

Informe final publicable de proyecto Optimizar las condiciones de fermentación y secado para la reducción de *Listeria* *monocytogenes* durante la elaboración de chacinados secos en la industria nacional

Código de proyecto ANII: FMV_3_2018_1_148907

29/10/2021

BRUGNINI OSIMANI, Giannina (Responsable Técnico - Científico)

PELAGGIO ETTLIN, Ronny (Investigador)

RODRIGUEZ CORTES, María Soledad (Investigador)

RUFO D ADDARIO, Caterina (Investigador)

VERO MÉNDEZ, Silvana (Investigador)

GARMENDIA VÁZQUEZ, Gabriela (Investigador)

MARTINEZ BERNIE, Ines (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\
LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY. FUNDACIÓN LATITUD \\
PARQUE CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE PANDO

Resumen del proyecto

Listeria monocytogenes es una bacteria patógena que causa listeriosis, enfermedad rara pero potencialmente grave. La listeriosis se produce por ingesta de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. Los alimentos prontos para el consumo son los de mayor riesgo, entre ellos los chacinados secos fermentados como el salame. Durante la elaboración del salame la fermentación y el secado tienen acción bactericida por reducción del pH y actividad de agua. En Uruguay no está estudiado el efecto de las condiciones de producción sobre la sobrevivencia de *L. monocytogenes* en salames ni los parámetros críticos de control para seguir el proceso y predecir el comportamiento de *L. monocytogenes*. En este proyecto se estudió a nivel piloto el efecto sobre la sobrevivencia de *Listeria* del tipo de cultivo iniciador, las temperaturas de fermentación y secado, el calibre de los salames y el uso de reguladores de pH inoculando la masa con *Listeria innocua* como microorganismo sustituto. Se usó la metodología de superficie de respuesta para analizar los resultados y optimizar las condiciones de proceso que aseguren ausencia de *L. monocytogenes* en 25 gramos de salame. Los modelos indicaron que la mayor reducción de *Listeria* ocurre durante la fermentación. Sin agregado de lactato de sodio, la reducción esperada de 3 log de *Listeria* ocurre a las 48 horas de fermentación, independientemente del calibre y de la temperatura de fermentación. En presencia de lactato algunas condiciones de proceso no alcanzaron la reducción de 3 log. Durante el secado no se observaron cambios significativos en la reducción de *Listeria*. Según el modelo obtenido, la máxima reducción de *Listeria*, máximo porcentaje de pérdida de peso y mínima actividad de agua en el producto final se obtienen en ausencia de lactato de sodio, temperatura de fermentación de 30°C y temperatura de secado de 17°C para los tres calibres estudiados.

Ingeniería y Tecnología / Otras Ingenierías y Tecnologías / Alimentos y Bebidas / Inocuidad

Palabras clave: *Listeria monocytogenes* / Chacinados / Inocuidad /

Introducción

La *Listeria monocytogenes* es una bacteria patógena que causa listeriosis, enfermedad poco común pero potencialmente grave que constituye un problema de salud pública a nivel mundial (Buchanan, 2017). En Estados Unidos se reportan anualmente 1455 hospitalizaciones, por ingesta de *L. monocytogenes*, de las cuales 255 resultan letales (Scallan, 2011a,b). En Uruguay se registra un promedio de tres casos por año. Durante el 2016 hubo un aumento de casos de listeriosis invasiva, se presentaron 13 casos de los cuales cuatro fallecieron (MSP, 2017). La listeriosis se produce por la ingesta de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. Los alimentos asociados frecuentemente con brotes y con alto nivel de riesgo son los productos listos para el consumo (Buchanan et al., 2017). En este grupo de alimentos están los chacinados secos fermentados. Estos, se consideran alimentos de riesgo moderado (USDA, 2003) y fueron asociados con varios brotes de listeriosis (Adams, 2002). 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.

En estos productos la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*, proveniente de materias primas y ambiente, se logra por el descenso del pH y de la actividad de agua (*a_w*) que se produce durante las etapas de fermentación y secado en combinación con altos porcentajes de sal (Girard, 1991). Pueden utilizarse también agentes reguladores de pH como el lactato de sodio (Degenhardt, 2007, Pellicer, 2011). El descenso de pH durante la fermentación se da por la acción de bacterias ácido lácticas (BAL) ya sea provenientes de la materia prima, del ambiente o adicionadas como cultivos iniciadores (Girard, 1991). Las BAL producen ácido láctico reduciendo paulatinamente el pH del producto desde valores entre 5.8 y 6.0 (carne cruda) hasta valores entre 4.4 y 5.0. La reducción del pH va a depender de la concentración de BAL, de los azúcares disponibles para la fermentación y de la temperatura (Casaburi, 2008). Los cultivos iniciadores son combinaciones de *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus acidilactici* y estafilococos coagulasa negativos como *Staphylococcus carnosus* y *xilosus* (Casaburi, 2007, 2008; Castellano, 2017). Además, las BAL pueden producir bacteriocinas las cuales tienen un efecto listericida (Drosinos, 2006). 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 (RSA-CONICET, 2017; Hutkins, 2006). En la etapa de secado se produce la disminución de la *a_w*. La *a_w* final 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 (RSA-CONICET, 2017; Hutkins, 2006). En Uruguay, el reglamento vigente establece ausencia de *L. monocytogenes* en 25 gramos durante toda su vida útil

(DGS/G/N°96/013). Un relevamiento de alimentos nacionales 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, 2017). Este dato sugiere que no todos los chacinados secos producidos en Uruguay cumplen con el criterio establecido presentando un riesgo potencial de salud. En nuestro país, no hay estudios que demuestren que el proceso de elaboración de chacinados secos fermentados inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes* ni cuáles son las condiciones óptimas del proceso para lograrlo. Tampoco hay parámetros de producto establecidos, como valores de pH y a_w , que indiquen cuando es seguro comercializar el producto cumpliendo el criterio de ausencia en 25 gramos. Para estudiar estos aspectos pueden utilizarse modelos predictivos que 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, a_w y temperatura (Mataragas, 2015a y b; Polese, 2011). Hay modelos más complejos que incorporan el factor tiempo como plantea Polese (2017) que recopila datos de la literatura y modela la probabilidad de crecimiento en función de pH, a_w , ácido láctico y uso de cultivos iniciadores. En general estos modelos no incluyen variables de proceso como las temperaturas de fermentación y secado o el diámetro del producto ya que se basan en la producción de salames artesanales en las que estas variables están poco controladas. Estos modelos están elaborados para poder verificar que se alcanzaron los criterios establecidos en el Reglamento (CE) 2073/2005. Cuando a_w 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 (Mataragas 2015, Adams 2002). 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 crecimiento de *L. monocytogenes* en función de variables ambientales en cultivo (Buchanan, 1990) y en productos cárnicos (Dussault, 2016; Seman, 2002). No hay reportado un RSM que vincule parámetros operacionales y de formulación con crecimiento de *Listeria monocytogenes* en productos fermentados.

En este estudio tomamos como modelo el salame ya que es el chacinado seco de mayor consumo en nuestro país. El mismo es una mezcla de carne (porcina y bovina) con grasa porcina, adicionada de sales. En general contienen nitrito, 250 ppm; sal, 3%; nitrato, 300 ppm; ácido ascórbico 0.2 %. A esta mezcla se le agregan los cultivos iniciadores y los azúcares correspondientes. El salame se presenta en varios diámetros, tipo de picado (grueso o fino) y con adición de especias para dar los distintos productos que se encuentran en el mercado. En este estudio, se trabajará con salames de calibre entre 5.1 y 13,2 cm.

En suma, este proyecto utilizó la Metodología de Superficie de Respuesta para modelar el efecto de las diferentes condiciones de proceso aplicadas en la industria nacional sobre el crecimiento de *L. monocytogenes*. Para ello, se realizó un diseño experimental donde las variables fueron: temperatura de fermentación, temperatura de secado, diámetro del producto (calibre) y la adición o no de lactato de sodio para un tipo de cultivo iniciador seleccionado previamente. Estas variables que se estudiaron son las que más inciden sobre los valores de pH y a_w y por lo tanto las que determinan la eficacia del proceso en el control de *Listeria monocytogenes*. Para cada conjunto de variables se determinó la reducción total de *Listeria*. Además, se obtuvo para cada condición la evolución de a_w y pH en el tiempo. Se pretende alcanzar una reducción total de por lo menos 3 log de *L. monocytogenes* en el producto final, tomando como referencia que la concentración máxima encontrada en carne fresca es de $10E3$ ufc/g (RSA-CONICET, 2017). Este estudio se realizó inoculando la mezcla perteneciente a cada condición experimental con una cepa de *L. innocua* como microorganismo modelo (Friedly, 2008). De esta forma se evitó la contaminación del equipo procesador con un patógeno de riesgo.

Metodología/diseño del estudio

El objetivo de este proyecto es optimizar, mediante la metodología de superficie de respuesta, las condiciones de proceso aplicadas durante la elaboración de chacinados secos (salames) a nivel nacional, que garanticen ausencia de *Listeria monocytogenes* en 25 gramos de dicho producto. Por lo tanto, la hipótesis de este trabajo es que mediante la obtención de un modelo predictivo utilizando la metodología de superficie de respuesta se podrán optimizar los parámetros del proceso que garanticen una reducción de por lo menos 3 log ufc/g de *Listeria* en los salames producidos en las condiciones de fabricación en Uruguay. $10E3$ ufc/g es el valor máximo que se ha reportado en carne fresca (RSA-CONICET, 2017), por tanto, una reducción de 3 log/g lograría la ausencia de *Listeria* en 25 gramos de producto.

Para ello, utilizando el programa DesignExpert 13.0, se realizó un diseño experimental usando como variables independientes la temperatura de la fermentación, la temperatura de secado, el diámetro del producto (calibre), y la adición o no de lactato de sodio (INS 325) como regulador de acidez. Los rangos de variación de cada variable fueron: temperatura de la cámara de fermentación (24, 27 y 30°C), temperatura de la cámara de secado (14, 17 y 20°C) y diámetro del producto o calibre (entre 5.1, 9.5 y 13.2) y la adición o no de lactato de sodio (0 y 2%). En lo que respecta a la cantidad de

lactato de sodio a agregar a la mezcla, en la legislación nacional no se establece un límite máximo por lo cual se adicionó un 2%, cantidad que habitualmente se usa en estos productos según lo reporta Degenhardt (2007). Para todas las condiciones ensayadas la humedad relativa en la cámara de fermentación y la humedad relativa en la cámara de secado se fijó en 90% y 78% respectivamente. Las formulaciones correspondientes a cada conjunto de variables se prepararon en la planta piloto de Latitud que cuenta con cutter, mezcladora, embudidora a vacío, clipeadora y cámaras de maduración y secado. Se trabajó con una mezcla base de carne y grasa. En la planta piloto de Latitud se agregaron los ingredientes que se mantuvieron constantes (nitritos, sal, ácido ascórbico, cultivo iniciador, nuez moscada, coriandro, pimienta negra, ajo deshidratado, y azúcares según recomendaciones del fabricante) y la adición o no de lactato de sodio de acuerdo al diseño. Se inoculó con $10E7$ ufc/g (equivalente a un nivel de $7 \log/g$) de *Listeria innocua* ATCC 33090, nivel suficiente para poder cuantificar la reducción de al menos $3 \log$ ufc/g. Consideramos que no es conveniente utilizar *L. monocytogenes* en la planta piloto de Latitud y por ello utilizamos *L. innocua* como microorganismo sustituto (Friedly, 2008). Luego de mezclado y embutido, se colocaron en la cámara de fermentación y posteriormente en la de secado. Los productos así obtenidos se analizaron para recuentos de *L. innocua* a los 0, 2, 7, 14, 21, 28, 35, 42, días, mientras que a los 0, 1, 2, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días se realizaron las medidas de pH, aw y pérdida de peso.

En cuanto a los cultivos iniciadores utilizados, en el mercado nacional encontramos principalmente 4 tipos. Dos de ellos contienen los mismos microorganismos: *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus xylosum* y *Staphylococcus carnosus* por lo cual se seleccionó uno para el desarrollo del proyecto. De los otros dos cultivos iniciadores, uno contiene *S. xylosum* y *P. pentosaceus* y el otro, *S. xylosum*, *L. curvatus* y *P. acidilactici*. En resumen, se evaluaron tres tipos de cultivos iniciadores, uno que contiene *L. sakei*, *S. xylosum* y *S. carnosus*, otro que contiene *S. xylosum* y *P. pentosaceus* y otro que contiene *S. xylosum*, *L. curvatus* y *P. acidilactici*. Los mismos se aplicaron en cantidades de $10E7$ UFC/g (cantidad recomendada por los proveedores de los cultivos). Se seleccionó el cultivo iniciador que obtuvo en una masa previamente inoculada con *Listeria innocua* ATCC 33090 el menor recuento final de *Listeria* luego de 48 horas de fermentación. Para cada cultivo iniciador se agregaron los tipos de azúcares necesarios de acuerdo a las especificaciones declaradas por cada fabricante.

Para cada condición experimental las respuestas medidas fueron: la reducción de *Listeria* a la salida de la fermentación (expresada en \log ufc/g y se calculó como la diferencia entre los recuentos de *Listeria* en la masa inicial y los recuentos de *Listeria* luego de 48 horas de fermentación, para cada condición ensayada), el pH alcanzado a la salida de la fermentación, la reducción total de *Listeria*, la aw y la pérdida de peso a los 40 días. También para cada condición ensayada se obtuvieron las curvas de pH, aw y recuentos de *Listeria* en función del tiempo. A partir de los recuentos de *Listeria* se modeló el comportamiento de dicha bacteria en el producto obtenido para cada condición en el tiempo, utilizando el modelo DMFit disponible en el portal libre Combase como lo reporta Novelli (2017).

Previo a realizar las diferentes producciones de salames con las diferentes condiciones experimentales estipuladas, se realizó una producción piloto para definir condiciones y capacidades de producción (tiempo de cutter, tiempo de mezclado, tamaño de batch, tiempos de proceso, largo de tripa a cortar y rendimientos), funcionamiento de cámaras de fermentación y secado y para comprobar homogeneidad del inóculo en la mezcla inicial.

Los métodos usados para las diferentes determinaciones analíticas fueron los siguientes:

- Medidas de pH: el pH se medirá sobre una muestra diluida y homogeneizada de 3 g de salame y 30 ml de KCl 0,1 M según ISO 2917:1999. Se midió directamente con el electrodo de pincho calando en 3 puntos diferentes hasta una profundidad similar a la mitad del grosor del salame. Para los salames de calibre chico (5.1 cm), se utilizaron dos piezas por tiempo de medida. Para el caso de los salames de calibre intermedio y grande (9.5 y 13.5 cm) se dividió imaginariamente la pieza a la mitad transversalmente de tal forma que cada lado se trató como muestra independiente. Los salames fueron tratados del mismo modo para las medidas de aw.

- Medidas de aw: la actividad de agua se midió con un equipo AquaLab Pawkit (Decagon, Washington, USA) según la norma ISO 21807: 2004.

- Cuantificación de *Listeria innocua*: Para la cuantificación de *Listeria innocua* en los salames se transfirió aseptícamente 10 gramos de salame 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. Para cada muestra de salame se realizan tres diluciones en buffer Butterfield. Se plaquearon por duplicado 100 μ L de las diluciones correspondientes del homogeneizado en placas de agar Palcam con agregado del suplemento selectivo para Palcam (SR0150 Thermo), y se incubaron 48 horas a 37°C. Se realizaron los recuentos de *Listeria*. Los resultados de los recuentos para cada tiempo de ensayo se promediaron, se transformaron en logaritmos y se expresaron como reducción en \log de *Listeria* por gramo de salame en comparación con los recuentos a tiempo cero.

Resultados, análisis y discusión

Se evaluaron 3 cultivos iniciadores disponibles en Uruguay, el cultivo 1 que contiene *L. sakei*, *S. carnosus* y *S. xylosum*; el cultivo 2 que contiene *S. xylosum* y *P. pentosaceus*, y el cultivo 3 que contiene *S. xylosum*, *L. curvatus* y *P. acidilactici*. Cada uno se ensayó inoculando con dos niveles de *Listeria innocua* ATCC 33090 (8 log ufc/g y 6 log ufc/g). El mayor nivel de reducción se alcanzó a las 48 horas. El cultivo iniciador 1 alcanzó una reducción de *Listeria* de 1.9 y 1.5 Log ufc/g, el cultivo 2 0.56 y 0.38 log ufc/g para el nivel alto y bajo de inoculación, mientras que el cultivo 3 alcanzó reducciones mayores a 3 log ufc/g para ambos niveles de inoculación. Por tanto, en este proyecto se decidió utilizar el cultivo iniciador 3 y fermentar 48 horas para realizar las diferentes producciones según la matriz de diseño (ver Tabla 1 en adjuntos)

Los resultados del diseño experimental se analizaron mediante un modelo de superficie de respuesta. El efecto de las variables sobre las respuestas estudiadas se evaluó por separado según presencia o ausencia de lactato y se obtuvieron modelos que explican el comportamiento de la reducción total de *Listeria*, la actividad de agua y la pérdida de peso en el producto al final del proceso (40 días).

En ausencia de lactato, el modelo obtenido indica que la temperatura de fermentación y la interacción entre la temperatura de fermentación y secado tienen un efecto significativo sobre la reducción total de los recuentos de *Listeria* al final del proceso. (ver Figura 1a en adjuntos). El efecto del calibre sobre la reducción de *Listeria* también fue significativo, pero afectó en menor magnitud que las temperaturas. La reducción esperada de *Listeria*, de por lo menos 3 log, se alcanzó a las 48 horas de fermentación para todas las temperaturas de fermentación y calibres ensayados y se mantuvieron durante el secado. La evolución en los recuentos de *Listeria* durante el secado (Gráfica 3 y 4) para cada condición experimental se modeló utilizando el programa DMfit accesible en el portal Combase y las tasas máximas de crecimiento estimadas variaron entre (-0.072 y 0.087 log ufc g-1día-1) indicando que los cambios en los recuentos de *Listeria* no fueron significativos durante el secado.

La actividad de agua a los 40 días varió entre 0.93 y 0.81. La temperatura de secado, el calibre, el término cuadrático de la temperatura de fermentación y el término cuadrático del calibre tuvieron un efecto significativo sobre la actividad de agua final.

El porcentaje de pérdida de peso final varió entre 22 y 41% y se observó un efecto de las tres variables estudiadas, así como de sus términos cuadráticos y de la interacción del calibre con las temperaturas de fermentación y secado. El calibre es la variable que presentó mayor efecto.

En presencia de 2% de lactato el modelo obtenido indica que hay un efecto significativo de la temperatura de fermentación, de la temperatura de secado, del calibre y de la combinación entre estas tres variables en la reducción total de *Listeria*. La temperatura de secado fue la variable que menos incidió en esta respuesta (ver Figura 1b en adjuntos). En presencia de lactato hay varias condiciones de proceso ensayadas en las que no se alcanzó la reducción de *Listeria* esperada de 3 log.

En todas las condiciones experimentales ensayadas, tanto con lactato como sin lactato, las curvas de pH obtenidas muestran un descenso rápido durante la fermentación (ver Gráficas 1 y 2 en adjuntos) debido al rápido desarrollo de las bacterias ácidas lácticas agregadas como cultivo iniciador. Luego de la fermentación, se observó un aumento gradual del pH debido a las reacciones proteolíticas que generan amoníaco, péptidos y aminoácidos que normalmente ocurren durante la maduración y secado del producto (Tirloni et al, 2019). Sin embargo, en ningún caso se alcanzaron los valores restrictivos de pH (menor o igual a 4.4) para el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, ni la combinación de aw/pH restrictiva (menor o igual a 0.94/menor o igual a 5.0).

Analizando el pH y la reducción de *Listeria* alcanzados al final de la fermentación (sin incluir el secado), se obtiene un modelo que muestra la dependencia del lactato y de la temperatura de fermentación en los valores de pH y reducción de *Listeria* alcanzados. En las condiciones ensayadas el calibre no tuvo efecto significativo sobre el pH a la salida de la fermentación (ver Figura 2 en adjuntos).

En ausencia de lactato de sodio los valores de pH alcanzados estuvieron entre 4.86 y 5.26. Para una misma temperatura de fermentación y sin importar el calibre, el pH a la salida de fermentación fue siempre menor que el alcanzado con 2% de lactato de sodio (5.05 y 5.53). En ambos escenarios, con y sin agregado de lactato de sodio, a medida que aumenta la temperatura de fermentación (de 24 a 30°C) el pH final disminuye. En este sentido, se ha reportado que 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 del patógeno (Gounadaki et al., 2005).

Con respecto a la reducción de *Listeria*, con 2% de lactato de sodio se evidenció que a temperaturas de fermentación menores a 30°C no se alcanzó la reducción de por lo menos 3 log ufc/g de *Listeria*. Sin el agregado de lactato se alcanzó en todas las condiciones ensayadas reducciones de *Listeria* de 3 Log o mayores al final de la fermentación y la temperatura de fermentación casi no tuvo incidencia en el valor final de reducción de *Listeria* (ver figura 3 en adjuntos). El

lactato de sodio tiene efecto bacteriostático tanto para *L. monocytogenes* como para bacterias ácido lácticas. La diferencia observada entre la reducción en los recuentos de *Listeria* con y sin agregado de lactato de sodio (menores para el segundo caso) indica que dicho compuesto afecta el crecimiento de bacterias ácido lácticas y por tanto incide en el valor de pH alcanzado al final de la fermentación. Este comportamiento del lactato de sodio ya fue reportado por Deumier (2003).

El análisis de los resultados utilizando la metodología de superficie de respuesta permite definir los parámetros del proceso (fermentación y secado) que satisfacen las siguientes condiciones: máxima reducción de *Listeria*, máximo porcentaje de pérdida de peso y mínima actividad de agua en el producto final. Las condiciones se cumplen en ausencia de lactato de sodio, temperatura de fermentación de 30°C y temperatura de secado de 17°C para todos los calibres. El modelo se verificó ensayando estas condiciones óptimas de las variables del proceso y se obtuvieron valores que estuvieron comprendidos dentro del intervalo de confianza (95%) del valor predicho por el modelo.

Conclusiones y recomendaciones

Con el cultivo iniciador usado y sin agregado de lactato de sodio, la reducción esperada de 3 log de *Listeria* se alcanza a las 48 horas de fermentación, independientemente del calibre y de la temperatura de fermentación. De acuerdo a los resultados obtenidos en este proyecto, se observa que no ocurren cambios significativos en la reducción de *Listeria* durante el secado. Esto hace que la fermentación sea la etapa crítica del proceso para lograr la inocuidad del producto. Dada la incidencia negativa sobre la fermentación que tiene el lactato de sodio (en la concentración utilizada) no se recomienda su uso en los salames. Hasta el momento no se han reportado estudios similares que modelen el comportamiento de *Listeria* en las condiciones de producción nacional. Estos resultados podrán ser utilizados tanto por la industria como organismos reguladores y evaluadores de riesgo ya que contarán con una herramienta más que permitirá ajustar el proceso y predecir el comportamiento del patógeno.

Referencias bibliográficas

- Adams, M., Mitchell, R. (2002). Fermentation and pathogen control: A risk assessment approach. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 75–83.
- Braga, V., et al. (2017). Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Montevideo - Uruguay. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4):689-694.
- Buchanan, R. L., & Philips, 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.
- 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.
- Casaburi, A., Aristoy, MC, Cavella, S., Di Monaco, 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 use of starter cultures. *Meat Science*, 76: 295-307.
- Casaburi, A., Di Monaco, 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.
- Castellano, P., Pérez, Ibarreche, M., Blanco, Massani, M., Fontana, C., Vignolo, G.M. (2017). Strategies for Pathogen Biocontrol Using Lactic Acid Bacteria and Their Metabolites: A Focus on Meat Ecosystems and Industrial Environments. *Microorganisms*, 11; 5 (3).
- Decreto 315/944 (1994). Reglamento Bromatológico Nacional, República Oriental Del Uruguay, segunda edición.
- Degenhardt, R., & Sant'Anna, E. S. (2007). Survival of *Listeria monocytogenes* in low acid Italian sausage produced under Brazilian conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 309–314.
- Dirección General de Servicios Ganaderos. DGSG/N° 96/013, Abril 2018, disponible en http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/dgsg_no_96_12_04_2013.pdf
- Drosinos, E. H., Mataragas, M., Veskovic-Moracanic, S., Gasparik-Reichardt, J., Hadziosmanovic, M., & Alagic, D. (2006). Quantifying non-thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in European fermented sausages using bacteriocinogenic lactic acid bacteria or their bacteriocins: a case study for risk assessment.
- 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. *Meat Science*, 65(3):1165-74.
- Dussault, D., Vu, K. D., 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.
- EUR Lm, 2014 European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* (EUR Lm) EUR Lm technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods Disponible en: [http://www.fsai.ie/uploadedFiles/EURL%20Lm_Technical%20Guidance%20Document%20Lm%20shelflife%20studies_V3_2014-06-06%20\(2\).pdf](http://www.fsai.ie/uploadedFiles/EURL%20Lm_Technical%20Guidance%20Document%20Lm%20shelflife%20studies_V3_2014-06-06%20(2).pdf) (2014) (Accessed 29 August 16)
- Friedly, E. C., Crandall, P. G., Ricke, S., O'bryan, C. A., Martin, Em., Boyd, L. M. (2008). Identification of *Listeria innocua* surrogates for *Listeria monocytogenes* in hamburger patties. *Journal of Food Science*, 73(4), M174−178.
- Girard, J. P. (1991). Tecnología de la carne y de los productos cárnicos. Zaragoza, S.A: Editorial Acribia, ISBN 84-200-0700-5.
- Gounadaki, A.S., Skandamis, P.N., Drosinos, E.H., Nychas G-J.E. (2007). Effect of Packaging and Storage Temperature on the Survival of *Listeria monocytogenes* Inoculated Postprocessing on Sliced Salami. *Journal of Food Protection*, (70)10, 2313–2320.
- Hutkins, R. W. (2006). Meat Fermentation. In R. Hutkins, *Microbiology and Technology of Fermented Foods* (pp. 207–232). Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Mataragas, M., Bellio, A., Rovetto, F., Astegiano, S., Decastelli, L., Cocolin, L. (2015a). Risk-based control of food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in the Italian fermented sausages Cacciatore and Felino. *Meat Science*, 103, 39–45.
- 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.
- Ministerio de Salud Pública, Boletín epidemiológico, Mayo 2017, disponible en <http://www.msp.gub.uy/publicación/boletín>

epidemiológico-mayo-2017

- Novelli, E., Dal Santo, L., Balzan, S., Cardazzo, B., Spolaor, D., Lombardi, A., Fasolato, L. (2017). Analysis of process factors of dry fermented salami to control *Listeria monocytogenes*. *Italian Journal of Food Safety*, 6(1), 28–33.
- Pelliceri, K., Copes, J., Giannuzzi, L., 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.
- Polese, P., Del Torre, M., Spaziani, M., Venir, E., Stecchini, M. L. (2011). A simplified approach for modeling the bacterial growth/no growth boundary. *Food Microbiology*, 28, 384-391.
- Polese, P.; Del Torre, M.; Stecchini, M.L. (2016). 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.
- Red de Seguridad Alimentaria del CONICET. (2017). Evaluación de riesgos de *L. monocytogenes* en chacinados embutidos secos y salazones crudas. 1–82. (<https://rsa.conicet.gov.ar/wp-content/uploads/2018/04/Informe-Final-2-ECR-Listeria-en-embutidos-y-salazones-RSA.pdf>)
- Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a criterios microbiológicos aplicables a productos alimenticios, Abril 2018, disponible en <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=celex:32005R2073>.
- Scallan, E., Griffin, P.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Hoekstra, R.M., (2011a). Foodborne illness acquired in the United States- unspecified agents. *Emerging Infectious Diseases*, 17 (1) 16-22.
- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., (2011b). Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 17 (1), 7-15.
- 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.
- Tirioni, 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. *Ital J Food Safety*, 8:8112.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)