organic acids and meat preservation: A

review. *Food Reviews International*, 23(2), 141–158.
<https://doi.org/10.1080/87559120701224964>

Tirloni, E., Di Pietro, V., Rizzi, G., Pomilio, F., Cattaneo, P., Bernardi, C., & Stella, S. (2019). Non-thermal inactivation of *Listeria* spp. In a typical dry-fermented sausage: “Bergamasco” salami. *Italian Journal of Food Safety*, 8(3), 168–173.
<https://doi.org/10.4081/ijfs.2019.8112>

Toldrá, F. (2014). *Handbook of Fermented Meat and Poultry Handbook of Fermented* (Second Edi). Blackwell.

Tsigarida, E., Skandamis, P., & Nychas, G. J. E. (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. *Journal of Applied Microbiology*, 89(6), 901–909.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01170.x>

U.S. Department of Agriculture (USDA), Food Safety and Inspection Service (FSIS), F. and F. A. (FDA) (2003). (2003). *Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health From Foodborne Listeria monocytogenes Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods*.
http://www.persee.fr/web/revues/home/prescript/article/perch_1021-9013_2000_num_57_1_2161

USDA. Food Safety and Inspection Service. (2022). *Salmonella Outbreaks Linked to Italian-Style Meats*.
https://www.fsis.usda.gov/sites/default/files/media_file/2022-04/FSIS-After-Action-Review-2021-09_2022-01.pdf

Vignolo, G., Saavedra, L., Sesma, F., & Raya, R. (2012). Food Bioprotection: Lactic Acid Bacteria as Natural Preservatives. In A. K. A. and G. P. Rajeev Bhat (Ed.), *Progress in Food Preservation* (First Edit, pp. 453–483). John Wiley & Sons, Ltd.

von Laer, A. E., de Lima, A. S., dos Santos Trindade, P., Andriguetto, C., Destro, M. T., & da Silva, W. P. (2009). Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in Pelotas-RS by PFGE. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 574–582.

- Wang, F. S. (2000). Effects of three preservative agents on the shelf life of vacuum packaged Chinese-style sausage stored at 20°C. *Meat Science*, 56(1), 67–71. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00022-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00022-X)
- Weaver, R. A., & Shelef, L. A. (1993). Antilisterial Activity of Sodium, Potassium or Calcium Lactate in Pork Liver Sausage. *Journal of Food Safety*, 13(2), 133–146. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1993.tb00101.x>
- Youssef, M. K., Yang, X., Badoni, M., & Gill, C. O. (2012). Effects of spray volume, type of surface tissue and inoculum level on the survival of *Escherichia coli* on beef sprayed with 5% lactic acid. *Food Control*, 25(2), 717–722. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.021>
- Zaika, L. L. (2002). Effect of organic acids and temperature on survival of *Shigella flexneri* in broth at pH 4. *Journal of Food Protection*, 65(9), 1417–1421. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.9.1417>
- Zerby, H. N., Belk, K. E., Sofos, J. N., McDowell, L. R., & Smith, G. C. (1999). Case life of seven retail products from beef cattle supplemented with alpha-tocopheryl acetate. *Journal of Animal Science*, 77(9), 2458–2463. <https://doi.org/10.2527/1999.7792458x>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zimet, P., Mombrú, Á. W., Faccio, R., Brugnini, G., Miraballes, I., Rufo, C., & Pardo, H. (2018). Optimization and characterization of nisin-loaded alginate-chitosan nanoparticles with antimicrobial activity in lean beef. *Lwt*, 91(December 2017), 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.015>

VII. ANEXOS

VII.1. Anexo I. Secuencias de los cebadores utilizados en la PCR múltiple para determinar el perfil de serotipo de *L. monocytogenes*

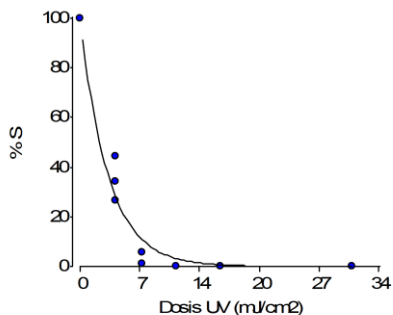
Gen objetivo	Secuencia cebador (5'-3') ^a	Tamaño producto (pb)	Especificidad serovar
<i>lmo 0737</i>	F: AGGGCTTCAAGGACTTACCC R: ACGATTTCTGCTTGCCATCC	691	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a; 1/2c; 3a y 3c
<i>lmo1118</i>	F: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R: CGGCTTGTTCCGGCATACTTA	906	<i>L. monocytogenes</i> 1/2c y 3c
<i>ORF 2819</i>	F: AGCAAAATGCCAAACTGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e
<i>ORF 2110</i>	F: AGTGGACAATTGATTGGTGAA R: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	<i>L. monocytogenes</i> 4b, 4d y 4e
<i>prs</i>	F: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAG R: CAAAGAACCTTGGATTTGCGG	370	Todas las especies de <i>Listeria</i>

^a F, forward; R, reverso

Adaptado de: Doumith et al. (2004)

VII.2. Anexo II. Gráfica de % S en función de las dosis UV-C (mJ/cm^2) para L101E3, L100A1, y la ATCC® 19111, con las ecuaciones del modelo de regresión no lineal (exponencial) y sus parámetros estadísticos

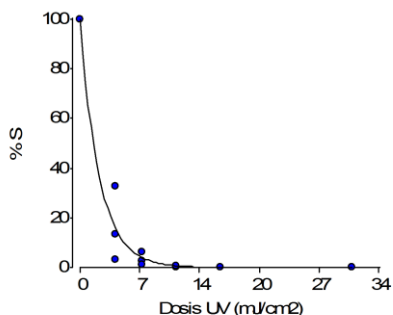
L101E3



Modelo L101 $\text{alfa} \cdot \exp(\text{beta} \cdot \text{DOSIS})$

Parámetros	Cota inf.	Cota sup.	Val.Ini.	Estimación	E.E.	T	p-valor
ALFA	-1E30	1E30	100,00	100,75	2,89	34,80	<0,0001
BETA	-1E30	1E30	-0,06	-0,13	0,01	-14,41	<0,0001

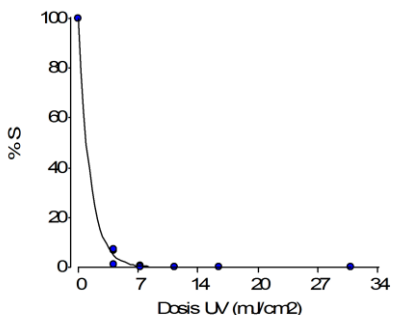
L100A1



Modelo L100 $\text{alfa} \cdot \exp(\text{beta} \cdot \text{DOSIS})$

Parámetros	Cota inf.	Cota sup.	Val.Ini.	Estimación	E.E.	T	p-valor
ALFA	-1E30	1E30	100,00	99,99	3,15	31,74	<0,0001
BETA	-1E30	1E30	-0,05	-0,20	0,02	-9,82	<0,0001

ATCC19111



Modelo ATCC $\text{alfa} \cdot \exp(\text{beta} \cdot \text{DOSIS})$

Parámetros	Cota inf.	Cota sup.	Val.Ini.	Estimación	E.E.	T	p-valor
ALFA	-1E30	1E30	100,00	100,00	0,65	152,79	<0,0001
BETA	-1E30	1E30	-0,04	-0,33	0,01	-22,86	<0,0001

VII.3. Anexo III. Matriz del diseño experimental central compuesto y respuestas observadas.

<i>Corridas</i>	<i>Ac. Láctico (% m/v)</i>	<i>Dosis UV-C (mJ/cm²)</i>	<i>Reducción L100A (log ufc/g)</i>	<i>Valor Croma¹</i>
1	2.5	398	1.59	21.48
2	0.0	165	0.62	26.90
3	2.5	0	0.38	19.14
4	2.5	0	0.63	20.25
5	2.5	165	1.20	18.69
6	5.0	330	1.74	15.02
7	5.0	330	1.34	14.51
8	5.0	0	0.58	17.34
9	2.5	165	1.53	18.73
10	0.0	0	0.04	22.57
11	2.5	165	1.43	21.61
12	2.5	398	1.45	20.61
13	0.0	165	0.82	25.24
14	6.0	165	1.49	16.60
15	0.0	0	-0.04	22.77
16	5.0	0	0.85	16.82
17	2.5	165	1.08	18.69
18	6.0	165	0.96	17.43
19	0.0	398	0.92	23.82
20	0.0	398	0.94	23.20
21	2.5	165	1.42	18.73

¹Promedio de tres valores por muestra

VII.4. Anexo IV. Matriz de diseño experimental central compuesto con los valores de L^* , a^* y b^* medidos en muestras de carne.

Corridas	% AL (m/v)	UV-C (mJ/cm ²)	L^* ^a	a^* ^a	b^* ^a
1	2.5	398	48.88	16.74	13.46
2	0.0	165	45.57	23.12	13.76
3	2.5	0	54.8	14.42	12.59
4	2.5	0	52.57	15.35	13.21
5	2.5	165	53.14	13.18	13.25
6	5.0	330	43.22	10.13	11.09
7	5.0	330	44.14	9.89	10.62
8	5.0	0	45.41	11.74	12.76
9	2.5	165	54.73	12.49	13.96
10	0.0	0	50.26	17.97	13.65
11	2.5	165	53.94	12.85	13.61
12	2.5	398	43.67	15.95	13.05
13	0.0	165	49.03	21.23	13.65
14	6.0	165	48.33	10.09	13.18
15	0.0	0	48.33	19.23	12.19
16	5.0	0	50.51	10.59	13.07
17	2.5	165	53.50	12.92	13.51
18	6.0	165	41.87	12.25	12.4
19	0.0	398	48.74	20.64	11.89
20	0.0	398	47.83	19.66	12.31
21	2.5	165	54.02	13.03	13.45

L^* , Luminosidad; a^* , intensidad de rojo; b^* , intensidad de amarillo; ^a Media de tres valores por muestra

VII.5. Anexo V. Ecuación de Baranyi & Roberts

$$\log_{10} N(t) = \log_{10} N(0) + \frac{\mu}{\ln(10)} \cdot A(t) - \frac{1}{\ln(10)} \cdot \ln \left\{ 1 + \frac{\exp[\mu \cdot A(t)] - 1}{10^{\log_{10} N(\text{final}) - \log_{10} N(0)}} \right\}$$

$N(t)$ = población de microorganismos a tiempo t (log ufc/g)

$N(0)$ = población inicial de microorganismos (log ufc/g)

μ = tasa máxima específica de crecimiento (min^{-1})

$N(\text{final})$ = población final de microorganismos (log ufc/g)

Donde $A(t)$:

$$A(t) = t + \frac{1}{\mu} \cdot \ln[\exp(-\mu \cdot t) + \exp(-\mu \cdot t_{lag}) - \exp(-\mu \cdot t - \mu \cdot t_{lag})]$$

t_{lag} = duración del período de retraso en el crecimiento o fase lag (min^{-1})

VII.6. Anexo VI. Evolución de pH y aw en salames a lo largo del proceso de fermentación y secado.

<i>T</i> _{ferm} (°C)	Calibre (cm)	<i>T</i> _{secado} (°C)	Parámetro	Día 0	Día 1	Día 2	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
27	9.15	17	pH	6.07 ± 0.06	5.53 ± 0.08	4.96 ± 0.05*	4.87 ± 0.02	4.80 ± 0.04	4.97 ± 0.03	5.09 ± 0.06
			aw	0.928 ± 0.001	-	0.927 ± 0.001*	0.902 ± 0.004	0.897 ± 0.005	0.893 ± 0.004	0,852 ± 0.007
30	5.1	17	pH	6.16 ± 0.06	5.59 ± 0.08	5.01 ± 0.05 *	4.88 ± 0.02	4.83 ± 0.04	5.02 ± 0.03	5.14 ± 0.04
			aw	0.939 ± 0.006	-	0.930 ± 0.009*	0.906 ± 0.002	0.881 ± 0.002	0.852 ± 0.004	0,840 ± 0.005
24	5.1	17	pH	6.10 ± 0.03	5.93 ± 0.00	5.18 ± 0.01	4.91 ± 0.03*	5.16 ± 0.12	5.30 ± 0.05	5.31 ± 0.06
			aw	0.950 ± 0.006	-	0.940 ± 0.013	0.921 ± 0.011*	0.892 ± 0.000	0.886 ± 0.017	0,864 ± 0.006
30	13.2	17	pH	6.17 ± 0.03	5.44 ± 0.11	4.90 ± 0.02 *	4.87 ± 0.04	4.95 ± 0.02	4.97 ± 0.01	4.96 ± 0.06
			aw	0.939 ± 0.006	-	0.930 ± 0.001*	0.917 ± 0.001	0.914 ± 0.001	0.906 ± 0.000	0,897 ± 0.003
24	13.2	17	pH	6.10 ± 0.03	6.04 ± 0.01	5.27 ± 0.04	4.87 ± 0.01*	4.83 ± 0.00	4.94 ± 0.00	5.04 ± 0.03
			aw	0.940 ± 0.001	-	0.926 ± 0.006	0.923 ± 0.001*	0.909 ± 0.004	0.902 ± 0.002	0,900 ± 0.002
24	9.15	14	pH	6.23 ± 0.01	6.17 ± 0.04	5.39 ± 0.00	5.10 ± 0.01	4.98 ± 0.01	5.00 ± 0.02	5.12 ± 0.01
			aw	0.9353 ± 0.006	-	0.954 ± 0.001	0.886 ± 0.000*	0.876 ± 0.000	0.865 ± 0.001	0,843 ± 0.003
30	9.15	14	pH	6.28 ± 0.08	5.47 ± 0.11	4.93 ± 0.09	5.02 ± 0.01	5.12 ± 0.04	5.21 ± 0.01	5.29 ± 0.02
			aw	0.950 ± 0.002	-	0.946 ± 0.001	0.877 ± 0.001*	0.865 ± 0.001	0.864 ± 0.001	0,852 ± 0.001
27	13.2	14	pH	6.13 ± 0.01	6.00 ± 0.01	5.17 ± 0.04	5.01 ± 0.00	4.93 ± 0.06	5.04 ± 0.00	5.16 ± 0.01
			aw	0.930 ± 0.001	-	0.928 ± 0.006	0.884 ± 0.002*	0.889 ± 0.001	0.885 ± 0.001	0,800 ± 0.002
27	5.1	14	pH	6.13 ± 0.01	5.77 ± 0.04	5.06 ± 0.01	5.05 ± 0.02	4.98 ± 0.01	5.20 ± 0.06	5.31 ± 0.01
			aw	0.930 ± 0.001	-	0.927 ± 0.003	0.872 ± 0.001*	0.860 ± 0.002	0.849 ± 0.001	0,833 ± 0.004

*T*_{ferm}, Temperatura de fermentación; *T*_{secado}, Temperatura de secado; aw, actividad de agua

* Primer tiempo de medida en el cual los salames alcanzaron valores de pH y/o aw restrictivos para el crecimiento de *L. monocytogenes*


VII.7. Anexo VII. *Publicaciones*

Como resultado de este trabajo surgieron dos artículos científicos:

- Brugnini, G., Acquistapace, M. J., Rodríguez, S., & Rufo, C. (2018). Efecto de la aplicación de ácido láctico sobre *Listeria monocytogenes* en carne envasada al vacío en Uruguay. *INNOTEC*, 15(15), 7–14. <https://doi.org/10.26461/15.06>.
- Brugnini, G., Rodríguez, S., Rodríguez, J., & Rufo, C. (2021). Effect of UV-C irradiation and lactic acid application on the inactivation of *Listeria monocytogenes* and lactic acid bacteria in vacuum-packaged beef. *Foods*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/foods10061217>.

Article

Effect of UV-C Irradiation and Lactic Acid Application on the Inactivation of *Listeria monocytogenes* and Lactic Acid Bacteria in Vacuum-Packaged Beef

Giannina Brugnini ^{1,2} , Soledad Rodríguez ¹, Jesica Rodríguez ¹ and Caterina Rufo ^{1,*}

¹ Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República, By Pass de Pando y Ruta 8, Pando 91000, Uruguay; gbrugnini@fq.edu.uy (G.B.); srodriguez@fq.edu.uy (S.R.); jsrodriguez@fq.edu.uy (J.R.)

² Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, General Flores 2124, Montevideo 11800, Uruguay

* Correspondence: crufo@fq.edu.uy; Tel.: +598-2-292-2021

Abstract: The objective of this study was to test the effect of the combined application of lactic acid (0–5%) (LA) and UV-C light (0–330 mJ/cm²) to reduce *Listeria monocytogenes* and lactic acid bacteria (LAB) on beef without major meat color (L*, a*, b*) change and its impact over time. A two-factor central composite design with five central points and response surface methodology (RSM) were used to optimize LA concentration and UV-C dose using 21 meat pieces (10 g) inoculated with *L. monocytogenes* (LM100A1). The optimal conditions were analyzed over 8 weeks. A quadratic model was obtained that predicted the *L. monocytogenes* log reduction in vacuum-packed beef treated with LA and UV-C. The maximum log reduction for *L. monocytogenes* (1.55 ± 0.41 log CFU/g) and LAB (1.55 ± 1.15 log CFU/g) with minimal impact on meat color was achieved with 2.6% LA and 330 mJ/cm² UV-C. These conditions impaired *L. monocytogenes* growth and delayed LAB growth by 2 weeks in vacuum-packed meat samples throughout 8 weeks at 4 °C. This strategy might contribute to improving the safety and shelf life of vacuum-packed beef with a low impact on meat color.

Keywords: beef; lactic acid; UV-C; *Listeria monocytogenes*; LAB; response surface methodology



Citation: Brugnini, G.; Rodríguez, S.; Rodríguez, J.; Rufo, C. Effect of UV-C Irradiation and Lactic Acid Application on the Inactivation of *Listeria monocytogenes* and Lactic Acid Bacteria in Vacuum-Packaged Beef. *Foods* **2021**, *10*, 1217. <https://doi.org/10.3390/foods10061217>

Academic Editors: Huerta-Leidenz Nelson and Markus F. Miller

Received: 1 May 2021
Accepted: 19 May 2021
Published: 28 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Listeria monocytogenes is a human pathogen that may cause listeriosis, a foodborne infection with a low morbidity and a high mortality rate (20–30%) [1]. The presence of *L. monocytogenes* in raw meat does not cause major public health problems since meat is generally consumed after cooking at temperatures above 70 °C. However, contaminated raw meat when used as raw material for food products that in their production process fail to eliminate the pathogen may present a safety risk [1]. In addition, the presence of *L. monocytogenes* in raw meat constitutes restrictions on international trade.

Contamination of meat with *Listeria monocytogenes* is a consequence of the production process [2]. In addition, *L. monocytogenes* can survive and grow in vacuum-packed meat cuts stored at temperatures between 0 and 4 °C; therefore, different strategies are applied in abattoirs to minimize bacterial contamination [3,4]. Among the different strategies, lactic acid (LA) application is accepted because it does not present risks to consumer health. The maximum concentration of LA allowed is 5% (m/v) [5]. UV-C light irradiation (UV-C) stands out for its low cost, non-generation of potentially hazardous chemical residues, and low carbon footprint [6]. In addition, UV-C irradiation is an FDA-approved intervention for surface decontamination of foods [7] (FDA, 2019a).

The application of between 2 and 4% LA on meat was reported to reduce *L. monocytogenes* counts on beef surface [8,9]. Reductions between 0.79 to 1.31 log CFU/cm² were obtained in fresh beef when LA was applied from 1% to 4% [9]. Different levels of

L. monocytogenes reductions have been observed and were associated with factors such as variabilities among strain sensitivity towards stress and forms of LA application [10,11].

UV-C radiation (200 to 280 nm) has been used for decontamination of food surfaces [12]. The ability of UV-C to inactivate *L. monocytogenes* has also been reported, being strain dependent and showing a direct correlation between UV-C dose and *Listeria monocytogenes* reduction [13–15]. In addition, UV-C radiation can penetrate the packaging material usually used on meat and meat products such as transparent polypropylene and polyethylene bags [16] and cause significant *L. monocytogenes* reduction on food [13].

Antimicrobial interventions may affect fresh meat color, which is considered to be the single most important characteristic influencing consumer's purchase decisions [17,18]. Negative effects on meat color are the major problem associated with the use of lactic acid, especially at high concentration [19]. In contrast, UV-C (118–590 mJ/cm²) on fresh meat does not appear to cause detrimental color changes [15].

Other bacteria present on the beef surface may be affected by LA and UV-C [15,20]. In refrigerated vacuum-packed meat, lactic acid bacteria (LAB) are the ones that develop the most, being responsible for the production of strong lactic acid off-odors when counts reach 10,000,000 UFC/g at the end of shelf life [21–23]. Thus, knowing the effect of LA and UV-C application on LAB may be relevant to improve vacuum packed beef shelf life.

In the past few years, special attention has been given to experimental design and response surface methodology (RSM) to optimize conditions in different systems [24,25]. These modeling tools enable the study of the simultaneous effects of different factors and their interactions on experimental characteristics. This strategy has not been widely used to study the effects of the LA and UV-C combination on vacuum-packed beef. To date, only one report was found describing a similar strategy to study the effects of LA and UV-C on *Salmonella typhimurium* reduction on sliced Brazilian dry-cured loin [26].

In the present work, it was hypothesized that the combined application of LA at low concentrations and UV-C after vacuum packaging might achieve a significant level of reduction in *L. monocytogenes* contamination on beef with a minimal impact on meat color and would contribute to its shelf life by reducing meat LAB counts. To test this hypothesis, a two-factor central composite design and response surface methodology (RSM) were used to optimize the concentration of LA and the UV-C dose applied to vacuum-packed meat that will reduce the amount of *L. monocytogenes* and LAB without significant effects on meat color.

2. Materials and Methods

2.1. Meat Samples

Eye of round (*Semitendinosus Muscle*) cuts were obtained from a local abattoir. Meat samples were not decontaminated prior to the study. Meat was cut by hand into square pieces of 10 g measuring 5 × 5 cm². Each piece was individually inoculated with *L. monocytogenes* and treated according to the experimental design.

2.2. *L. monocytogenes* Culture Preparation

A strain of *L. monocytogenes* (LM 100A1) previously isolated and characterized in our laboratory was used for this study [27]. The culture was prepared by growing LM 100A1 overnight at 35 °C, to the stationary phase, in tryptic soy broth (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) supplemented with 0.6% yeast extract (Oxoid Ltd., Hampshire, UK). The overnight culture was diluted with butterflied buffer to 6.1 log CFU/mL.

2.3. Preparation of Lactic Acid Solution

The lactic acid solutions were prepared by diluting a concentrated lactic acid solution (85% *m/v*) (PURAC[®], Corbion, Montevideo, Uruguay) with sterilized distilled water to make 2.5%, 5.0% and 6.0% (*m/v*) lactic acid solution. Fresh solutions were prepared prior to each test.

2.4. UV-C Irradiation

The specifications of the UV-C lamp used were: 30 W T6 tubular 254 nm with UV germicidal lamp (Code ZW30S19W-Z894, Cnlight Co., Ltd., Guangdong, China), diameter 19 mm, length 894 mm and UV intensity at one meter of 107 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$. Intensity at the application distance was 3.137 mW/cm^2 measured with a ZED Smart Meter s/N 800,009 (EN61326-1-2013) and the reference sensor D-SICONORM-LP-REF-500 W/m^2 .

Before each trial, the UV-C lamp was preheated for 20 min to stabilize the UV-C emission. UV-C treatments did not increase the surface temperature of the meat to greater than 20 °C.

2.5. Experimental Design

A two-factor central composite design with five central points, 2 replicates of factorial points and 2 replicates of axial points were used. The experimental design matrix and all data analysis were performed using Design-Expert® (Version 10, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA). The independent variables were lactic acid concentration (X_1) and UV-C dose (X_2), and the dependent variables or response variables were *L. monocytogenes* (LM) log reduction (Y_1), Lactic Acid Bacteria (LAB) log reduction (Y_2), and Chroma value (Y_3). The design matrix consisted of 21 experimental runs including 8 factorial points and 8 axial points with five replicates at the center point (Table 1). Observed responses were fitted to first order, second order and quadratic models. Models were selected by the Sequential Sum of Square Method and assessed based on statistically significant coefficients and R^2 values using ANOVA technique, with a significance level of $\alpha = 0.05$. For each response variable (Y), a second-order polynomial model equation was defined:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 \quad (1)$$

where Y is the measured response of the dependent variables, X_1 and X_2 are the independent variables, β_0 is the intercept, β_1 and β_2 are the linear coefficients, β_{11} and β_{22} are the squared coefficients, and β_{12} is the interaction coefficient.

Table 1. Central composite experimental design matrix and observed responses.

Runs	% Lactic Acid (m/v) (X_1)	UV-C Dose (mJ/cm ²) (X_2)	Reduction LM (Log CFU/g) (Y_1)	Reduction LAB (Log CFU/g) (Y_2)	Chroma Value (Y_3) ^a
1	2.5	398	1.59	2.44	21.48
2	0.0	165	0.62	0.66	26.90
3	2.5	0	0.38	0.45	19.14
4	2.5	0	0.63	0.59	20.25
5	2.5	165	1.20	1.13	18.69
6	5.0	330	1.74	1.14	15.02
7	5.0	330	1.34	1.70	14.51
8	5.0	0	0.58	1.48	17.34
9	2.5	165	1.53	1.11	18.73
10	0.0	0	0.04	0.08	22.57
11	2.5	165	1.43	2.25	21.61
12	2.5	398	1.45	1.67	20.61
13	0.0	165	0.82	0.15	25.24
14	6.0	165	1.49	2.24	16.60
15	0.0	0	−0.04	−0.08	22.77
16	5.0	0	0.85	2.06	16.82
17	2.5	165	1.08	1.39	18.69
18	6.0	165	0.96	1.63	17.43
19	0.0	398	0.92	0.49	23.82
20	0.0	398	0.94	1.12	23.20
21	2.5	165	1.42	1.94	18.73

^a Mean of three values per sample.

Response surface methodology (RSM) included the generation of 3D response surface and contour plots to study the overall relationships and interactions between independent variables and response factors.

2.6. Sample Treatments

According to the experimental design, 21 pieces of 10 g of meat were inoculated with 5.8 log of CFU of the strain LM100A1. Then, 500 μ L of the inoculum were disposed on the meat surface and spread with a bent glass rod.

After 10 min, inoculated meat pieces were treated with 1.5 mL of lactic acid solutions from 0 to 6 (*m/v*) %. The LA was disposed on the inoculated side, drop by drop covering the entire surface of the meat samples. Then the samples were vacuum packaged in a multi-laminar (EVA, PVDC, PE) thermo-shrinkable bag with a 76% UV-C transmission rate (Cryovac[®] BB 2620; 50 μ m thick, oxygen permeability of 20 $\text{cm}^3 \text{m}^{-2}$, 24 h, at 23 °C, and 75% RH; and maximum carbon dioxide permeability of 100 $\text{cm}^3 \text{m}^{-2}$, 24 h, at 23 °C, and 75% RH) by use of a vacuum-packaging machine SAMMIC model V-410SGI (Spain).

After packaging, each side of the samples were exposed to 3.137 mW/cm^2 , at 7 cm from the emitting lamp, for 53, 105 and 127 s, achieving doses of UV-C of 165, 330 and 398 mJ/cm^2 respectively. The UVC-dose range was selected considering the reported UV-C doses applied on beef that did not affect meat color [15], the application conditions, distance from the lamp and duration of the exposures, to be easily implementable in industrial production lines. A second set of samples was prepared for color measurements.

2.7. Microbiological Analyses

After treatments, samples were homogenized in sterile bags with 90 mL of Butterfield buffer, appropriate dilutions were plated by duplicate on PALCAM Listeria Selective Agar (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) incubated at 37 °C for 48 h for *L. monocytogenes* and on MRS Agar (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) incubated anaerobically at 30 °C for 72 h for LAB. Colonies were counted and log transformed. Log reductions of *L. monocytogenes* and LAB per gram of meat compared to samples with no treatments were calculated.

2.8. Instrumental Color

At twenty-four hours post treatments, color measurements were performed 30 min after opening the packages. Instrumental lean color (CIE L*: brightness, a*: redness and b*: yellowness) was measured with a Minolta chromameter CR-400 (Konica Minolta Sensing Inc., Tokyo, Japan) using a C illuminant, a 2° standard observer angle and 8 mm aperture size, and calibrated with a white tile before use. Three measurements from each sample were taken and the mean value was calculated. Chroma value was calculated as $C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})}$.

2.9. Optimization and Model Validation

The optimized conditions, lactic acid concentration and UV-C dose, were obtained by applying the following constraints on the response factors: (i) to maximize *L. monocytogenes* log reduction; (ii) to maximize LAB log reduction; and (iii) Chroma value > 20, according to MacDougall, et al. 1982 [28] (values above 20 indicate bright red beef).

To validate the proposed model, three experiments were carried out using the optimized conditions as the checkpoint. Experimental responses (log reduction of LM100A1 per gram and log reduction of LAB per gram) of the checkpoint were compared to the predicted results from the fitted models to evaluate the precision of the polynomial equations.

2.10. Evolution of *L. monocytogenes*, LAB, pH and Instrumental Color of LA/UV-C Treated Meat Vacuum Packed and Stored at 4 °C for 8 Weeks

Three experiments were carried out using the optimized conditions (LA 2.6% (*w/v*) and UV-C 330 mJ/cm^2). Meat samples were treated as explained in 2.6., untreated samples were used as a control group. Samples were stored at 4 °C and analyzed for LM, LAB at initial time (week 0) and every two weeks until week 8. Instrumental color was measured at week 0 and week 8. An additional set of samples was prepared for pH determination using a Hanna[®] model 9025c pH meter with a surface electrode (HI1413B). The T-test

was used to compare the data for control and LA/UV-C samples. Data were expressed as mean \pm standard deviation. Significance was determined at the $p < 0.05$ level.

3. Results

3.1. Central Composite Design and Response Surface

L. monocytogenes log reduction (Y_1) varied from no reduction to 1.74 log CFU/g, and LAB log reduction (Y_2) varied from none to 2.44 log CFU/g. The Chroma value (Y_3) ranged from 14.51 to 26.90 (Table 1). The analysis of variance (ANOVA) indicates that the best-fitted model ($p < 0.0001$) for *L. monocytogenes* log reduction was the quadratic model, and for LAB log reduction and meat color the best fitted model was the linear (Table 2).

Table 2. Summary of the regression analysis of the three responses.

Response	Model	Significance	R^2	Adjusted R^2	Predicted R^2	Adequate Precision
Y_1	Quadratic	<0.0001	0.9038	0.8718	0.8111	16.646
Y_2	Linear	<0.0001	0.5774	0.5304	0.4329	9.563
Y_3	Linear	<0.0001	0.8002	0.7780	0.7314	14.571

For *L. monocytogenes* log reduction (Y_1), the quadratic model had a significance of $p < 0.0001$ and an R^2 value of 0.9038, explaining 90.38% of the variability in the response. The similarity between the R^2 and adjusted R^2 values showed the adequacy of the model to predict the corresponding response. The resulting signal-to-noise ratio, measured by the term “adequate precision” (above 4), indicated that the model could be used to navigate the design space (Table 2). The lack of fit of the quadratic model was not significant ($F = 0.26$, $p = 0.8522$).

For LAB log reduction (Y_2), the linear model had a significance of $p < 0.0001$, an R^2 value of 0.5774 similar to the adjusted R^2 , and a non-significant lack of fit ($F = 2.43$, $p = 0.0903$). However, the low R^2 value (Table 2) indicates that the model has low precision in the predictions.

The adjusted linear model for meat color (Y_3) had a significance of $p < 0.0001$ with an R^2 value of 0.8002, similar to the adjusted R^2 (Table 2). The lack of fit of this model was significant ($F = 6.74$, $p = 0.0026$), suggesting that besides LA and UV-C, there are other factors affecting meat color that were not considered in the experimental design.

For *L. monocytogenes* and LAB log reduction, both LA and UV-C were significant factors. For color, UV-C was not a significant factor in our system. The generated equations for each response, including only the terms with statistical significance ($p < 0.05$), were as follows (Equations (2)–(4)):

$$Y_1 = -0.033819 + 0.35890 X_1 + 6.054 \times 10^{-3} X_2 - 0.043525 X_1^2 - 9.17 \times 10^{-6} X_2^2 \quad (2)$$

$$Y_2 = 0.24423 + 0.24127 X_1 + 2.04052 \times 10^{-3} X_2 \quad (3)$$

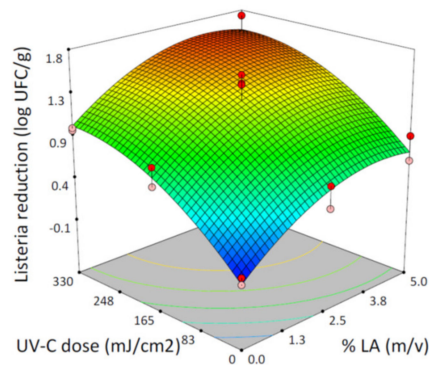
$$Y_3 = 23.63579 - 1.41044 X_1 \quad (4)$$

The 3D response surface plots allow one to visualize the response in the design space (Figure 1). Both LA and UV-C in the ranges studied have a positive effect on LM 100A1 and LAB reduction (Figure 1a,b). For *L. monocytogenes* reduction the 3D response surface plot reflects a curvature according to the quadratic terms in the equation model (Figure 1a). The LAB 3D response surface plot does not present curvature (Figure 1b).

Design-Expert® Software

Listeria reduction
 1.73576
 -0.0367887

X1 = A: LA
 X2 = B: UV-C dose

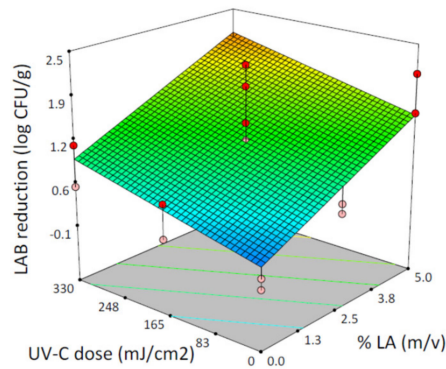


(a)

Design-Expert® Software

LAB reduction
 2.44121
 -0.079487

X1 = A: LA
 X2 = B: UV-C dose

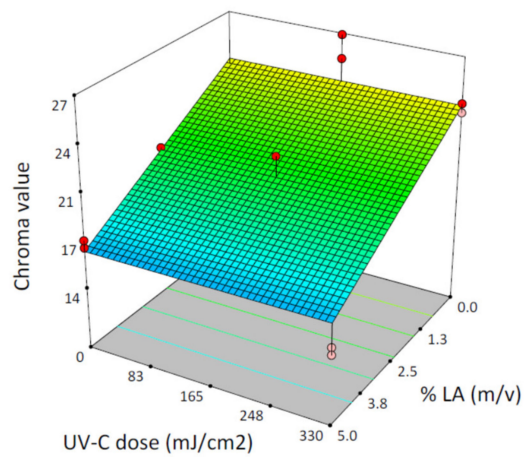


(b)

Design-Expert® Software

Chroma value
 26.9049
 14.5119

X1 = A: LA
 X2 = B: UV-C dose



(c)

Figure 1. 3D response surface plots generated from the Central Composite design showing: (a) effect of lactic acid concentration and UV-C dose on *L. monocytogenes* reduction (log CFU/g); (b) effect of lactic acid concentration and UV-C dose on LAB reduction (log CFU/g); (c) effect of lactic acid concentration and UV-C dose on meat color (expressed as Chroma value).

For Chroma value according to Equation (4), the 3D response surface plot showed no changes in Chroma value due to UV-C and a negative effect by LA (Figure 1c).

3.2. Optimization and Model Validation

Based on the model generated using the Design Expert software with a desirability factor close to 1, the optimal conditions that satisfy the constraints applied (maximize *L. monocytogenes* reduction; maximize LAB reduction; Chroma value > 20) were: 2.6% lactic acid solution and UV-C dose of 330 mJ/cm². Using these conditions, the model predicted a *L. monocytogenes* reduction of 1.55 ± 0.41 log CFU/g and a LAB reduction of 1.55 ± 1.15 log CFU/g.

Experimental responses using the optimal conditions to treat meat samples were compared to the predicted results from the fitted models to evaluate the precision of the polynomial equations. The experimental values for *L. monocytogenes* and LAB reduction were 1.24 ± 0.18 log CFU/g and 1.20 ± 0.20 log CFU/g respectively. Both *L. monocytogenes* and LAB reduction experimental values were within the 95% CI of the predicted outcome by the models.

3.3. Evolution of *L. monocytogenes*, LAB, pH and Meat Color Treated with 2.6% of LA and 330 mJ/cm² of UV-C Dose Vacuum Packed and Stored at 4 °C for 8 Weeks

3.3.1. *L. monocytogenes* and LAB Counts

Application of 2.6% of LA and 330 mJ/cm² of UV-C reduced *L. monocytogenes* and LAB initial log counts by 1.2 and 1.3 log compared to control. Treated meat samples had *L. monocytogenes* and LAB log counts significantly lower ($p < 0.05$) than the control samples throughout the 8 weeks (Figure 2a,b). *L. monocytogenes* counts in LA/UV-C treated meat decreased from 3.6 log to 3.0, while in control samples an increase from 4.86 to 7.38 log CFU/g was observed (Figure 2a). LAB counts in treated samples remained constant until week 4 ($p > 0.05$), then an increase was observed at week 6, reaching 6.89 log CFU/g in week 8. In control samples, LAB counts remained unchanged during the first two weeks, and then increased over time up to 7.85 log CFU/g (Figure 2b).

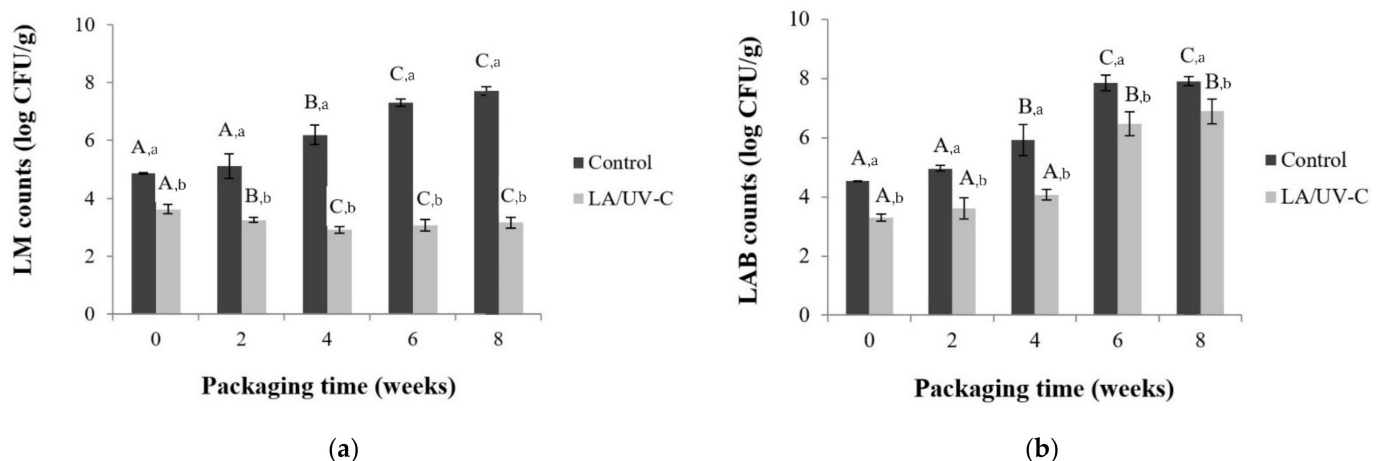


Figure 2. Bacterial count evolution in vacuum packed meats stored at 4 °C (a) *L. monocytogenes* (LM) (b) Lactic Acid Bacteria (LAB). Light grey and dark grey represent samples treated with 2.6% of LA/330 mJ/cm² of UV-C and no treatment control, respectively. Mean ± SD ($n = 3$) of the values are presented. Different capital letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$ among the means over time for each treatment, and different small letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$ between control and treated samples for each time point.

3.3.2. pH Values

LA/UV-C treatment decreased ($p < 0.05$) superficial meat pH from 5.78 to 3.70. Then, the treated sample's pH increased, reaching 5.29 at week 2. After week 2, the superficial pH

of treated and untreated samples decreased over time. The pH value of LA/UV-C treated meat was always lower ($p < 0.05$) than the control. The final pH for control samples was 5.55 and for treated samples was 5.07 (Figure 3).

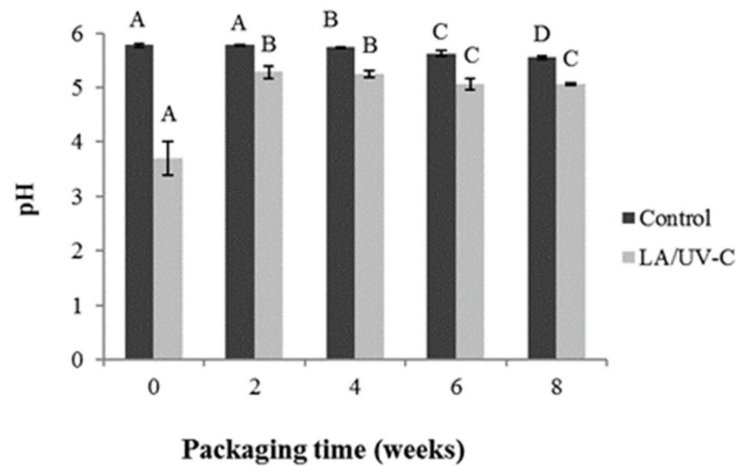


Figure 3. Superficial pH evolution in vacuum packed meats stored at 4 °C. Light grey and dark grey represent samples treated (2.6% of LA and 330 mJ/cm² of UV-C) and control, respectively. Mean \pm SD ($n = 3$) of the values are presented. Different letters indicate a significant difference at $p \leq 0.05$ across time for each treatment.

3.3.3. Color Measurements

Changes in CIE L*, a*, b* and Chroma values (C*) at weeks 0 and 8 are shown in Table 3. At the initial time, L*, b* and C* values of LA/UV-C treated and untreated meat did not show variations from each other ($p > 0.05$); the a* value of control meat was higher ($p < 0.05$) than the value of LA/UV-C treated meat. At week 8, treated and untreated meat had non-significant differences in b* and C* values. However, the L* and a* values of LA/UV-C treated meat were lower ($p < 0.05$) than the control.

Table 3. Instrumental color parameters (L*, a*, b*) measured and Chroma value (C*) treated LA/UV-C and control meat samples at initial time and at 8 weeks.

Time (Weeks)		Control	LA/UV-C
0	Lightness (L*)	47.69 \pm 2.94 ^a	46.71 \pm 3.51 ^a
	Redness (a*)	20.21 \pm 2.85 ^a	15.43 \pm 1.92 ^b
	Yellowness (b*)	13.07 \pm 0.77 ^a	13.36 \pm 0.63 ^a
	Chroma (C*)	24.10 \pm 2.48 ^a	20.44 \pm 1.56 ^a
8	Lightness (L*)	46.94 \pm 2.71 ^a	40.95 \pm 1.81 ^b
	Redness (a*)	13.53 \pm 1.63 ^a	9.92 \pm 0.69 ^b
	Yellowness (b*)	11.08 \pm 0.27 ^a	11.62 \pm 0.56 ^a
	Chroma (C*)	17.52 \pm 1.14 ^a	15.28 \pm 0.66 ^a

Different superscripts within a row show significant results ($p \leq 0.05$). Data recorded as Mean \pm Standard Deviation.

For both control and LA/UV-C treated meat, CIE L*, a*, b* and C* values were lower ($p < 0.05$) at 8 weeks compared to values at week 0, except the L* value of control samples that showed no significant change ($p > 0.05$).

4. Discussion

The present study shows for the first time the effect of the combined application of LA and UV-C on *L. monocytogenes* and LAB in vacuum-packed beef. A central composite design and Response Surface Methodology were used to optimize the concentration of LA and the dose of UV-C to reduce the population of *L. monocytogenes* and LAB without major changes in meat color.

The major findings of the present study were: (i) the quadratic model obtained allowed us to predict *L. monocytogenes* log reduction in vacuum-packed beef treated with LA and UVC, (ii) the maximum log reduction for both *L. monocytogenes* (1.55 ± 0.41 log CFU/g) and LAB (1.55 ± 1.15 log CFU/g) with minimal impact on meat color was achieved with the application of 2.6% LA and 330 mJ/cm² UV-C, and (iii) under these conditions, there was no increase in *L. monocytogenes* counts over 8 weeks of storage at 4 °C, and LAB growth was delayed by 2 weeks compared to control samples.

In the present study, the quadratic model obtained for predicting inoculated *L. monocytogenes* reduction had a good predictor value ($R^2 = 0.9038$). Both LA (0–5%) and UVC (0–330 mJ/cm²) were significant ($p < 0.05$) factors and had independent effects (no significant interaction ($p > 0.05$)). The non-significant interaction between the factors indicated that the effects were additive, observed also for *Salmonella* inactivation in a different food matrix [26]. The reduction in *L. monocytogenes* increased as LA concentration and UV-C dose increased. According to the model, the combination of the maximum levels of LA (5.0%) and UV-C (330 mJ/cm²) reduced the 5.8 log inoculum by 1.73 log, a fraction of viable microorganisms remained in the sample, indicating the presence of a tailing effect. This is depicted in the 3D Response Surface plot (Figure 1a), where *L. monocytogenes* log reduction had an initial sharp increasing rate and then decreased at higher UV-C doses and LA concentrations. As mentioned before, there are no other studies reporting the combined action of LA and UV-C on *Listeria monocytogenes* in fresh meat, although similar inactivation patterns were observed in fresh beef treated separately with LA or with UV-C [9,15,27]. In this respect, a previous study from our group obtained a reduction of 1.13 log using 2.5% LA. DeGeer et al. 2016, using a 4% LA solution, reduced by 1.3 log a *L. monocytogenes* inoculum of 8 log and, Kalchayanand et al. 2020, using a 590 mJ/cm² UV-C dose, reduced a 6 log *L. monocytogenes* inoculum by 0.89 log. The observed tailing effect for *L. monocytogenes* inactivation in meat may be explained by the ability of the meat matrix to buffer the antimicrobial solution and to entrap *L. monocytogenes* into muscle fibers shielding the bacteria from LA and UV-C radiation [9,29].

LAB reduction by LA and UV-C was adjusted to a linear model in which the factors LA and UV-C were both significant ($p < 0.05$) and independent (no significant interaction ($p > 0.05$)). The low precision ($R^2 = 0.5774$) of the model for predicting the response in the design space was a consequence of the variability among the five replicas of the central point (Table 1). This variability may be attributed to the natural diversity of the LAB present in the meat samples, which may have different sensitivity to LA and UV-C [14,20]. The maximum level of LAB reduction matched with the highest LA concentration and UV-C dose used suggesting that both factors can be further increased to achieve a higher level of reduction as shown in the 3D Response Surface plot (Figure 1b).

However, it was not feasible to increase LA concentration because (i) regulations of USDA/FSIS and European Commission do not allow concentrations greater than 5%, and (ii) high LA concentrations produced unwanted color changes in meat. Regarding increasing the UV-C dose, our data suggested that an increase in UV-C dose would not achieve a larger reduction in the *Listeria monocytogenes* population. Though our model did not allow us to predict outside the design space, the level of *L. monocytogenes* reduction obtained at the + α experimental point applying 2.5% LA and 368 mJ/cm² (Table 1) was similar to the level of reduction achieved with 2.5% LA and 330 mJ/cm². In agreement with this observation, McLeod, et al., 2017 [29] reported that the application of 3 J/cm² did not increase the level of *Listeria monocytogenes* reduction in chicken breast beyond the reduction level obtained with 0.3 J/cm². The antilisterial effect of doses higher than 330 mJ/cm² combined with 2.5% LA needs to be further studied, as well as the effects on meat quality.

Meat color change, expressed as Chroma value, was only related to LA acid concentration, and was fitted to a linear model with one factor (Figure 1c). Chroma value detrimental change was mostly due to the decrease in redness value (a*) (Table S1, Supplementary File), a well-known effect of lactic acid in beef [19]. The fact that UV-C doses applied did not have a significant effect on fresh meat color was in agreement with previous studies [15].

Using the models obtained for each response (*L. monocytogenes* reduction, LAB reduction and Color), RSM predicted that 2.6% LA concentration and 330 mJ/cm² of UV-C dose were the conditions that combined satisfied the constraints imposed (highest *L. monocytogenes* and LAB reduction and chroma value equal or larger than 20). The *L. monocytogenes* reduction predicted was 1.55 log. This reduction level was higher than the reduction levels obtained with the highest LA concentration or the highest UV-C dose alone.

Treatment with 2.6% LA and UV-C of 330 mJ/cm² at the time of packaging prevented the surviving fraction of the inoculated population of *L. monocytogenes* from thriving, showing a tendency to decrease with time when stored at 4 °C. In the untreated samples, the counts of *L. monocytogenes* increased (Figure 2a). LA and UV-C caused cellular injury in the fraction of survivors preventing them from overcoming the additional stress imposed by low oxygen and temperature. There are no reports of the combined application though a similar trend was reported for *L. monocytogenes* over time in beef treated with LA [27,30]. Regarding the behavior of *L. monocytogenes* in control samples, previous studies reported both growth [31,32] and inhibition [27,30,33] during storage at 4 °C. Differences in *L. monocytogenes* behavior may be due to variations in experimental conditions such as moisture and pH of meat samples, oxygen permeability of the vacuum bags and the *L. monocytogenes* strains used. In this study, the strain used was isolated from a refrigerated environment after having suffered different types of stress which, according to Skandamis et al., 2008, may affect subsequent stress tolerance.

LAB followed a sigmoidal growth curve [22]. Treatment prolonged the lag phase by two weeks, probably because a fraction of the remaining living cells were injured by UV-C and would have a slower growth rate or would be unable to replicate under stress [14]. The final LAB count in control samples reached 8 Log while in the samples treated with LA/UV-C reached 7 Log. Though these results were relevant, more studies are needed to understand the impact on the combined LA/UV-C application on meat shelf life.

At time zero, redness was the only color component that was affected by the combined LA/UV-C application. As mentioned above, the decrease in initial a* is mainly due to the application of LA [19,34]. After eight weeks of storage, treated samples had different values of L* and a* with respect to samples without treatment, however the chroma value was similar in both samples. The greater decrease in the value of L* and a* at week 8 in the treated samples may be due to the fact that both LA and UVC have the capacity to oxidize myoglobin and to cause lipid oxidation with the consequent loss of color in meat [26,35]. However, more studies need to be done to assess the color of treated meats over time.

In summary, the combined application of LA 2.6% and UV-C 330 mJ/cm² contributed to improving safety of vacuum packed beef, with a low impact on color. Although, more studies must be carried out regarding the effects on other bacteria present on meat and other physicochemical changes such as lipid and protein oxidation.

5. Conclusions

The selected Central Composite design and response surface methodology were effective tools to optimize and study the effects of LA and UV-C parameters on the *L. monocytogenes* and LAB reduction in vacuum packed beef. The combined application of LA and UV-C radiation under the tested conditions proved to be a useful strategy to reduce *L. monocytogenes* and LAB population in meat without significantly affecting meat color. The treatment had an effect over time by preventing *L. monocytogenes* growth and delaying LAB growth. The latter might have an impact on vacuum beef shelf life. The maximum reduction on *L. monocytogenes* obtained without significant changes in color was 1.55 log CFU/g. Considering that the usual amount of *L. monocytogenes* in fresh meat is low, this level of reduction is significant for meat safety purposes.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods10061217/s1>, Table S1: Central composite experimental design matrix with L*, a* and b* values for beef samples.

Author Contributions: Conceptualization, G.B. and C.R.; methodology, G.B. and C.R.; formal analysis, G.B., S.R. and J.R.; investigation, G.B., S.R. and J.R.; resources, C.R.; data curation, C.R.; writing—original draft preparation, C.R. and G.B.; writing—review and editing, C.R. and G.B.; supervision, C.R.; project administration, C.R.; funding acquisition, C.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors thank Santiago Luzardo from INIA (Tacuarembó, Uruguay) for support for color measures, Eng. Alvaro Irigoyen and Eng. Juan Sanchez (Facultad de Ingeniería-UdelaR) for support with UV-C lamp intensity measures.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Buchanan, R.L.; Gorris, L.G.M.; Hayman, M.M.; Jackson, T.C.; Whiting, R.C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* **2017**, *75*, 1–13. [[CrossRef](#)]
- Labadie, J. Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Sci.* **1999**, *52*, 299–305. [[CrossRef](#)]
- New and Established Carcass Decontamination Procedures Commonly Used in the Beef-Processing Industry. *J. Food Prot.* **1997**, *60*, 1146–1151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nychas, G.J.E.; Skandamis, P.N.; Tassou, C.C.; Koutsoumanis, K.P. Meat spoilage during distribution. *Meat Sci.* **2008**, *78*, 77–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hope, J.; Klein, G.; Koutsoumanis, K.; Mclauchlin, J.; Müller-graf, C. Scientific Opinion on the evaluation of the safety and efficacy of lactic acid for the removal of microbial surface contamination of beef carcasses, cuts and trimmings. *EFSA J.* **2011**, *9*. [[CrossRef](#)]
- Guerrero-Beltrán, J.A.; Barbosa-Cánovas, G.V. Review: Advantages and limitations on processing foods by UV light. *Food Sci. Technol. Int.* **2004**, *10*, 137–147. [[CrossRef](#)]
- FDA. Irradiation in the production, processing and handling of food: Ultraviolet radiation for the processing and treatment of food. *Food Drugs* **2000**, *65*, 71056–71058.
- Theron, M.M.; Lues, J.F.R. Organic acids and meat preservation: A review. *Food Rev. Int.* **2007**, *23*, 141–158. [[CrossRef](#)]
- DeGeer, S.L.; Wang, L.; Hill, G.N.; Singh, M.; Bilgili, S.F.; Bratcher, C.L. Optimizing application parameters for lactic acid and sodium metasilicate against pathogens on fresh beef, pork and deli meats. *Meat Sci.* **2016**, *118*, 28–33. [[CrossRef](#)]
- Bucur, F.I.; Grigore-Gurgu, L.; Crauwels, P.; Riedel, C.U.; Nicolau, A.I. Resistance of *Listeria monocytogenes* to Stress Conditions Encountered in Food and food processing environments. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–18. [[CrossRef](#)]
- Skandamis, P.N.; Yoon, Y.; Stopforth, J.D.; Kendall, P.A.; Sofos, J.N. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiol.* **2008**, *25*, 294–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bintsis, T.; Litopoulou-Tzanetaki, E. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry—A critical review. *J. Sci. Food Agric.* **2010**, *80*, 637–645. [[CrossRef](#)]
- Sommers, C.H.; Cooke, P.H.; Fan, X.; Sites, J.E. Ultraviolet light (254 nm) inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters that contain potassium lactate and sodium diacetate. *J. Food Sci.* **2009**, *74*, M114–M119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gailunas, K.M.; Matak, K.E.; Boyer, R.R.; Alvarado, C.Z.; Williams, R.C.; Sumner, S.S. Use of UV light for the inactivation of *Listeria monocytogenes* and lactic acid bacteria species in recirculated chill brines. *J. Food Prot.* **2008**, *71*, 629–633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kalchayanand, N.; Bosilevac, J.M.; King, D.A.; Wheeler, T.L. Evaluation of UVC radiation and a UVC-ozone combination as fresh beef interventions against Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, salmonella, and *Listeria monocytogenes* and their effects on beef quality. *J. Food Prot.* **2020**, *83*, 1520–1529. [[CrossRef](#)]
- Tarek, A.R.; Rasco, B.A.; Sablani, S.S. Ultraviolet-C Light Inactivation Kinetics of *E. coli* on Bologna Beef Packaged in Plastic Films. *Food Bioprocess Technol.* **2015**, *8*, 1267–1280. [[CrossRef](#)]
- Faustman, C.; Cassens, R.G. The Biochemical Basis for Discoloration in Fresh Meat: A Review. *J. Muscle Foods* **1990**, *1*, 217–243. [[CrossRef](#)]
- Zerby, H.N.; Belk, K.E.; Sofos, J.N.; McDowell, L.R.; Smith, G.C. Case life of seven retail products from beef cattle supplemented with alpha-tocopheryl acetate. *J. Anim. Sci.* **1999**, *77*, 2458–2463. [[CrossRef](#)]
- Rodríguez-Melcón, C.; Alonso-Calleja, C.; Capita, R. Lactic acid concentrations that reduce microbial load yet minimally impact colour and sensory characteristics of beef. *Meat Sci.* **2017**, *129*, 169–175. [[CrossRef](#)]
- Signorini, M.L.; Ponce-Alquicira, E.; Guerrero-Legarreta, I. Effect of lactic acid and lactic acid bacteria on growth of spoilage microorganisms in vacuum-packaged beef. *J. Muscle Foods* **2006**, *17*, 277–290. [[CrossRef](#)]
- García, A.L.; Brugnini, G.; Rodríguez, S.; Mir, A.; Carriquiry, J.; Rufo, C.; Briano, B. Vida útil de carne fresca de res envasada al vacío a 0 °C y +4 °C. *Prod. Agropecu. Desarro. Sosten.* **2015**, *4*, 27–45. [[CrossRef](#)]
- Small, A.H.; Jenson, I.; Kiermeier, A.; Sumner, J. Vacuum-packed beef primals with extremely long shelf life have unusual microbiological counts. *J. Food Prot.* **2012**, *75*, 1524–1527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

23. Pennacchia, C.; Ercolini, D.; Villani, F. Spoilage-related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 84–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zimet, P.; Mombrú, Á.W.; Faccio, R.; Brugnini, G.; Miraballes, I.; Rufo, C.; Pardo, H. Optimization and characterization of nisin-loaded alginate-chitosan nanoparticles with antimicrobial activity in lean beef. *LWT Food Sci. Technol.* **2018**, *91*, 107–116. [[CrossRef](#)]
25. Martinez-Silveira, A.; Villarreal, R.; Garmendia, G.; Rufo, C.; Vero, S. Process conditions for a rapid in situ transesterification for biodiesel production from oleaginous yeasts. *Electron. J. Biotechnol.* **2019**, *38*, 1–9. [[CrossRef](#)]
26. Rosario, D.K.A.; Mutz, Y.S.; Castro, V.S.; Bernardes, P.C.; Rajkovic, A.; Conte-Junior, C.A. Optimization of UV-C light and lactic acid combined treatment in decontamination of sliced Brazilian dry-cured loin: Salmonella Typhimurium inactivation and physicochemical quality. *Meat Sci.* **2021**, *172*, 108308. [[CrossRef](#)]
27. Brugnini, G.; Acquistapace, M.J.; Rodriguez, S.; Rufo, C. Efecto de la aplicación de ácido láctico sobre *Listeria monocytogenes* en carne envasada al vacío en Uruguay. *Innotec* **2018**, *15*, 7–14. [[CrossRef](#)]
28. MacDougall, D.B. Changes in the colour and opacity of meat. *Food Chem.* **1982**, *9*, 75–88. [[CrossRef](#)]
29. McLeod, A.; Liland, K.H.; Haugen, J.E.; Sørheim, O.; Myhrer, K.S.; Holck, A.L. Chicken fillets subjected to UV-C and pulsed UV light: Reduction of pathogenic and spoilage bacteria, and changes in sensory quality. *J. Food Saf.* **2018**, *38*, 2421. [[CrossRef](#)]
30. Ariyapitipun, T.; Mustapha, A.; Clarke, A.D. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on Vacuum-Packaged Raw Beef Treated with polylactic Acid, Lactic Acid and Nisin. *J. Food Prot.* **2000**, *63*, 131–136. [[CrossRef](#)]
31. Tsigarida, E.; Skandamis, P.; Nychas, G.J.E. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5 °C. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *89*, 901–909. [[CrossRef](#)]
32. Dickson, J.S. Survival and Growth of *Listeria Monocytogenes* on Beef Tissue Surfaces As Affected By Simulated Processing Conditions. *J. Food Saf.* **1989**, *10*, 165–174. [[CrossRef](#)]
33. Duffy, G.; Walsh, D.; Sheridan, J.J.; Logue, C.M.; Harrington, D.; Blair, I.S.; McDowell, D.A. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua* during storage of minced beef under vacuum or in air at 0 °C and 10 °C. *Food Microbiol.* **2000**, *17*, 571–578. [[CrossRef](#)]
34. Salim, A.P.A.; Canto, A.C.; Costa-Lima, B.R.; Simoes, J.S.; Panzenhagen, P.H.; Costa, M.P.; Franco, R.M.; Silva, T.J.; Conte-Junior, C.A. Inhibitory effect of acid concentration, aging, and different packaging on *Escherichia coli* O157:H7 and on color stability of beef. *J. Food Process. Preserv.* **2017**, *42*, 1–8. [[CrossRef](#)]
35. Faustman, C.; Sun, Q.; Mancini, R.; Suman, S.P. Myoglobin and lipid oxidation interactions: Mechanistic bases and control. *Meat Sci.* **2010**, *86*, 86–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Efecto de la aplicación de ácido láctico sobre *Listeria monocytogenes* en carne envasada al vacío en Uruguay

Effect of lactic acid application on *Listeria monocytogenes* in vacuum packed meat in Uruguay

Brugnini, Giannina (1); Acquistapace, María Jesús (1); Rodríguez, Soledad (1); Rufo, Caterina (1).
(1) Área de Alimentos y Nutrición, Instituto Polo Tecnológico de Pando, Facultad de Química, Universidad de la República, Canelones, Uruguay.

Contacto: gbrugnini@fq.edu.uy

RECIBIDO: 22/3/2018 – APROBADO: 4/6/2018

Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto de la aplicación de ácido láctico en carne envasada al vacío sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, utilizando cepas aisladas de frigoríficos nacionales. Se aislaron e identificaron 35 cepas de *Listeria*: 29 *L. innocua* y 6 *L. monocytogenes* pertenecientes a más de un serotipo. Todos los aislamientos presentaron sensibilidad al ácido láctico in vitro. La concentración mínima inhibitoria en TSB-YE fue de 0,3% y la concentración mínima bactericida, de 0,7%.

En muestras de carne inoculadas con el aislado L100A1 tratadas con ácido láctico al 2,5%, envasadas al vacío y conservadas a 4 °C, se logró una reducción inicial de L100A1 de 1,1 log; al final de las ocho semanas la reducción había alcanzado 1,5 log, mostrando un efecto sinérgico entre el ácido láctico y el envasado al vacío. A concentraciones de ácido láctico de 5% no se observó sinergia y la inhibición de 1,4log inicial se mantuvo constante en el tiempo. En suma, el uso de ácido láctico entre 2,5 y 5% en carne envasada al vacío reduce significativamente los recuentos de *L. monocytogenes* y puede utilizarse como estrategia adicional para su control en cortes cárnicos de alto valor.

Palabras clave: Inocuidad, microorganismos patógenos, productos cárnicos.

Abstract

In this work, the effect of the application of lactic acid on *Listeria monocytogenes* growth was evaluated in vacuum packed meat using strains isolated from local slaughter houses. Thirty-five strains of *Listeria* were isolated and identified: 29 *L. innocua* and 6 *L. monocytogenes* belonging to more than one serotype. All the isolates showed sensitivity to lactic acid in vitro. The minimum inhibitory concentration in TSB-YE was 0,3% and the minimum bactericidal concentration was 0,7%. The L100A1 isolate was used in the meat study. In meat samples treated with 2,5% lactic acid, packed in vacuum and stored at 4 °C, an initial reduction of L100A1 of 1,1 log was achieved. By the end of eight weeks the reduction had reached 1,5 log showing a synergistic effect between lactic acid and vacuum packaging. When 5% lactic acid concentrations were used, no synergy was observed and the initial 1,4 log growth inhibition remained constant over time. In sum, the use of lactic acid at concentrations between 2,5 and 5% in vacuum packed meat significantly reduces *L. monocytogenes* counts and can be used as an additional hurdle in high value meat cuts.

Keywords: Food Safety, pathogenic microorganisms, meat products.

Introducción

Listeria monocytogenes es una bacteria patógena causante de listeriosis, una enfermedad rara pero severa con una alta tasa de mortalidad (Buchanan, et al., 2017). Tanto en Estados Unidos como en la Unión Europea se evidenció una tendencia creciente en el número de brotes de listeriosis entre los años 2008 y 2015 (EFSA-ECDC, 2016; CDC, 2014). En Uruguay, en el año 2016 hubo un aumento de casos de listeriosis invasiva, y se reportaron 13 casos de los cuales cuatro fueron letales (MSP, 2017).

L. monocytogenes puede crecer en ausencia de oxígeno, en un amplio rango de pH (entre 4,4 – 9,4) y a temperatu-

ras de refrigeración (Nychas, et al., 2008), y es uno de los patógenos más prevalentes en carne y productos cárnicos (Mor-Mur y Yuste, 2010).

En lo que respecta a carne producida en Uruguay, los datos disponibles indican que la contaminación con *L. monocytogenes* es frecuente. En este sentido, Bosilevac et al. (2007) encontraron al analizar 226 muestras de carne uruguaya que el 24% estaban contaminadas con *L. monocytogenes*. También se reportaron hallazgos de *L. monocytogenes* en carne uruguaya exportada a Rusia (European Commission, s.d.).

Debido al riesgo potencial que presentan la carne y sus productos, la industria frigorífica debe implementar distintas

estrategias para reducir las poblaciones de patógenos en la carne cruda. La aplicación de ácidos orgánicos ha sido investigada como una posible estrategia para reducir los niveles bacterianos en carne (Rajkovic, et al., 2010).

El ácido láctico, que posee efectos bacteriostáticos y bactericidas, fue aprobado principalmente como estrategia para disminuir la contaminación por *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella*. Mientras que Estados Unidos permitió su uso en carne desde 1999 (Koohmaraie, et al., 2005), la Unión Europea (UE) lo aprobó recién en 2013 (Unión Europea, 2013). Actualmente, en muchos países se aplica en establecimientos frigoríficos de manera rutinaria para reducir la contaminación bacteriana.

El Reglamento de la UE establece un rango permitido de concentración de la solución de ácido láctico de entre 2 y 5%, y 2% es la concentración más utilizada en la industria (Dormedy, et al., 2000). Cuando se usa entre 2 y 4%, reduce el número de *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* (Gill y Badoni, 2004; Yoder, et al., 2012) y *L. monocytogenes* (Theron y Lues, 2007; Byelashov, et al., 2010). También se ha descrito para *L. monocytogenes* un efecto de inhibición sobre la cepa *L. monocytogenes* Scott A sinérgico entre el envasado al vacío y la aplicación de ácido láctico (Ariyapitipun, et al., 2000). Sobre la carne envasada al vacío proliferan bacterias ácido lácticas que pueden ejercer efecto bactericida sobre *L. monocytogenes* mediante la producción de ácido láctico y bacteriocinas (Vignolo, et al., 2012).

El mecanismo de acción del ácido láctico depende de la capacidad del ácido no disociado para penetrar a través de la membrana celular y disociarse dentro de la bacteria, causando una disminución en el pH interno que puede interrumpir la producción de ATP, la síntesis de ARN, la replicación del ADN y el crecimiento celular (Rajkovic, et al., 2010). Algunas cepas de *L. monocytogenes* tienen la habilidad de adaptarse y persistir en plantas de procesamiento de alimentos (Ferreira, et al., 2014). Esta persistencia puede explicarse por la capacidad de formar biofilms y por la tolerancia a los distintos sanitizantes y estrategias de control como el pH, temperatura y estrés salino que se utilizan a menudo en la industria. Se ha observado heterogeneidad y resistencia a distintos tipos de estrés entre cepas (Metselaar, et al., 2013), por ello es importante estudiar el comportamiento frente al ácido láctico de cepas aisladas de la misma matriz en las mismas condiciones de procesamiento que se pretende implementar la intervención.

Los cortes cárnicos de mayor valor se comercializan envasados al vacío con una vida útil de hasta dos meses si son conservados a 4 °C (García, et al., 2015), y debe garantizarse su inocuidad durante toda su vida útil. Por ello, se espera que el ácido láctico controle el crecimiento de *L. monocytogenes* en el sistema carne envasada al vacío. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue aislar cepas de *L. monocytogenes* presentes en establecimientos frigoríficos nacionales y estudiar el efecto del ácido láctico sobre su crecimiento en carne envasada al vacío y las implicancias de su aplicación sobre la inocuidad del producto durante su vida útil.

Materiales y Métodos

Muestreos

Las muestras fueron tomadas en dos establecimientos frigoríficos (F1 y F2) de Uruguay en dos visitas a cada frigorífico durante julio y agosto. Estos frigoríficos no estaban utilizan-

do la aplicación de ácido láctico sobre carcasa. Se realizó un muestreo dirigido, se tomaron muestras de superficie de 12 medias reses antes de ingresar a cámaras de maduración, y se tomaron 10 muestras de carne en diferentes puntos de la cinta transportadora de la línea de desosado de los cortes del trasero.

Las muestras de superficie de las medias reses se realizaron utilizando esponjas estériles (Whirl-Pak®) previamente hidratadas con 10 mL de buffer Butterfield. Se utilizó una esponja por cada media res, y la superficie total muestreada fue de aproximadamente 8000 cm² (4000 cm² del trasero y 4000 cm² del delantero de una misma media res) como lo reporta Arthur (2004). El muestreo se realizó haciendo trazos verticales con la esponja de arriba hacia abajo y horizontales de izquierda a derecha. La esponja se volteó en el pasaje de los trazos horizontales a verticales. Para las muestras de carne se tomaron asépticamente 100 gramos de 10 cortes seleccionados al azar y se colocaron en bolsas estériles.

Las esponjas y las muestras de carne se conservaron refrigeradas y se trasladaron hacia el laboratorio para su análisis.

Aislamiento de *Listeria* spp.

Los aislamientos de *Listeria* spp. se realizaron directamente de las esponjas para el caso de las muestras tomadas de la superficie de las medias reses, mientras que para la carne se tomaron 10 gramos de cada muestra. Esponjas y carne se colocaron individualmente en bolsas estériles para stomacher con 90 mL de medio Half Fraser (Oxoid), con suplemento Half Fraser SR0166 (Thermo) y se incubaron a 30 °C durante 24 ± 3 horas. Posteriormente, se transfirieron 0,1 mL de los cultivos a 10 mL de medio de enriquecimiento secundario Fraser (Oxoid), con agregado de suplemento Fraser SR0156 (Thermo) y se incubaron a 37 °C durante 48 ± 3 horas. Luego, se sembró por estrías una ansada sobre placas de agar Palcam con agregado del suplemento selectivo para Palcam SR0150 (Thermo) y se incubaron 48 horas a 37 °C. Las colonias características de *Listeria* spp. en agar Palcam presentan aproximadamente 2 mm de diámetro y una coloración verde-grisácea con halo marrón oscuro-negro. Las colonias con esta morfología se aislaron sucesivamente en placas con agar tripticosa de soja (TSA) (Oxoid) suplementado con 0,6% de extracto de levadura (YE) (Oxoid) con el fin de obtener cultivos puros, y se incubaron 18 horas a 37 °C. Para su conservación, se repicaron de una colonia a un tubo de TSA-YE inclinado, y se incubaron 18-20 horas a 37 °C. Luego se mantuvieron refrigeradas (4 ± 1 °C) hasta el momento de su uso.

Identificación según propiedades bioquímicas

Se caracterizaron los aislamientos mediante tinción de Gram, actividad catalasa y galerías API. Para realizar la tinción de Gram y la prueba de catalasa se partió de una colonia de un cultivo joven (18-24 horas) de placas de TSA-YE. Para el sistema de galerías API *Listeria*, se suspendieron tres colonias aisladas de cultivos jóvenes (18-24 horas) en una ampolla de API Suspension Medium (2 mL) y se ajustó a una suspensión igual a 1 de McFarland. Se sembraron 50 µL con la suspensión en todos los tubos de la galería, excepto en el ensayo DIM, que se sembraron 100 µL según instrucciones del fabricante. Se incubó 18-24 horas a 36 ± 2 °C en atmósfera aerobia.

Identificación molecular

Se realizó la confirmación de género y especie de los aislamientos a nivel molecular usando una PCR multiplex a tiempo final y una PCR a tiempo real. Para la extracción de ADN genómico de todos los aislamientos de *Listeria* se utilizó el kit Mericon™ DNA Bacteria Plus Kit (Qiagen), a partir de 1 mL de cultivo en medio TSB con extracto de levadura incubados a 37 °C durante 18 horas. La PCR múltiplex utilizada fue una modificación de la reportada por Bubert et al. (1999). Se utilizaron los cebadores, MonoA(F), Ino2(F) y Siwi2(F) y Lis1B(R) (Bubert, et al., 1999) y Gra1(F) (Acquistapace, 2015). Los cebadores fueron sintetizados por MacroGen Inc. (Seúl, Corea). La reacción consistió en 30 ciclos: 95 °C durante 15 segundos, 58 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 50 segundos. Se utilizó un termociclador Rotor-Gene Q. Se usó como control negativo agua miliQ estéril, como control positivo para *L. innocua*, la cepa de *L. innocua* ATCC 33090, y como control positivo para *L. monocytogenes*, la cepa de ATCC 19111. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% en buffer TAE 1X. Los productos de PCR se sembraron con buffer Loading Dye 6X (Thermo Scientific) y se utilizó el marcador de peso molecular de 1 Kb (Thermo Scientific).

Para la PCR a tiempo real se utilizaron los pares de cebadores prs-2(F) y prs-2-deg(R) para identificar *Listeria* spp., el par hlyA-177(F) y (R) y el par hlyA-146-deg-tronc(F) y (R), ambos para identificar *L. monocytogenes* (Barbau-Piednoir, et al., 2013). El programa térmico para las tres reacciones consistió en: un ciclo de activación de ADN polimerasa de 5 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos de amplificación de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C. Luego se realizó la curva de desnaturalización (*melting*) de los productos de la amplificación mediante el aumento gradual de la temperatura de 60 a 95 °C en 20 minutos ($\pm 0,6$ °C/20 segundos) utilizando el mismo termociclador que para la PCR multiplex. La reacción se realizó en un volumen final de 25 μ L, con 2 μ L de ADN muestra, 1X Rotor-Gene™ SYBR Green PCR MasterMix (Qiagen) y 500 nM de cada cebador.

Sensibilidad de los aislamientos frente al ácido láctico en placa

Para evaluar la sensibilidad al ácido láctico de los aislamientos de *Listeria*, se determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) mediante la técnica de microdilución en caldo y posterior siembra en placas de agar Palcam con agregado del suplemento selectivo para Palcam (SR0150 Thermo) para el recuento de viables. Para ello se seleccionaron todos los aislamientos identificados como *L. monocytogenes*. Los inóculos se prepararon a partir de cultivos en fase exponencial, ajustando la absorbancia (625 nm) en un rango entre 0,08 y 0,10 equivalente al patrón 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ ufc/mL). A continuación se realizó la dilución correspondiente en buffer Butterfield estéril para alcanzar una concentración final de 1×10^6 ufc/mL.

Las soluciones de ácido láctico de diferentes concentraciones se prepararon con agua destilada estéril a partir de una solución comercial de ácido láctico 85% (m/v) (Nortetur S.A., Montevideo).

Para determinar la CMI se utilizaron placas de 96 pocillos. La concentración inicial del inóculo en cada pocillo fue de

$2,5 \times 10^6$ ufc/mL y las concentraciones finales de ácido láctico en el pocillo fueron 1,2%, 0,7%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1% y 0%. Se realizaron controles positivos (inóculo + TSB-YE) y controles negativos (la concentración más alta de ácido láctico + TSB-YE). Las placas se incubaron a 35 °C durante 16-20 horas. La lectura de absorbancia de la microplaca se realizó en un lector de placas Multiskan Ex, Thermo Scientific® a 620 nm. Se considera la concentración mínima inhibitoria (CMI) a la mínima concentración de ácido láctico en la que no se observa desarrollo bacteriano (valor de OD $\leq 0,05$) (Branen, et al., 2004). A su vez, se midió el pH en la microplaca luego del periodo de incubación para las distintas concentraciones de ácido utilizando un pHmetro Hanna® modelo 9025c.

Para determinar la CMB se tomaron 100 μ L de los pocillos sin crecimiento visible de la bacteria (OD $\leq 0,05$) y se sembraron en placas de agar Palcam con agregado del suplemento selectivo para Palcam (SR0150 Thermo). Las placas de agar Palcam se incubaron 24-48 horas a 37 °C. Se considera la concentración mínima bactericida (CMB) a la menor concentración de ácido láctico que en placas de agar es capaz de eliminar el 99,99% del inóculo inicial (lo que se visualiza por la ausencia de colonias en placa). Los ensayos se realizaron por triplicado para cada aislamiento seleccionado. Las diferencias entre los tratamientos se determinaron mediante ANOVA, seguido de la prueba de Tukey ($p < 0,05$) utilizando el programa IBM SPSS Statistics 20.

Sensibilidad de los aislamientos frente al ácido láctico en carne

Para evaluar la sensibilidad al ácido láctico en carne se eligió el aislado de *L. monocytogenes* L100A1. La carne usada correspondió a un corte de bife angosto (músculo largo dorsal) envasado al vacío adquirido en una carnicería de Montevideo, del cual se cortaron trozos de 10 gramos (5 cm x 5 cm). Luego se colocaron sobre una superficie limpia, previamente expuesta a radiación UV durante 20 minutos y se inocularon asepticamente con 1 mL de L100A1 de 1×10^6 ufc/mL (preparado como se indica en los ensayos de sensibilidad de los aislamientos frente al ácido láctico en placa). Se dejaron 20 minutos a temperatura ambiente (22 °C) para permitir la fijación del inóculo a la superficie de cada trozo de carne (Carpenter, et al., 2011) previo a aplicar el tratamiento de ácido láctico.

Ensayo 1

Seis trozos de 10 gramos de carne se inocularon con 1 mL de un cultivo 1×10^6 ufc/mL del aislado L100A1 y se trataron por duplicado con ácido láctico al 0, 2,5% y 5% en una relación de 0,03 mL de ácido por cm² de carne (Youssef, et al., 2012). Luego de 20 minutos, los trozos de carne tratados se envasaron al vacío individualmente en bolsas Cryovac T7335B, utilizando una envasadora SAMMIC modelo V-410SGI. Un grupo de muestras se analizó inmediatamente (tiempo cero) y el segundo grupo fue almacenado a 4 °C y analizado a los 14 días. A su vez, se prepararon seis trozos de carne adicionales (uno por cada concentración de ácido láctico) sobre los cuales se midió y registró el pH superficial de la carne para ambos tiempos, utilizando un pHmetro Hanna® modelo 9025c con un electrodo de superficie.

Para el análisis de cada muestra se transfirió asepticamente el trozo de carne a una bolsa estéril para stomacher y se

homogeneizó con 90 mL de buffer Butterfield en Stomacher Seward 400C LabBlenders, a 230 rpm durante 2 minutos. Se plaquearon 100 µL de ese caldo en placas de agar Palcam con agregado del suplemento selectivo para Palcam (SR0150 Thermo), y se incubaron 24-48 horas a 37 °C. Se realizaron los recuentos de *L. monocytogenes* y los resultados se expresaron como log ufc/g de carne. Las diferencias entre los tratamientos se determinaron mediante ANOVA, seguido de la prueba de Tukey con un nivel de significación del 5% ($p < 0,05$) utilizando el programa IBM SPSS Statistics 20.

Ensayo 2

Quince trozos de 10 gramos de carne se inocularon con 1 mL de 1×10^6 ufc/mL del aislado L100A1, y se separaron en tres subgrupos que se trataron con diferentes concentraciones de ácido láctico (5%, 2,5% y 0%). Todas las muestras se envasaron individualmente al vacío y se almacenaron a 4 °C. Los recuentos de *L. monocytogenes* se determinaron a la semana 1, 2, 3, 5 y 8, como se describió para el ensayo 1. También se realizó recuento de bacterias ácido lácticas (BALs) a las muestras tratadas con 5% y sin ácido láctico en medio MRS agar mediante siembra incorporada. Las placas se incubaron a 25 °C durante 72 horas. Se realizaron dos ensayos independientes y los resultados de los recuentos se analizaron como se mencionó en el ensayo 1.

Resultados y Discusión

Búsqueda de *Listeria* spp.

Del muestreo realizado sobre la superficie de las medias reses antes de la cámara de maduración, no se recuperó *Listeria* spp., pero sí se recuperó de todas las muestras de carne tomadas en la sala de desosado de ambos establecimientos frigoríficos. A pesar de haber analizado un número bajo de muestras, los resultados concuerdan con lo reportado por Nychas et al. (2008) y McLaughlin (2004): la contaminación por *Listeria* spp. se debe principalmente a la contaminación que se produce durante la manipulación por cepas presentes en ambiente y equipos.

Por otro lado, el hecho de que se haya recuperado *Listeria* de todas las muestras de carne analizadas en ambos establecimientos se debe a que las muestras se tomaron en sitios de alto riesgo de contaminación y a la existencia de una alta prevalencia. En este sentido, Bosilevac et al. (2007) determinaron en carne uruguaya exportada a Estados Unidos una prevalencia de *Listeria* del 29%, es decir, 66 de las 226 muestras analizadas contenían al menos una especie.

En cuanto a las características de los aislamientos, todos fueron Gram positivos y catalasa positivos, características propias del género *Listeria*. Los amplicones obtenidos utilizando la PCR multiplex (Bubert, et al., 1999) correspondieron a los tamaños esperados para *L. innocua* (870 bp) y para *L. monocytogenes* (660pb). No se observaron amplicones correspondientes a las especies *L. seliigeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. Los resultados del método molecular coincidieron con la identificación mediante galerías API. De los 35 aislamientos obtenidos, 29 correspondieron a *L. innocua* y 6 a *L. monocytogenes*. Todos los aislados de *L. monocytogenes* estudiados presentaron únicamente el perfil API 6510. Según Ballesteros (2009), los perfiles numéricos

más frecuentes en galerías API de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos son 6510 y 6110.

A los seis aislamientos identificados como *L. monocytogenes* por PCR multiplex y galerías API se les confirmó su identidad determinando la presencia de los genes *prs* y *hlyA* (Gráfico 1A y Gráfico 1B). A su vez, utilizando el par de cebadores *hlyA*-146-deg-tronc(F) y *hlyA*-146(R) se observa que las curvas de disociación de los amplicones correspondientes a los seis aislamientos se separan en dos grupos (Gráfico 1C). Barbau-Piednoir et al. (2013) reportaron que los serotipos 1/2a, 1/2c, 3a, 3c, 4a, 4d y 4e presentan una temperatura de melting (T_m) de entre 73,5-74 °C, mientras que los serotipos 1/2b, 3b, 4b y 4c presentan una T_m de 75 °C. En este estudio, los aislados L100A1, L100A2 y L100D3 presentaron una T_m de 79 °C, mientras que L101B1, L101B2, L101E3 y la ATCC 19111 una T_m de 78,2 °C. El control positivo ATCC 19111

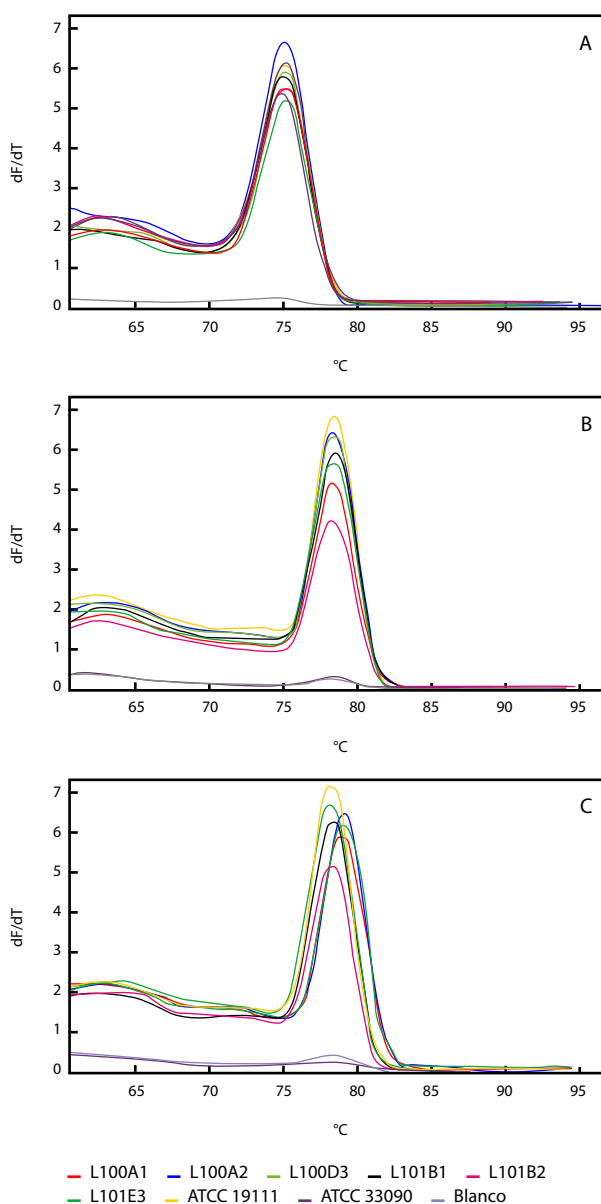


Gráfico 1. Curvas de disociación de qPCR obtenidas con SYBR® Green. Los diferentes ensayos de qPCR son **A:** *prs*-2-deg, **B:** *hlyA*-177 y **C:** *hlyA*-146-deg-tronc.

pertenece al serotipo 1/2a, en coincidencia con la presencia de esta cepa en el grupo de menor Tm. Por tanto, se puede inferir que se encontraron por lo menos dos serotipos distintos de *L. monocytogenes*. En línea con este resultado, Bosilevac et al. (2007) reportaron la existencia de distintos serotipos en las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de carne uruguaya: el 5% pertenecían al serotipo 1/2a, 28% al 1/2b, 29% al 1/2c y el 38% al 4b. A su vez, Braga (2017) también encontró que los serotipos de mayor frecuencia en alimentos uruguayos son los serotipos 1/2b y 4b, seguidos de los serotipos 1/2a y 1/2c.

Sensibilidad al ácido láctico en placa

Todos los aislados de *L. monocytogenes* (6) expuestos al ácido láctico presentaron el mismo patrón de inhibición de crecimiento (Gráfico 2). La mínima concentración de ácido láctico en el pocillo a partir de la cual no se observó crecimiento fue de 0,3%. La siembra en placas de agar Palcam de los cultivos provenientes de los pocillos de la microplaca en los que hubo inhibición de crecimiento mostró que a partir de una concentración de 0,7% ya no se recuperaron colonias viables (Tabla 1). Valores similares fueron reportados por Oh (1993), quien observó que una concentración de 0,25% de ácido láctico inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes* en caldo de TSB-YE a 35 °C. La inhibición del crecimiento de *Listeria* por ácido láctico ha sido ampliamente reportada y se atribuye a dos factores: al descenso del pH en el medio ambiente y a la capacidad de la forma no disociada de atravesar la membrana celular e interferir con el funcionamiento celular (Rajkovic, et al., 2010).

Para la condición ensayada con 0,7% de ácido láctico, donde no se observaron colonias viables, el pH fue de 4,5, acorde a los resultados de Sorrels (1989), que indican que el ácido láctico es más efectivo en inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* cuando alcanza valores de pH de entre 4,5 a 4,6. Los valores definidos como CMI y CMB para L100A1 se muestran en el Gráfico 3 y en la Tabla 1, respectivamente. El aislado L100A1 se eligió para continuar con los estudios en carne.

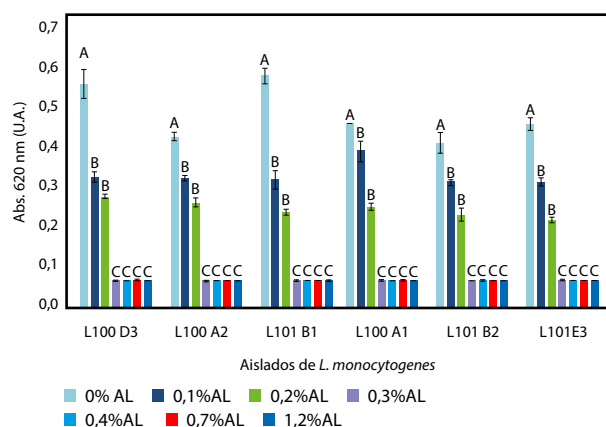


Gráfico 2. Sensibilidad de los aislamientos de *L. monocytogenes* frente a diferentes concentraciones de ácido láctico. Las barras de error representan el error estándar de la media de tres medidas independientes. Para cada aislamiento letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

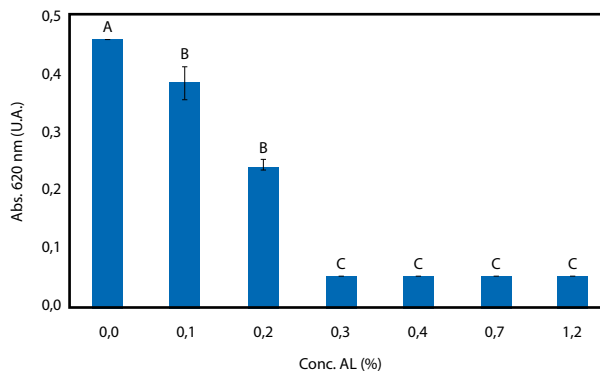


Gráfico 3. Curvas de inhibición en TSB-YE en función de la concentración de ácido láctico (AL) para L100A1 (*L. monocytogenes*). Las barras de error representan el error estándar de la media de tres medidas independientes. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Aislado	Concentración de ácido láctico (%)				
	1,2	0,7	0,4	0,3	0,2
L100A1	-	-	+	+	+

Tabla 1. Recuperación de células viables en placas de agar Palcam provenientes del cultivo de la microplaca para L100A1. (-) ausencia de crecimiento bacteriano visible en placas (+) crecimiento bacteriano visible en placas.

Efectos de la aplicación del ácido láctico sobre L100A1 en carne envasada al vacío

pH superficial

La aplicación de ácido láctico reduce el pH de la superficie de la carne, que llega a 5,1 y 4,8 para los tratamientos de 2,5 y 5% de ácido láctico. La reducción es significativa ($p < 0,05$) cuando se aplica ácido láctico al 5% (Tabla 2). A los 14 días no se observaron cambios significativos en los valores de pH y se mantiene la diferencia entre las muestras tratadas y no tratadas. Esta diferencia en pH debida a la aplicación de ácido láctico en carnes envasadas al vacío y conservadas a 4 °C fue reportada por Ariyapitipun et al. (2000), quienes observaron

Ácido láctico (%)	Tiempo cero		14 días	
	pH promedio	DS	pH promedio	DS
0	5,43 ^A	0,03	5,37 ^A	0,04
2,5	5,00 ^{A,B}	0,36	5,09 ^{A,B}	0,07
5	4,76 ^B	0,23	4,83 ^B	0,13

Tabla 2. Valores de pH superficial promedio de los trozos de carne medidos a tiempo 0 y a los 14 días de envasado. DS: desviación estándar. Para cada tiempo letras distintas en columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

que las diferencias de pH entre tratamientos seguían siendo significativas hasta los 21 días. Luego de este tiempo ya no se percibían diferencias, debido a que el pH de las muestras tratadas había aumentado, posiblemente por la penetración del ácido láctico en la carne y a la neutralización del ácido por las proteínas de la carne (Woolthuis, et al., 1985).

Efecto bactericida y bacteriostático del ácido láctico sobre L100A1 en carne

La aplicación de ácido láctico en carne tiene un efecto bactericida inmediato sobre *L. monocytogenes* L100A1. Para las dos concentraciones de ácido láctico ensayadas a tiempo cero, la mayor disminución en los recuentos de *L. monocytogenes* se produjo con 5% de ácido láctico. La aplicación de ácido láctico al 2,5% redujo en 1,1 log, y al 5% la reducción fue de 1,4 log, significativa con respecto al control. Varios estudios mostraron el efecto bactericida del ácido láctico sobre *L. monocytogenes* (Gráfico 4). En este sentido, DeGeer et al. (2016) obtuvieron reducciones similares de *L. monocytogenes* en carne fresca tratada con soluciones de 2 y 4%, 0,85 log ufc/cm² y 1,3 log, respectivamente, mientras que Ariyapitipun et al. (2000) lograron una reducción de 1,56 log ufc/cm² aplicando una solución de ácido láctico al 2%. Las diferencias en la magnitud de la reducción entre los diferentes estudios pueden deberse, entre otros factores, a la variación entre las cepas utilizadas y al modo de aplicación de las soluciones de ácido láctico. En este estudio la cepa usada, L100A1, fue aislada de ambiente frigorífico luego de haber sufrido diferentes tipos de estrés que, según Skandamis (2008), pueden afectar la tolerancia en medios ácidos. Por otro lado, en este estudio el ácido láctico fue aplicado por aspersión, mientras que en los trabajos de DeGeer et al. (2016) y Ariyapitipun et al. (2000) fue por inmersión. Es posible que la aplicación de ácido láctico por inmersión logre obtener una mayor cantidad de ácido sobre la superficie de la carne.

A los 14 días, las muestras envasadas al vacío y conservadas a 4 °C presentaron un descenso no significativo en los recuentos de L100A1 para las muestras sin tratar y significativo

($p < 0,05$) para las muestras tratadas con 2,5% de ácido láctico (Gráfico 4) con respecto a su valor al tiempo 0. Para las muestras tratadas con 5% de ácido láctico no hubo cambios significativos al final de los 14 días.

Este efecto bacteriostático de la aplicación de ácido láctico en condiciones de envasado al vacío y conservación a 4 °C se estudió durante ocho semanas, tiempo máximo de vida útil de la carne envasada al vacío y conservada a 4 °C (García, et al., 2015).

Durante este tiempo el patrón de crecimiento de *L. monocytogenes* L100A1 en las muestras no tratadas mostró que el envasado al vacío impidió el crecimiento de este organismo (Gráfico 5). Su crecimiento fue significativamente inhibido ($p < 0,05$) hasta las ocho semanas. En este tiempo de almacenamiento, el número de células se redujo en aproximadamente 1,4 log ufc/g. Por otro lado, en las muestras tratadas con ácido láctico 2,5% se observó una reducción más pronunciada en el tiempo que en las muestras control, el número de L100A1 se redujo 1,6 log en cinco semanas, en línea con el efecto sinérgico previamente reportado por Ariyapitipun et al. (2000) entre el envasado al vacío, la baja temperatura y la aspersión con ácido láctico al 2,5%. Sin embargo, en las muestras tratadas con 5% de ácido láctico, el número de L100A1 se mantuvo constante durante las ocho semanas (Gráfico 5).

En la carne envasada al vacío y conservada a 4 °C se generan condiciones que inhiben el crecimiento de *Listeria*: pH 5,4 o inferior, baja temperatura y anaerobiosis. Además, en estas condiciones proliferan las bacterias ácido lácticas naturales de la carne, que producen ácidos orgánicos y bacteriocinas (Castellano, et al., 2008; Vignolo, et al., 2012) e inhiben el crecimiento de *Listeria* (Guerrieri, et al., 2009; Chaillou, et al., 2005; Holzapfel, et al., 1995; Jones, et al., 2004). En este trabajo, en paralelo a la disminución de *Listeria*, la población de bacterias ácido lácticas aumentó, tanto en las muestras tratadas como en las no tratadas con ácido láctico, desde 2,7 log ufc/g hasta valores por encima de 7 log ufc/g en cinco semanas (Gráfico 6), lo cual explicaría parte del efecto bacteriostático observado para las muestras control y las tratadas con 2,5% de ácido láctico. Sin embargo,

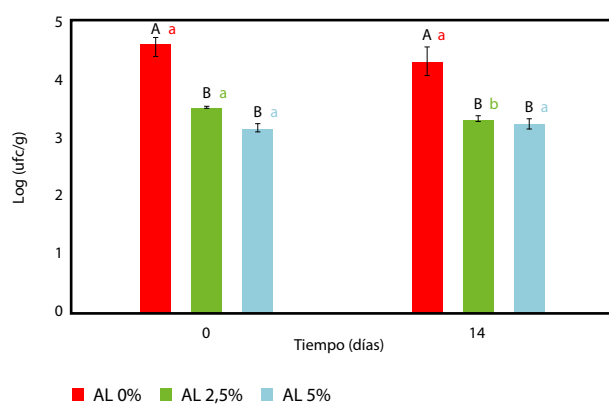


Gráfico 4. Recuentos promedio de *L. monocytogenes* L100A1 a tiempo 0 y a los 14 días en carnes con 5%, 2,5% y sin ácido láctico (AL). Las barras de error representan el error estándar de la media de dos medidas independientes. ^{A,B} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en un mismo tiempo para diferentes tratamientos. ^{a,b} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para un mismo tratamiento en diferentes tiempos.

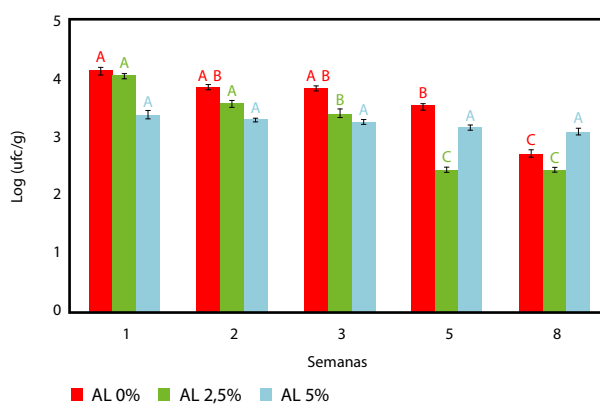


Gráfico 5. Recuentos promedio de *L. monocytogenes* L100A1 durante ocho semanas para carnes tratadas con 5%, 2,5% y sin ácido láctico (AL). Las barras de error representan el error estándar de la media de dos medidas independientes. ^{A,B,C} Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en el tiempo para un mismo tratamiento.

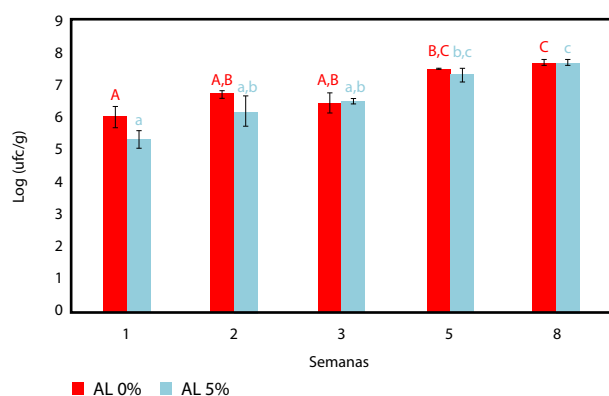


Gráfico 6. Recuentos de bacterias ácido lácticas (log ufc/g) durante ocho semanas en muestras tratadas con 5% y sin ácido láctico (AL). Las barras de error representan el error estándar de la media de dos medidas independientes. A,B,C Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en el tiempo para las muestras sin AL. a,b,c Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en el tiempo para las muestras con 5% de AL.

y a pesar de estar en las mismas condiciones, las bacterias que sobrevivieron a la aplicación inicial de ácido láctico al 5% aparentan ser más resistentes al estrés generado por el envasado al vacío y las bajas temperaturas. En línea con esta observación, la combinación de estrés subletales puede afectar la tolerancia de *L. monocytogenes* a medios ácidos o tratamientos térmicos posteriores (Skandamis, et al., 2008), lo que presenta un riesgo mayor en aquellos productos elaborados a partir de carne que no usan la cocción como estrategia de descontaminación.

Conclusiones

La estrategia planteada de muestreo permitió aislar *Listeria monocytogenes* de muestras de carne tomadas en establecimientos frigoríficos nacionales. De los aislamientos estudiados hasta el momento, se evidencia la presencia de más de un serotipo de *L. monocytogenes*. Los aislamientos fueron sensibles al ácido láctico, tanto *in vitro* como en el sistema carne envasada al vacío y conservada a 4 °C. En este sistema se observó un efecto combinado entre el ácido láctico al 2,5% aplicado sobre la carne y el envasado al vacío. Sin embargo, a concentraciones de ácido láctico de 5% se observó una mayor resistencia a las condiciones generadas por el envasado al vacío. Se debe estudiar con mayor profundidad tanto la incidencia sobre la sobrevivencia de *L. monocytogenes* de la concentración del ácido láctico aplicado sobre la carne antes de envasarla a vacío como también el comportamiento, en esta situación, de los distintos aislamientos que persisten en el ambiente frigorífico nacional.

Reconocimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero brindado por el Proyecto INNOVA 2, Cooperación Europea – ANII y a los dos establecimientos frigoríficos por toda su colaboración y por permitirnos el ingreso a sus instalaciones.

Referencias

- Acquistapace, M.J., 2015. *Efecto de la aplicación de ácido láctico sobre el crecimiento de Listeria spp. aisladas de establecimientos frigoríficos nacionales*. Montevideo: Facultad de Ciencias. (Tesina de Grado).
- Ariyapitipun T., Mustapha A. y Clarke A. D., 2000. Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on vacuum-packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid, and nisin. En: *Journal of Food Protection*, 63(1), pp.131-136.
- Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Nou, X., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., Kent, M. P., Jaroni, D., Pauling, B., Allen, D. M. y Koohmaraie, M., 2004. *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. En: *Journal of Food Protection*, 67, pp.658-665.
- Ballesteros, L., 2009. *Caracterización fenotípica y genotípica de cepas de listeria monocytogenes aisladas de vegetales congelados*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. (Tesis de Maestría).
- Barbau-Piednoir, E., Botteldoorn, N., Yde, M., Mahillon, J. y Roosens, N. H., 2013. Development and validation of qualitative SYBR® Green Real-Time PCR for detection and discrimination of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. En: *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, pp.4021-4037.
- Bosilevac, J. M., Guerini, M. N., Brichta-Harhay, D. M., Arthur, T. M. y Koohmaraie, M., 2007. Microbiological characterization of imported and domestic boneless beef trim used for ground beef. En: *Journal of Food Protection*, 70(2), pp.440-449.
- Braga, V., Vázquez, S., Vico, V., Pastorino, V., Mota, M. I., Legnani, M., Schelotto, F., Lancibidad, G. y Varela, G., 2017. Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Montevideo-Uruguay. En: *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(8), pp.689-694.
- Branen, J. K. y Michael Davidson, P., 2004. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. En: *International Journal of Food Microbiology*, 90, pp.63-74.
- Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., Yoon, B., Goebel, W. y Wagner, M., 1999. Detection and Differentiation of *Listeria* spp. by a Single Reaction Based on Multiplex PCR. En: *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), pp.4688-4692.
- Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C. y Whiting, R. C., 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. En: *Food Control*, 75, pp.1-13.
- Byelashov, O. A., Daskalov, H., Geornaras, I., Kendall, P. A., Belk, K. E., Scanga, J. A., Smith, G. C. y Sofos, J. N., 2010. Reduction of *Listeria monocytogenes* on frankfurters treated with lactic acid solutions of various temperatures. En: *Food Microbiology*, 27, pp.783-790.
- Carpenter, C. E., Smith, J. V. y Broadbent, J. R., 2011. Efficacy of washing meat surfaces with 2% levulinic, acetic, or lactic acid for pathogen decontamination and residual growth inhibition. En: *Meat Science*, 88(2), pp.256-260.
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S. y Vignolo, G., 2008. A review of bacterogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. En: *Meat Science*, 79, pp.483-499.

- CDC, 2014. *CDC national health report: Leading causes of morbidity and mortality and associated behavioral risk and protective factors - United States, 2005 -2013* [En línea]. Atlanta: CDC. [Consulta: 7 de marzo de 2018]. Disponible en: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/25809>.
- Chaillou, S., Champomier-Vergès, M.C., Cornet, M., Crutz-Le, C., Dudez, A. M., Martin, V., Beaufiles, S., Darbon-Rongère, E., Bossy, R., Loux, V. y Zagorec, M., 2005. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. En: *Nature Biotechnology*, 23(12), pp.1527–1533.
- DeGeer S. L., Wang, L., Hill, G. N., Singh, M., Bilgili, S. F. y Bratcher, C. L., 2016. Optimizing application parameters for lactic acid and sodium metasilicate against pathogens on fresh beef, pork and deli meats. En: *Meat Science*, 118, pp.28–33.
- Dormedy, E. S., Brashears, M. M., Cutter, C. N. y Burson, D. E., 2000. Validation of acid washes as critical control points in hazard analysis and critical control point systems. En: *Journal of Food Protection*, 63, pp.1676–1680.
- EFSA-ECDC, 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. En: *EFSA Journal*, 14(12), pp.4634.
- European Commission, [s.d.]. *RASFF Portal. Food and feed safety alerts* [En línea]. [s.l.]: EuropeanCommission. [Consulta: 7 demarzo de 2018]. Disponible en: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList>
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P. y Stasiewicz, M. J., 2014. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. En: *Journal of Food Protection*, 77(1), pp.150–170.
- García, L., Brugnini, G., Rodríguez, S., Mir, A., Briano, B., Carriquiry, J. y Rufo, C., 2015. Vida útil de carne fresca de res envasada al vacío a 0°C y +4°C. En: *Producción Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, 4, pp.27-45.
- Gill, C. O. y Badoni, M., 2004. Effects of peroxyacetic acid, acidified sodium chlorite or lactic acid solutions on the microflora of chilled beef carcasses. En: *International Journal of Food Microbiology*, 91, pp.43-50.
- Guerrieri, E., de Niederhäusern, S., Messi, P., Sabia, C., Iseppi, R., Anacarso, I. y Bondi, M., 2009. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. En: *Food Control*, 20, pp.861-865.
- Holzapfel W., Geisen R. y Schillinger U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food grade enzymes. En: *International Journal of Food Microbiology*, 24(3), pp.343-362.
- Jones, R. J., 2004. Observations on the succession dynamics of lactic acid bacteria populations in chill-stored vacuum-packaged beef. En: *International Journal of Food Microbiology*, 90(3), pp.273-282.
- Koohmaraie, M., Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Guerini, M., Shackelford, S. D. y Wheeler, T. L., 2005. Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. En: *Meat Science*, 71, pp.79–91.
- McLauchlin, J. M., Mitchell, R. T., Smerdonc, W. J. y Jewell, K., 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. En: *International Journal of Food Microbiology*, 92(1), pp.15-33.
- Metselaar, K. I., den Besten, H. M. W., Abee, T. A., Moezelaar, R. y Zwietering, M. I. H., 2013. Isolation and quantification of highly acid resistant variants of *Listeria monocytogenes*. En: *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), pp.508-514.
- Mor-Mur, M. y Yuste, J., 2010. Emerging bacterial pathogens in meat and poultry: an overview. En: *Food and Bioprocess Technology*, 3, pp.24-35.
- MSP, 2017. *Boletín epidemiológico - Mayo 2017* [En línea]. Montevideo: MSP. [Consulta: 7 de marzo de 2018] Disponible en <http://www.msp.gub.uy/publicaci%C3%B3n/bolet%C3%ADn-epidemiol%C3%B3gico-mayo-2017>
- Nychas, G., Panos, Skanadamis, P., Tassou, C. y Koutsoumanis, K., 2008. Meat spoilage during distribution. En: *Meat Science*, 78, pp.77-89.
- Oh, D. H. y Marshall, D. L., 1993. Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. En: *International Journal of Food Microbiology*, 20(4), pp.239-246.
- Rajkovic, A., Smigic, N. y Devlieghere, F., 2010. Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. En: *International Journal of Food Microbiology*, 141, pp.29–42.
- Skandamis, P. N., Yoon, Y., Stopforth, J. D., Kendall, P. A. y Sofos, J. N., 2008. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. En: *Food Microbiology*, 25(2), pp.294-303.
- Sorrels, K. M., Enigl, D.C. y Hatfield, J. R., 1989. Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. En: *Journal of Food Protection*, 52, pp.571-573.
- Theron, M. M. y Lues, J. F. R., 2007. Organic acids and meat preservation: a review. En: *Food Reviews International*, 23(2), pp.141-158.
- Unión Europea. Reglamento (UE) N° 101/2013. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 05 de febrero de 2013, L 34/1.
- Vignolo, G., Saavedra, L., Sesma, F. y Raya, R., 2012. Food bioprotection: lactic acid bacteria as natural preservatives. En: Bhat, Rajeev, Alias, Abd Karim y Paliyath, Gopinadhan, eds. *Progress in food preservation*. Cap.22. Nueva Jersey: John Wiley & Sons. pp.453–483.
- Woolthuis, C. H. J. y Smulders, F. J. M., 1985. Microbial decontamination of calf carcasses by lactic acid sprays. En: *Journal of Food Protection*, 48(10), pp.832-837.
- Yoder, S. F., Henning, W. R., Mills, E. W., Doores, S., Ostiguy, N. y Cutter, C. N., 2012. Investigation of chemical rinses suitable for very small meat plants to reduce pathogens on beef surfaces. En: *Journal of Food Protection*, 75(1), pp.14-21.
- Youssef, M. K., Yang, X., Badoni, M. y Gill, C. O., 2012. Effects of spray volume, type of surface tissue and inoculum level on the survival of *Escherichia coli* on beef sprayed with 5% lactic acid. En: *Food Control*, 25(2), pp.717-722.