

**Validación de intervenciones post letales para
controlar *Listeria monocytogenes* en
productos de res y aves listos para el consumo**

Daniela Raquel Chavez Velado

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Validación de intervenciones post letales para controlar *Listeria monocytogenes* en productos de res y aves listos para el consumo

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Daniela Raquel Chavez Velado

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2019

Validación de intervenciones post letales para controlar *Listeria monocytogenes* en productos de res y aves listos para el consumo

Daniela Raquel Chavez Velado

Resumen. *Listeria monocytogenes* es uno de los patógenos de mayor preocupación en los productos listos para el consumo (RTE) ya que causa la enfermedad invasiva llamada listeriosis. Actualmente, la industria busca alternativas para controlar este patógeno después de los procesos letales. En este estudio se evaluó el uso de intervenciones químicas de etiqueta limpia como una intervención "listeriostática" en un producto de aves y se determinó la sobrevivencia de *L. monocytogenes* en un producto de res RTE durante pasteurización posterior al empaque (PPP). Se evaluaron tres temperaturas (37, 25 y 4 °C) en diferentes días (0, 1, 2, 5 y 7) en músculo, piel y piel de pavo tratada con Flavo®Fresh. Se evaluó la sobrevivencia de *L. monocytogenes* en PPP en jerky de res a una temperatura de 77 °C de 0.5 a 6 minutos. La utilización de Flavo®Fresh fue más efectiva a altas temperaturas de aplicación por más tiempo de contacto logrando controlar más de 6.13 ± 0.52 logaritmos de la población inicial. Para los jerkys de res se determinó un valor D de 0.652 minutos; para reducir la concentración inicial se necesita que el producto esté en contacto con la temperatura de 77 °C y la mantenga por al menos 5.04 minutos, Flavo®Fresh se considerada una intervención "listerioestática" ya que logra controlar al patógeno, pero no lo elimina por completo. El tratamiento de pasteurización posterior al empaque es eficaz en controlar la concentración inicial a partir del minuto 5.04.

Palabras claves: Contaminación post empaque, jerky, pasteurización posterior al empaque, patógeno, psicrotrofo, pavo.

Abstract. *Listeria monocytogenes* is one of the most concerned pathogens in Ready-to-Eat (RTE) products because it causes the invasive disease called listeriosis. Currently, the industry is looking for alternatives to control this pathogen after lethal processes. In this study, the use of clean label chemical interventions as a "listeriostatic" intervention in poultry products was evaluated, and the survival of *L. monocytogenes* was determined in RTE beef products during Post Packaging Pasteurization (PPP). Three temperatures (37, 25 and 4 °C) were evaluated at different days (day 0, 1, 2, 5 and 7) in muscle, skin and skin of turkey treated with Flavo®Fresh. The survival of *L. monocytogenes* in PPP on beef jerky at a temperature of 77 °C from 0.5 minutes to 6 minutes was also evaluated. The use of Flavo®Fresh was more effective at high application temperatures for longer contact time, controlling more than 6.13 ± 0.52 logarithms of the initial population. For beef jerkys a D-value of 0.652 minutes was determined; it is necessary that the product stay in contact with the temperature of 77 °C and keep it for at least 5.04 minutes. Flavo®Fresh is considered a "listeriostatic" intervention because it manages to control the pathogen, but does not eliminate it completely. The post-package pasteurization treatment is effective starting at minute 5.04 to control the initial concentration.

Key words: Jerky, post packaging pasteurization, psychrotroph, post packing contamination, turkey.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4. CONCLUSIONES.....	13
5. RECOMENDACIONES	14
6. LITERATURA CITADA.....	15
7. ANEXOS.....	17

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> usadas en este estudio, aisladas de productos crudos y listos para el consumo relacionados a brotes de listeriosis.....	3
2. Ingredientes, propiedades físicas y químicas, información nutricional de Flavo®fresh Radid.....	4
3. Codificación de las muestras de pavo ahumado tratado y no tratado con Flavo®Fresh.....	5
4. Identificación de las muestras usadas para la determinación de la curva de mortalidad de <i>Listeria monocytogenes</i>	6
5. Resultados de pH y aw de pavo ahumado listo para el consumo.....	10
6. Resultados de aw de pavo ahumado listo para el consumo.....	10

Figuras	Página
1. Sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de pavo expuestas a diferentes temperaturas y días de almacenamiento.....	9
2. Curva de supervivencia de un cóctel de <i>Listeria monocytogenes</i> en Jerky de res, a 77°C observado de 0 a 6 minutos.....	12

Anexos	Página
1. Mejor escenario: concentración inicial de 6 logaritmos, no crecimiento (muestras tratadas con Flavo®Fresh).....	17
2. Peor escenario: concentración de 9 logaritmos, crecimiento (muestras no tratadas).....	18
3. Esquema de plateado cubriendo todos los escenarios de crecimiento.....	19
4. Sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en pavo a diferentes temperaturas y tiempo.....	19
5. Sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en pavo a diferentes temperaturas y días en músculo de pavo.....	21
6. Sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en pavo a diferentes temperaturas y días en piel de pavo ahumada.....	22
7. Sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en pavo a diferentes temperaturas y días en piel de pavo ahumada con Flavo®Fresh.....	24

1. INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es un patógeno del ambiente que tiene la capacidad de contaminar carnes y productos avícolas listos para consumo (RTE) y causar la enfermedad invasiva llamada listeriosis. De acuerdo al CDC (Centers for Diseases Control and Preventions) un estimado de 1,600 personas se enferman de listeriosis cada año, 1,500 son hospitalizados y cerca de 260 muertes ocurren anualmente en los Estados Unidos (CDC 2019). Mujeres embarazadas, personas de la tercera edad y personas inmunocomprometidas tienen mayor riesgo de adquirir listeriosis al momento de consumir comida contaminada con *L. monocytogenes* (CDC 2019).

Listeriosis es caracterizada por un relativo alto porcentaje de mortalidad comparada con otras enfermedades causadas por otros patógenos: 20% comparada con <1% de *Salmonella* y *E. coli* O157 (FDA 2017). Es por esto que tanto el USDA-FSIS (U.S Department of Agriculture's Food Safety and Inspection Service) y el FDA (U.S Food and Drug Administration), determinaron cero tolerancias en productos listos para consumo, declarando la presencia de *Listeria monocytogenes* como un “adulterante” y un “agente agregado” dañino para los consumidores (Gande y Muriana 2003). La listeriosis se asocia comúnmente con los alimentos listos para consumo o en inglés Ready-to-eat (RTE) (FDA 2003). Los alimentos que presentan el mayor riesgo de listeriosis son aquellos alimentos RTE que tienen características intrínsecas (pH > 4.4, actividad del agua > 0.92) (Knipe 2014) que apoyan el crecimiento de *L. monocytogenes*.

La refrigeración es menos efectiva como medida de control para *L. monocytogenes* porque, aunque las temperaturas por debajo del punto de congelación evitan el crecimiento de *L. monocytogenes*, este puede multiplicarse lentamente a temperaturas de refrigeración (FDA 2003). Este patógeno tiene la capacidad de formar biopelículas en equipos de procesamiento de alimentos y es tolerante al calor y la sal. Algunos estudios indican que *L. monocytogenes* a menudo se transfiere a través de contaminación cruzada y sugieren que un producto RTE terminado puede contaminarse con *L. monocytogenes* en el empaque final (Nesbakken *et al.* 1996).

Según el USDA, un tratamiento post letal se define como un tratamiento de letalidad que se aplica o es efectivo después de la exposición letal aplicado al producto final o al empaque del producto sellado, para reducir o eliminar el nivel de patógenos resultantes de la contaminación de la exposición post letal (USDA FSIS 2012). Si bien las intervenciones post letales pueden ofrecer una letalidad inicial y los antimicrobianos naturales pueden tener un efecto bacteriostático, existe aún la preocupación sobre la recuperación y el crecimiento

potencial de *L. monocytogenes* durante la vida de almacenamiento del producto. Estas preocupaciones crean la necesidad de investigar “obstáculos” adicionales para controlar completamente *L. monocytogenes* en productos de carne y aves RTE.

Actualmente han surgido nuevas tecnologías y enfoques para ayudar a reducir el riesgo de contaminación posterior al procesamiento, incluidos los tratamientos químicos antimicrobianos, la irradiación y los procesos térmicos y no térmicos, como la pasteurización posterior al empaque o Post Packaging Pasteurization (PPP). La pasteurización de superficie se está convirtiendo en un proceso eficaz para reducir el riesgo de recontaminación de *L. monocytogenes* en productos de carne RTE. Otro tratamiento eficaz que utiliza la industria para reducir el riesgo de contaminación de *L. monocytogenes* es la adición de antimicrobianos en la formulación de los alimentos durante la producción; por ejemplo, los ácidos orgánicos como el ácido sórbico en quesos y la combinación de ácido sórbico y ácido benzoico utilizados en ensaladas, así como las sales de los ácidos láctico y diacético (Gande y Muriana 2003).

En este estudio, se evaluó un producto comercial utilizado como tratamiento de superficie en productos de carne y aves RTE, para reducir el riesgo de contaminación por *L. monocytogenes*. El producto fue desarrollado por la compañía EARLEE PRODUCTS de Australia y es una mezcla de ácidos orgánicos llamada FLAV®FRESH RAPID. Esta intervención antimicrobiana se puede utilizar en productos cárnicos crudos y cocidos; por consiguiente, los objetivos de este estudio fueron:

- Evaluar el uso de intervenciones químicas de etiqueta limpia como una intervención “listericida” o “listeriostática” en productos de carne de aves procesados.
- Determinar la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en productos de res listos para el consumo durante pasteurización posterior al empaque.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio.

El estudio se realizó en la Universidad Texas Tech, ubicada en la ciudad de Lubbock, Texas, Estados Unidos. Toda la preparación de materiales, inoculación, incubación y análisis de datos se realizó en el laboratorio de microbiología de alimentos del Departamento de Ciencia Animal y Ciencia de los Alimentos dentro de la Universidad.

Activación de cultivos.

Se evaluaron cuatro cepas de *Listeria monocytogenes* (cuadro 1): N1-002, ATCC® 19118™, ATCC® 51414™, ATCC® 49594™, las cuales están relacionadas a brotes en alimentos crudos y listos para el consumo (ATCC 2019). Estas cepas se aislaron por separado con tres días de anterioridad en Agar Modificado Oxford (MOX). Se tomó una alícuota del cultivo preservado a -80 °C con un asa estéril de 10 µl y se realizó un estriado en MOX. Estos se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Se seleccionó una colonia aislada de cada cepa y se inoculó en 9 ml de caldo Brain Heart Infusion (BHI) seguido por incubación de 37 °C por 24 horas. Se continuó con una segunda transferencia de la bacteria después de las 24 horas, para ello se tomó 1 ml del inóculo y se transfirió a 9 ml de caldo fresco (BHI) seguido por incubación a 37 °C por 24 horas nuevamente. Al culminar el tiempo de incubación se mezclaron las cuatro cepas para conseguir un coctel de *L. monocytogenes* con una concentración de 10⁹ CFU/mL que se confirmó realizando diluciones decimales en MOX. Se hicieron dos diluciones del cultivo para obtener una concentración de 10⁷ CFU/mL que se usó para inocular las muestras.

Cuadro 1. Cepas de *Listeria monocytogenes* usadas en este estudio, aisladas de productos crudos y listos para el consumo relacionados a brotes de listeriosis.

Nombre de la cepa	Aislamiento	Característica
ATCC® 19118™	Pollos, Inglaterra	Propiedades Antigénicas Serotipo 4e
ATCC® 51414™	Leche cruda, Massachusetts	Inactivación térmica y recuperación
ATCC® 49594™	Derivada de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	
N1-002	Pescado listo para el consumo, Nueva York.	

Intervención química con FLAV®FRESH RAPID en pavo.

Para este estudio se utilizaron pavos enteros cocinados y ahumados provenientes de una empresa procesadora de pavos de Dallas, Texas. Se dividieron en tres tratamientos, se tomaron muestras del interior del músculo del pavo, muestras de la superficie del pavo y muestras de la superficie ahumada que fueron tratadas con Flav®Fresh Rapid (Cuadro 2). Cada uno de estos se combinaron con diferentes temperaturas (4, 25 y 37 °C) que representan escenarios a los que se podría exponer al producto en lo largo de la cadena de distribución. Cada tratamiento constó de tres repeticiones y tres réplicas con nueve muestras para cada tratamiento sumando un total de 189 muestras. Los tratamientos, los días, las temperaturas y las muestras se detallan en el cuadro 3.

Cuadro 2. Ingredientes, propiedades físicas y químicas, información nutricional de Flavo®fresh Radid (EARLEE products 2018).

Ingredientes	Contenido
Agua	94%
Ácido láctico (270), ácido acético (260)	Balance restante
Extracto cítrico	Balance restante
Propiedades físicas y químicas	Característica
Estado físico	Líquido
Color	Incoloro
Olor	Limón
Sabor	Limón
Solubilidad	Soluble en agua
pH	2.1 ± 0.2
Información nutricional	Promedio por 100g
Energía (kJ)	80.0
Carbohidratos totales (g)	5.0
-azúcares (g)	<1.0
Proteína (g)	<1.0
Grasa total (g)	<1.0
-saturada (g)	<1.0
Sodio (mg)	<10

Cuadro 3. Codificación de las muestras de pavo ahumado tratado y no tratado con Flav@Fresh.

Tipo de muestra	Día 0	Temperaturas de almacenamiento de las muestras		
		37 °C	25 °C	4 °C
Músculo	#1, 2, 3	D1 = #10, 11, 12 D2 = #37, 38, 39	D1 = #19, 20, 21 D5 = #46, 47, 48	D1 = #28, 29, 30 D7 = #55, 56, 57
Piel ahumada	#4, 5, 6	D1 = #13, 14, 15 D2 = #40, 41, 42	D1 = #22, 23, 24 D5 = #49, 50, 51	D1 = #31, 32, 33 D7 = #58, 59, 60
Piel ahumada + Flavor Fresh	#7, 8, 9	D1 = #16, 17, 18 D2 = #43, 44, 45	D1 = #25, 26, 27 D5 = #52, 53, 54	D1 = #34, 35, 36 D7 = #61, 62, 63

#1, 2, 3... 63. Codificación de las unidades experimentales.

D1, D2, D5 y D7. Muestras recolectadas después de 1, 2, 5 y 7 días de inoculación y aplicación de tratamiento.

Inoculación de las muestras. Se tomaron muestras de uno a dos gramos aproximadamente de los pavos ahumados, haciendo uso de sacabocado de acero inoxidable, cuchillos y pinzas. Las muestras extraídas corresponden al músculo, a la superficie y de la superficie que tiene como tratamiento la aplicación del Flav@Fresh Rapid (cuadro 2). Las muestras obtenidas se inocularon bajo una campana con 100 µl del cóctel de cepas de *L. monocytogenes*. Se dejó un tiempo de 20 minutos para que la bacteria se adhiriera a la muestra y se sometieron a pruebas a 24 horas en refrigeración (4 °C), a temperatura ambiente (25 °C) por cinco días y a abuso de temperatura (37 °C) por dos días.

Análisis microbiológico. Se tomó cada muestra y se diluyó en 10 mL de BPW (Buffered Peptone Water), se homogenizaron por dos minutos a 230 rpm en un stomacher comercial y se realizaron diluciones decimales en platos de 48 pocillos. Las diluciones se inocularon usando el método de drop dilution por triplicado MOX. Se usó el método de siembra por superficie en el caso de las muestras en las que no se obtuvieron conteos a partir de la dilución 10² en las pruebas preliminares. Las muestras se incubaron a 37 °C por 24 horas. Los resultados se expresaron en Log UFC/g. Las muestras que no mostraron conteos incluso en la siembra de 10⁰ fueron sometidas a enriquecimiento por 24 horas en tubos con BHI a 37 °C y se estriaron nuevamente en MOX.

Análisis químico. Se tomaron muestras para ser sometidas a prueba de pH y actividad de agua (aw), se tomaron muestras de 10 gramos del músculo y la piel del pavo respectivamente, se tomaron muestras de pH y aw antes del almacenamiento al día cero, al día uno y dos para 37 °C, al día uno y cinco para 25 °C y al día uno y siete para las muestras a 4 °C. Los valores de pH se obtuvieron macerando vigorosamente los 10 gramos de la muestra con 90 mL de agua, se usó un potenciómetro Mettler Toledo EL20 (Mettler Toledo; Columbus, Ohio). La actividad de agua fue medida macerando las muestras y haciendo uso del HygroLab Benchtop Indicator (HygroLab, Rotronic Instrument Corp; Hauppauge New York).

Diseño experimental y análisis estadístico. Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA) con medidas repetidas en el tiempo en donde se evaluaron 4 tratamientos: Control (C), Músculo (M), Piel (S) y Piel con Flavo®Fresh (SFF), con tres repeticiones. Se evaluaron tres medidas repetidas en el tiempo para cada temperatura de almacenamiento. Los tratamientos se evaluaron por medio de una separación de medias TUKEY con un nivel de significancia de $P < 0.05$ para determinar si hubo diferencias significativas entre los tratamientos, y entre las medidas repetidas en el tiempo y la interacción que estas pudieran tener entre sí. Los datos fueron analizados con el programa “Sistema de Análisis Estadístico” (SAS) versión 9.5.

Sobrevivencia de *L. monocytogenes* a pasteurización post-empaque en jerky de res.

Para este estudio los trozos de jerky, previamente procesados en el laboratorio de carne de la universidad de Texas Tech fueron completamente cocinados usando The Enviropak™ smokehouse. El jerky fue recortado en porciones de 10 ± 2 gramos e inoculados con 200 μ l del coctel de diferentes cepas de *L. monocytogenes* por ambos lados bajo la campana. Se usó un asa de vidrio para distribuir el inóculo en toda la muestra esperando un tiempo de 20 minutos para permitir que el patógeno se adhiriera a la superficie de la muestra, posterior a esto las muestras fueron empacadas al vacío en bolsas Cryovac® especiales para pasteurización (Sealed Air 2016), usando la empacadora FoodSaver® y se pasteurizaron a 77 °C por diferentes tiempos usando un baño de agua. Se colocaron en hielo por cinco minutos. Se realizaron tres repeticiones por tiempo con tres réplicas cada uno para un total de 36 muestras por repetición (cuadro 4) para obtener una curva de muerte de *L. monocytogenes* en ese rango de tiempo.

Cuadro 4. Identificación de las muestras y tiempos usados para la determinación de la curva de mortalidad de *Listeria monocytogenes*.

Tiempo	ID de la muestra
0.5 minutos	1, 2, 3
1 minuto	4, 5, 6
1.5 minutos	7, 8, 9
2 minutos	10, 11, 12
2.5 minutos	13, 14, 15
3 minutos	16, 17, 18
3.5 minutos	19, 20, 21
4 minutos	22, 23, 24
4.5 minutos	25, 26, 27
5 minutos	28, 29, 30
5.5 minutos	31, 32, 33
6 minutos	34, 35, 36

Análisis microbiológicos. Se tomaron 10 gramos de las muestras de cada producto y se diluyeron en 90 mL de BPW (Buffered Peptone Water), se homogenizaron por dos minutos a 230 rpm en un stomacher comercial y se realizarán diluciones en serie en tubos con 9 mL de BPW. Las diluciones se platearon usando el método de extensión en placa o siembra por superficie en duplicado para cada dilución usando platos de MOX con una capa delgada de Tryptic Soy Agar (TSA). Las muestras se incubaron a 37 °C por 24 horas. Los resultados se expresaron en Log UFC/g. Las muestras con conteos <1 Log UFC/g se enriquecieron en caldo infusión cerebro-corazón (BHI) por 24 horas a 37 °C y se sembraron en MOX

Análisis químico. Se tomaron muestras para ser sometidas a prueba de pH y actividad de agua (Aw). Usando los métodos y equipos mencionados anteriormente.

Diseño experimental y análisis de datos. Para generar la curva de sobrevivencia de *L. monocytogenes* se hizo uso del programa ComBase. Este programa es usado para generar modelos de microbiología predictiva. El modelo para este estudio se construyó introduciendo los tiempos y los logaritmos de UFC de las bacterias sobrevivientes, graficando los logaritmos contra el tiempo. A partir de esta curva de muerte térmica se obtuvo la pendiente, el ajuste del modelo y el error.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Intervención química con FLAV®FRESH RAPID en pavo.

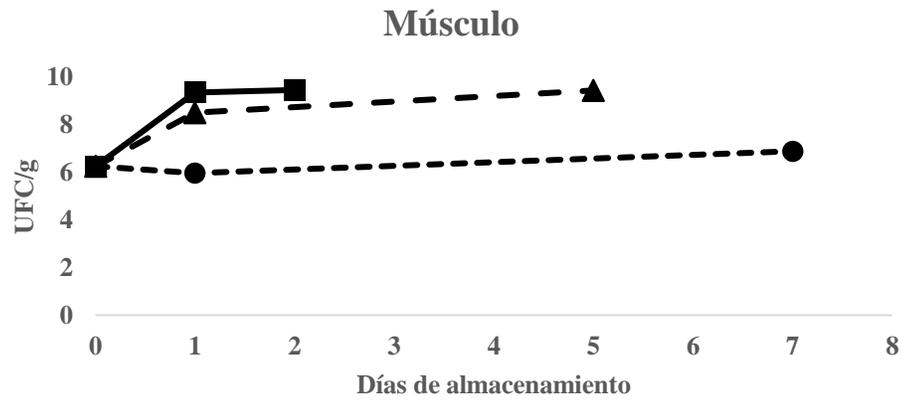
Se obtuvo un coctel de cepas de *Listeria monocytogenes* con una concentración de 9.10 ± 0.02 logaritmos UFC/ml, al cual se le hicieron diluciones decimales hasta 7 log para lograr una concentración final en las muestras de 6.13 ± 0.52 logaritmos de UFC/g.

Las temperaturas evaluadas en este estudio demuestran ser significativas en los diferentes tratamientos evaluados ($P < 0.0001$) analizadas al día 1. El músculo que no tenía ningún tipo de tratamiento mantuvo sus conteos comparados con el día 0 a temperatura de refrigeración. Aunque hubo un aumento en el conteo de colonias para todos los tratamientos a la temperatura de 4 °C se logra controlar más el crecimiento a comparación de 25° y 37 °C. Un factor importante relacionado a listeriosis es que el patógeno puede crecer en un rango de temperatura de 0° a 45 °C, su temperatura de crecimiento óptimo es de 37 °C y puede crecer significativamente a temperaturas de refrigeración si se le da el tiempo suficiente (FAO y WHO 2004).

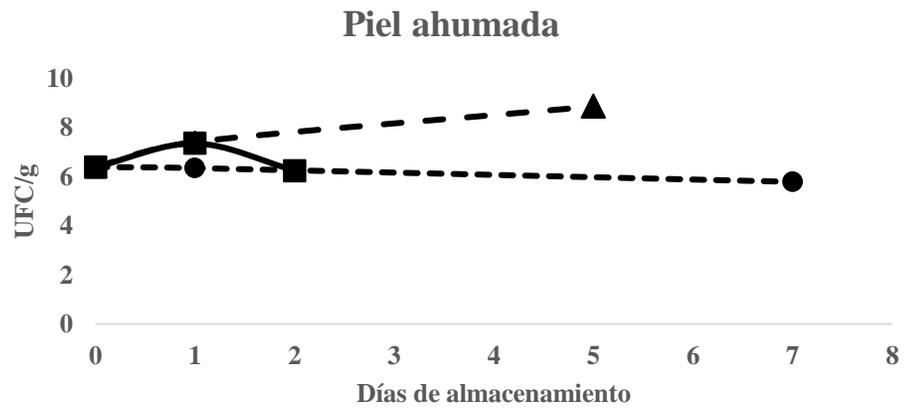
En las muestras correspondientes a la piel comparadas con las muestras de músculo a todas las temperaturas, se nota un crecimiento menor ($P < 0.05$), esto debido al tratamiento que recibió la piel en el proceso de ahumado que aparte de aportar sabores característicos del producto provee a la piel antioxidantes y tiene efectos antimicrobianos, se ha usado tradicionalmente el método de ahumado para controlar el crecimiento de muchas bacterias y hongos (Maga 1988). Se sabe también que este proceso es más efectivo en bacterias Gram positivas que en Gram negativas (Asita y Campbell 1990). En este producto en particular se usa un ahumado sólido tradicional, según Duffes (1999), el ahumado sólido con madera tiene efecto de control de *Listeria monocytogenes* aunque el ahumado líquido controla aún más a esta bacteria, esto debido a la concentración de fenoles que tienen los diferentes ahumados (Duffes 1999).

El tratamiento con Flavo®Fresh mostró ser más efectivo a partir del día uno entre más se aumentaba la temperatura, esto se debe a que el producto aumenta su funcionalidad a medida que la temperatura de incubación es mayor, es por ello que los ácidos orgánicos se aplican a altas temperaturas para asegurar su correcto funcionamiento. En un estudio dirigido por Anderson y Marshall en 1988, se concluyó que el tratamiento más efectivo en el control de diferentes tipos de bacterias en carne de res fue sumergir la muestra en una solución de ácido a 70 °C. En general se encontró que a medida aumenta la temperatura para cada concentración de ácido, aumenta la reducción en número de los microorganismos estudiados (Anderson y Marshall 1988) (figura 1).

a)



b)



c)

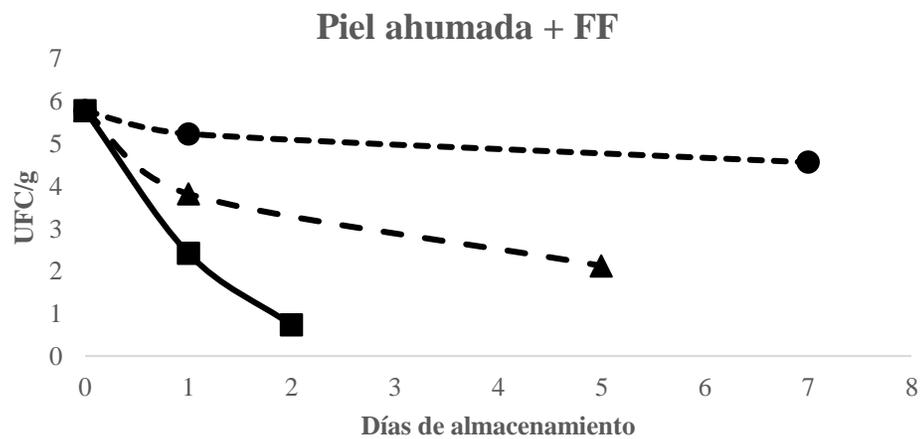


Figura 1. Sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de pavo expuestas a diferentes temperaturas y días de almacenamiento donde —■— 37° C —▲— 25° C —●— 4° C

Se realizaron análisis de las diferentes temperaturas con sus correspondientes días. El tipo de tratamiento muestra ser significativo en los diferentes días de análisis para todas las temperaturas ($P < 0.0001$). Se muestra una tendencia a la disminución de UFC en aquellas muestras tratadas con Flavo®Fresh y expuestas a temperaturas más altas. Las muestras de músculo tienen una tendencia al crecimiento a medida aumenta la temperatura y días de exposición, de igual manera las muestras de piel sólo ahumadas muestran un comportamiento de crecimiento a medida aumenta la temperatura y el tiempo, pero en menos medida que las muestras provenientes del músculo.

La temperatura 37 °C mostró mejores resultados en cuanto a la disminución de bacterias usando Flavo®Fresh, pero para las muestras correspondientes al músculo y la piel sin el tratamiento químico fue la temperatura en la que se reportaron más conteos esto debido a que la temperatura óptima de crecimiento para *L.monocytogenes* es de 37 °C (FAO y WHO 2004). Así mismo, las características pH y aw de los productos como se puede observar en el cuadro 5 y 6, favorecieron el crecimiento de la bacteria. A pesar de esto se puede ver que en aquellas muestras de piel ahumada no se logró tanto crecimiento como en las muestras de músculo sin tratamiento. Las temperatura y días escogidos para este estudio representan el peor escenario al momento del transporte del producto.

Cuadro 5. Resultados de pH de pavo ahumado listo para el consumo

Tratamiento	37 °C	25 °C	4 °C
Músculo	6.55 ± 0.12 ^A	5.93 ± 0.033 ^B	6.04 ± 0.09 ^B
Piel ahumadada	6.44 ± 0.35 ^{AB}	6.10 ± 0.086 ^B	6.24 ± 0.02 ^{AB}

A-B: letras mayúsculas diferentes indican diferencia en pH entre temperaturas

Cuadro 6. Resultados de Aw de pavo ahumado listo para el consumo

Tratamiento	37 °C*	25 °C*	4 °C*
Músculo	0.961 ± 0.009	0.968 ± 0.005	0.981 ± 0.006
Piel ahumada	0.963 ± 0.009	0.974 ± 0.007	0.939 ± 0.03

*No hubo diferencias significativas en Aw entre temperaturas.

La temperatura a 25 °C no fue muy distinta a la temperatura a 37 °C para los diferentes tratamientos y días. Las muestras de músculo y piel aumentaron sus conteos a medida aumentaron los días del día 0 al 5, a diferencia de las muestras tratadas con Flavo®Fresh que disminuyeron a medida la muestra fue expuesta a la temperatura, se evidenció un control en el crecimiento y disminución de conteos de colonias en las muestras a 25 °C, pero no tan efectivo a comparación con las muestras tratadas a 37 °C por dos días.

La temperatura a 4 °C fue más eficiente en controlar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* tanto para el músculo como para la piel. De igual manera las muestras

tratadas muestran conteos bajos en los diferentes días, pero esta temperatura no fue tan eficiente en controlar el crecimiento de *L. monocytogenes* con este tratamiento a comparación de las muestras expuestas a 25 y 37 °C.

Determinación de sobrevivencia de *L. monocytogenes* a pasteurización post-empaque en jerky de res.

El inóculo inicial tenía una concentración de 7.736 ± 0.308 log UFC/g, de los cuales se evidenció una reducción completa al final del proceso de exposición de las muestras en el baño a temperatura de 77 °C después de 4 minutos de exposición según la figura 2.

Usando el programa ComBase se introdujeron los resultados de sobrevivencia al tratamiento térmico de las tres repeticiones. Se observó que las bacterias que sobrevivieron al tratamiento térmico presentaron un comportamiento en el que manifestaron resistencia inicial al tratamiento térmico ya que el producto estaba comenzando a llegar a la temperatura de pasteurización y la temperatura máxima de sobrevivencia para este patógeno es de 45 °C siendo su óptima 37 °C (FAO y WHO 2004). Se notó que entre más era el tiempo de exposición al calor menor resultó ser la población sobreviviente (Barón 2018) (figura 2).

Los datos ingresados se ajustan al modelo de Baranyi y Roberts con un R^2 de 0.84. Se determinó un valor D de 0.652 minutos para este producto con características de pH 5.95 ± 0.13 y a_w de 0.923 ± 0.02 , esto nos indica que el producto necesita llegar internamente a una temperatura de 77 °C y mantener esta temperatura por al menos 5.04 minutos para reducir 7.738 ± 0.308 log UFC/g. de su concentración inicial.

L. monocytogenes puede desarrollarse en pH de entre 4.4 y 9.4, actividad de agua de 0.90. 0.97, concentraciones de sal de 10% en donde mantiene su crecimiento y sobrevive en concentraciones de sal de 16 a 20%, su temperatura máxima de crecimiento es de 45 °C (FAO y WHO 2004). Las características de pH 5.95 ± 0.13 y a_w de 0.923 ± 0.02 de este producto favorecen el crecimiento de esta bacteria, lo que propiciaría la multiplicación en el empaque final si existe contaminación cruzada, la pasteurización post empaque puede ser efectiva en controlar a este patógeno si se hace de la manera correcta.

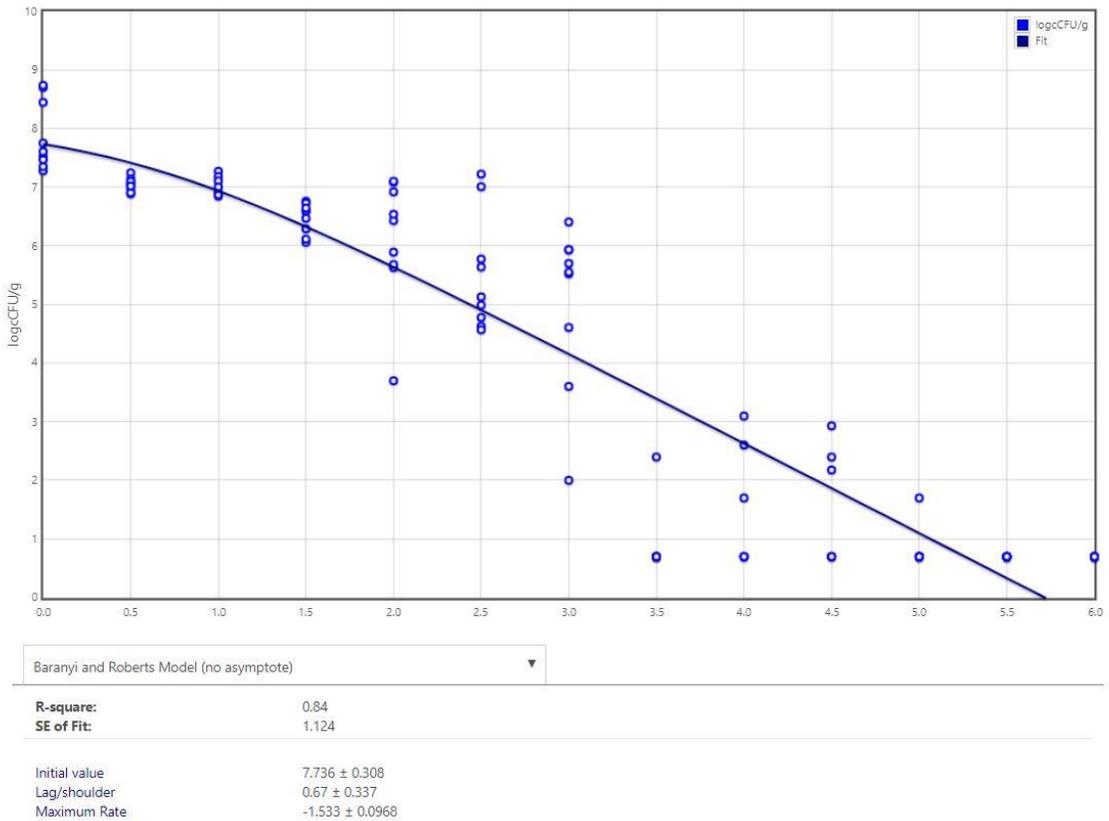


Figura 2. Curva de supervivencia de un coctel de *Listeria monocytogenes* en Jerky de res, a 77 °C observado de 0 a 6 minutos.

4. CONCLUSIONES

- La intervención química con Flavo®Fresh en pavo ahumado listo para el consumo controló *Listeria monocytogenes* disminuyendo 6.13 ± 0.52 logaritmos de crecimiento bajo condiciones de alta temperatura y la exposición a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 días eliminó por completo al patógeno.
- La eficiencia del producto químico en el control de *Listeria monocytogenes* aumenta a medida se aumenta la temperatura y el tiempo de contacto.
- El tratamiento de pasteurización posterior al empaque de $77\text{ }^{\circ}\text{C}$ para controlar la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en jerky de res listo para el consumo con de $\text{pH } 5.95 \pm 0.13$ y A_w de 0.923 ± 0.02 , requiere de 5.04 minutos para reducir la concentración inicial de 7.736 ± 0.308 log UFC/g.

5. RECOMENDACIONES

- Determinar la cantidad mínima inhibitoria de Flavo@Fresh en pavo para así proporcionar parámetros específicos de uso a la industria y ofrecer otra alternativa de etiqueta limpia para controlar *Listeria monocytoges* en productos de ave listos para el consumo.
- Evaluar otras temperaturas para reducir tiempos de pasteurización posterior al empaque y poder hacer más eficiente el proceso.
- Monitorear los cambios sensoriales que pueda sufrir el alimento a diferentes temperaturas y tiempos de pasteurización posterior al empaque.

6. LITERATURA CITADA

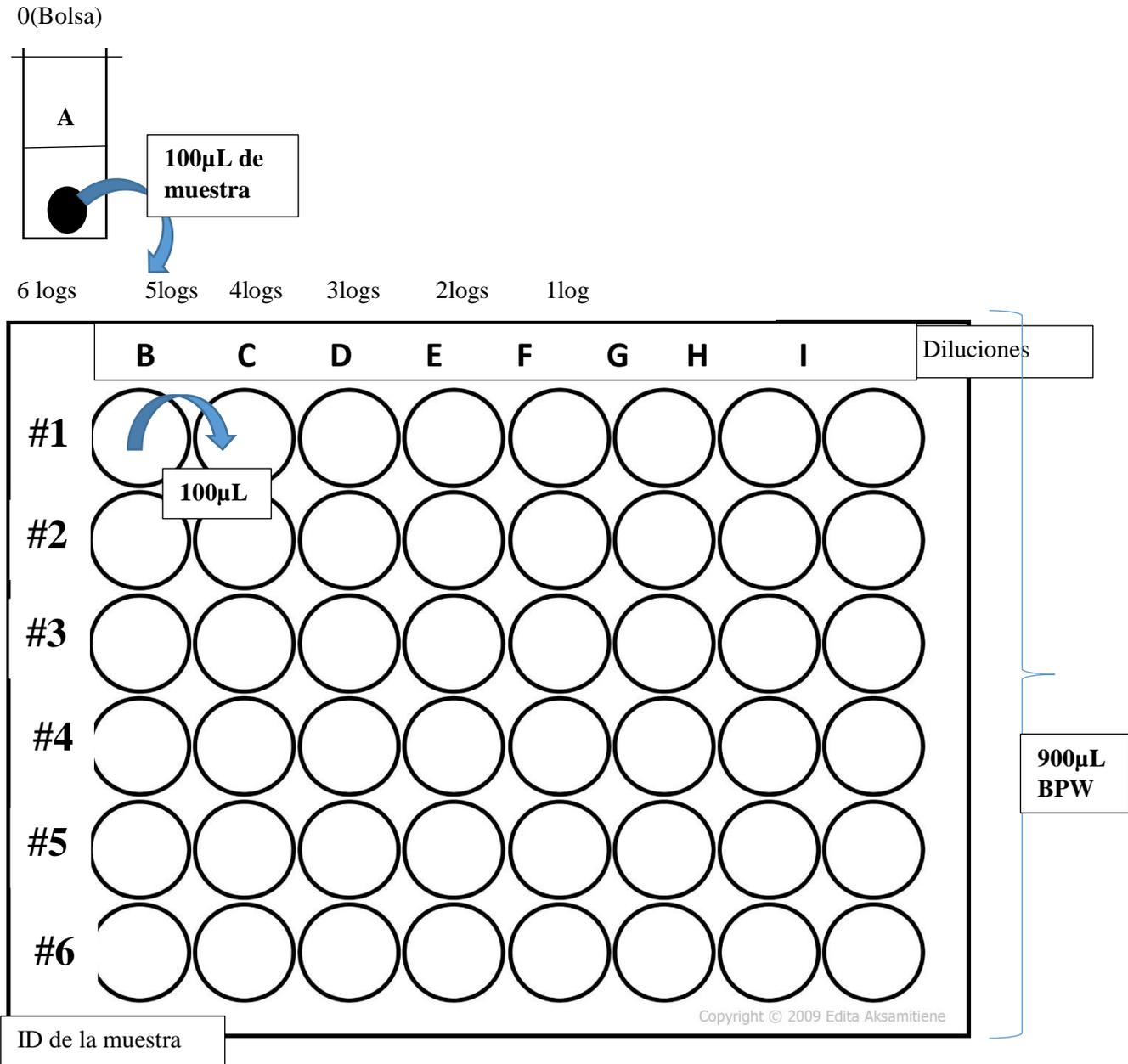
- Anderson M, Marshall R. 1988. Interaction of concentration and temperature of acetic acid solution on reduction of various species of microorganisms on beef Surfaces. *Journal of Food Protection*. 52(5): 313-315.
- Asita A, Campbell I. 1990. Antimicrobial activity of smoke from different woods. *Letters in Applied Microbiology*. 10(1):93–95.
- Ahn J, Lee HY, Knipe L, Balasubramaniam VM. 2014. Effect of a post-packaging pasteurization process on inactivation of a *Listeria innocua* surrogate in meat products. *Food Sci Biotechnol*. 23(5):1477–1481. doi:10.1007/s10068-014-0202-5.
- ATCC®, American Type Culture Collection. 2019. *Listeria monocytogenes* (Murray *et al.*) Pirie (ATCC® 19118™): [consultado el 14 de may. de 2019] <https://www.atcc.org/products/all/19118.aspx>
- ATCC®, American Type Culture Collection. 2019. *Listeria monocytogenes* (Murray *et al.*) Pirie (ATCC® 49594™): [consultado el 14 de may. de 2019] <https://www.atcc.org/products/all/49594.aspx#history>
- ATCC®, American Type Culture Collection. 2019. *Listeria monocytogenes* (Murray *et al.*) Pirie (ATCC® 51414™): [consultado el 14 de may. de 2019]
- Barón M. 2018. Inactivación de *Listeria monocytogenes* por calor en condiciones isotérmicas en un entorno ácido. Universidad politécnica de Cartagena. [consultado el 29 de may. de 2019]
- CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2019. *Listeria* (Listeriosis). [consultado el 28 de ene. De 2019]. <https://www.cdc.gov/listeria/index.html>
- Compliance Guidelines for Meat and Poultry Jerky Produced by Small and Very Small Plants. 2014; [consultado el 12 de feb. de 2019]. https://meathaccp.wisc.edu/doc_support/asset/Compliance-Guideline-Jerky-2014.pdf
- Davidson P, Taylor T. 2007. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. *Food Microbiology: fundamentals and frontiers* 3ra. Edición. Washington, Estados Unidos, Ed. Doyle and Beuchat. p. 713-745

- Duffes F. 1999. Improving the control of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon. Trends in Food Science & Technology. 10(6-7):211–216. doi:10.1016/S0924-2244(99)00051-5.
- EARLEE products. 2018. Product Information material safety data sheet: Flav®fresh rapid. Australia.
- FAO, WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization. 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Technical report. Microbiological Risk Assessment Series (MRA) 5; [consultado el 13 de jun. de 2019]. <http://www.fao.org/3/a-y5394e.pdf>
- FDA, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration and Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2017. Control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: guidance for industry; [consultado el 13 de jun. de 2019]. <https://www.fda.gov/files/food/published/Draft-Guidance-for-Industry--Control-of-Listeria-monocytogenes-in-Ready-To-Eat-Foods->
- FDA, U.S. Food and Drug Administration (FDA). 2003. Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods; [consultado el 13 de jun. de 2019]. <https://www.fda.gov/food/cfsan-risk-safety-assessments/quantitative-assessment->
- FSIS, USDA. 2012. Compliance guideline: controlling *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products. [consultado el 1 de mar. de 2019]
- Gande N, Muriana P. 2003. Prepackage surface pasteurization of ready-to-eat eats with a radiant heat oven for reduction of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection; 66(9): 1623-30. English. DOI: 10.4315/0362-028X-66.9.1623.
- Knipe L. 2014. Post-packaging pasteurization: using heat to reduce risk. [consultado el 20 de ene. de 2019] <https://www.provisioneronline.com/articles/101078-post-packaging-pasteurization-using-heat-to-reduce-risk>.
- Maga JA. 1988. Smoke in food processing. Boca Raton, Fla. [consultado el 13 de jun. Del 2019]: CRC Pr. 160p. ISBN: 0849351553.
- Nesbakken T, Kapperud G. Caugant D. A. 1996. Pathways of *Listeria monocytogenes* contamination in the meat processing industry. In International Journal of Food Microbiology 31 (1-3):161–171.
- Samelis J, Metaxopoulos J. 1999. Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. In Food Microbiology 16 (5). 465–477. DOI: 10.1006/fmic.1998.0263.
- Sealed air food care. 2016. Cryovac® CNP310 series post pasteurization bags. Sealedair.com/foodcare. [consultado el 20 de jun. Del 2019]

7. ANEXOS

Anexo 1. Mejor escenario: concentración inicial de 6 logaritmos, no crecimiento (muestras tratadas con Flavo®Fresh)

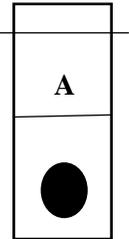
100µL en 900µL



Anexo 2. Peor escenario: concentración de 9 logaritmos, crecimiento (muestras no tratadas)

100µL en 900µL

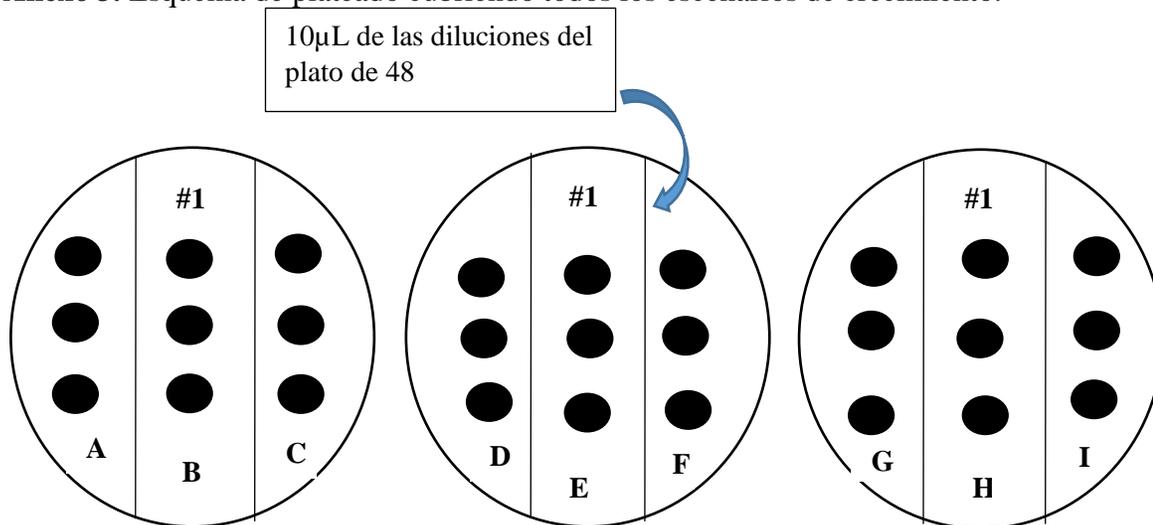
0 (bolsa)



9 logs 8logs 7logs 6logs 5logs 4logs 3logs 2logs 1log

	B	C	D	E	F	G	H	I	Diluciones
#1									 900µL BPW
#2									
#3									
#4									
#5									
#6									
ID de la muestra Copyright © 2009 Edita Aksamitiene									

Anexo 3. Esquema de plateado cubriendo todos los escenarios de crecimiento.



En la cuantificación por el método de drop dilution se colocó de cada dilución tres alícuotas de 10 µl de *L. monocytogenes* obteniendo 9 gotas por plato. El conteo se realizó en la dilución que tuviera un rango de 5-50 colonias por gota. Se multiplicaron las colonias contadas por el factor de dilución en que se tomaron. Tomando en consideración que las soluciones de extracción eran de 10 ml se multiplicó por el dato de UFC/mL y se usó el peso de cada muestra para convertirlas a UFC/g. En el caso de las muestras cuantificadas usando el método de siembra por superficie se tomaron 250 µl de la concentración 10⁰ y se colocaron en 4 platos, las UFC encontradas en cada plato se sumaron para obtener el dato de UFC/mL.

Anexo 4. Sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en pavo a diferente temperatura y tiempo.

Cuadro 5. Recuento de *L.monocytogenes* (Log UFC/g) en pavo inoculado e incubado a diferentes temperaturas al día 1.

Tratamiento	Log UFC/g.		
	37 °C	25 °C	4 °C
Músculo	9.34 ± 0.61 ^{Ax}	8.49 ± 1.00 ^{Ax}	6.32 ± 0.47 ^{Bx}
Piel ahumada	7.33 ± 0.78 ^{Ay}	7.39 ± 0.79 ^{Ay}	5.96 ± 0.39 ^{Bx}
Piel ahumada + Flavo@Fresh	2.41 ± 0.78 ^{Az}	3.81 ± 0.048 ^{Az}	5.22 ± 0.19 ^{By}

x-z: letras minúsculas diferentes indican diferencia entre tratamientos

A-C: letras mayúsculas diferentes indican diferencias entre temperaturas

Continuación Anexo 4.

Cuadro 6. Recuento de *L.monocytogenes* (Log UFC/g) en pavo inoculado e incubado a 37°C por 0,1 y 2 días.

Tratamiento	Log UFC/g.		
	Día 0	Día 1	Día 2
Músculo	6.23 ± 0.47 ^{Zxy}	9.34 ± 0.61 ^{Bx}	9.45 ± 0.43 ^{Bx}
Piel	6.37 ± 0.41 ^{Ax}	7.33 ± 0.78 ^{By}	6.22 ± 0.73 ^{By}
Piel + Flavo@Fresh	5.77 ± 0.49 ^{Ay}	2.41 ± 0.96 ^{Bz}	0.73 ± 0.66 ^{Bz}

x-z: letras minúsculas diferentes indican diferencia entre tratamientos

A-B: letras mayúsculas diferentes indican diferencias entre días

Cuadro 7. Recuento de *L.monocytogenes* (Log UFC/g) en pavo inoculado e incubado a 25°C por 0,1 y 5 días.

Tratamiento	Log UFC/g.		
	Día 0	Día 1	Día 5
Músculo	6.23 ± 0.47 ^{Bxy}	8.49 ± 0.61 ^{Ax}	9.43 ± 0.47 ^{Ax}
Piel	6.37 ± 0.41 ^{Bx}	7.39 ± 0.78 ^{Ay}	8.83 ± 0.27 ^{Ay}
Piel + Flavo@Fresh	5.77 ± 0.49 ^{By}	3.81 ± 0.96 ^{Az}	2.12 ± 1.26 ^{Az}

x-z: letras minúsculas diferentes indican diferencia entre tratamientos

A-B: letras mayúsculas diferentes indican diferencias entre días

Cuadro 8. Recuento de *L.monocytogenes* (Log UFC/g) en pavo inoculado e incubado a 4°C por 0,1 y 7 días.

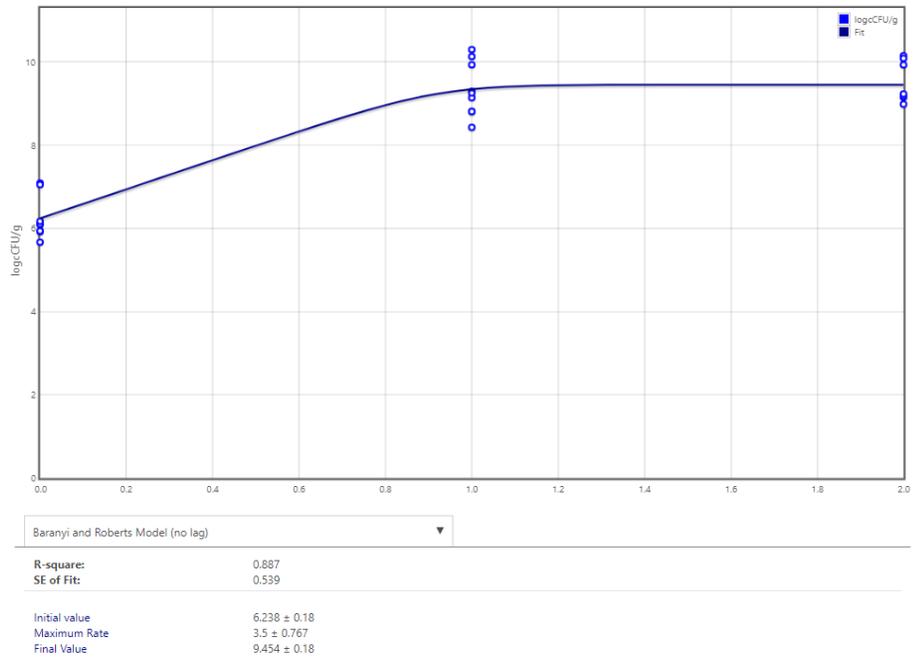
Tratamiento	Log UFC/g.		
	Día 0	Día 1	Día 7
Músculo	6.24 ± 0.47 ^{Axy}	5.96 ± 0.61 ^{Bx}	6.88 ± 0.31 ^{Ax}
Piel	6.37 ± 0.41 ^{Ax}	6.33 ± 0.78 ^{By}	5.77 ± 0.24 ^{Ay}
Piel + Flavo@Fresh	5.77 ± 0.49 ^{Ay}	5.22 ± 0.96 ^{Bz}	4.55 ± 0.81 ^{ABz}

x-z: letras minúsculas diferentes indican diferencia entre tratamientos

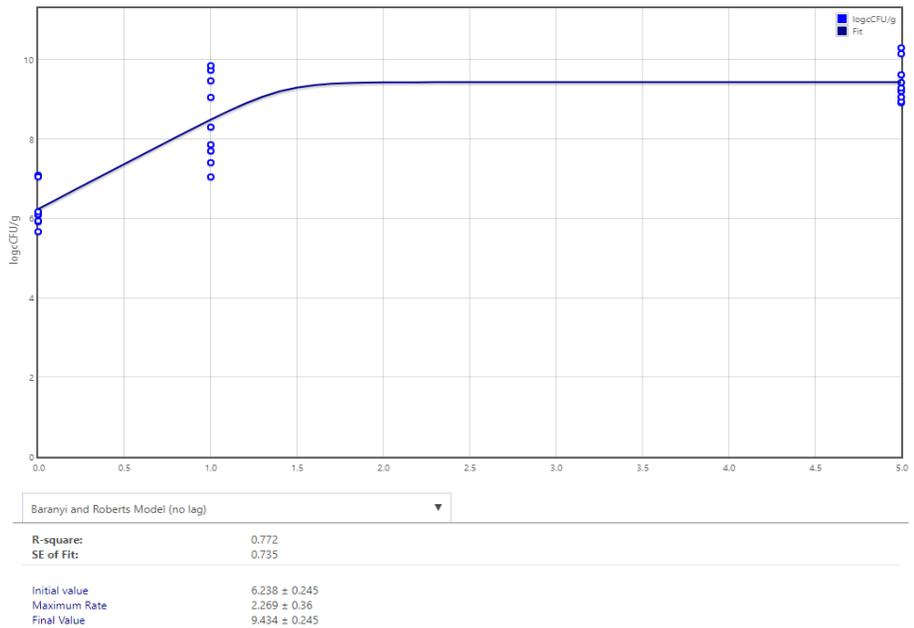
A-B: letras mayúsculas diferentes indican diferencias entre días

Anexo 5. Sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en pavo a diferentes temperaturas y días en músculo de pavo.

a) Músculo a 37 °C días 0, 1 y 2.

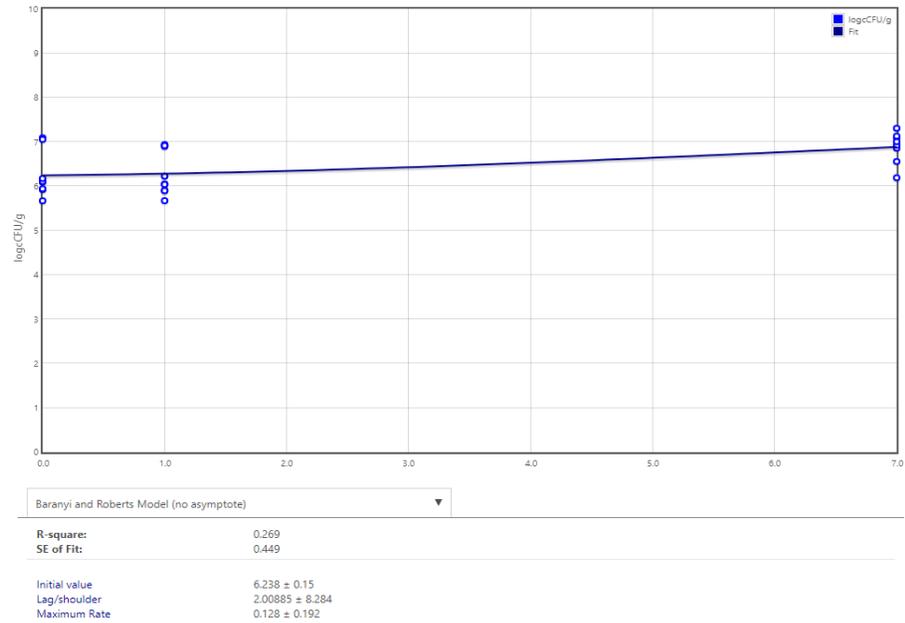


b) Músculo a 25 °C días 0, 1 y 5.



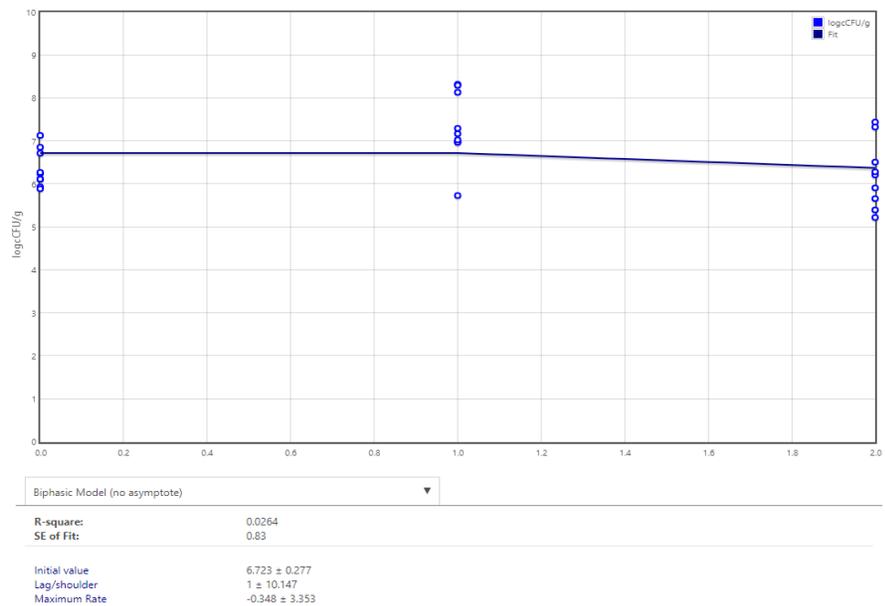
Continuación Anexo 5.

c) Músculo a 4 °C días 0, 1 y 7.



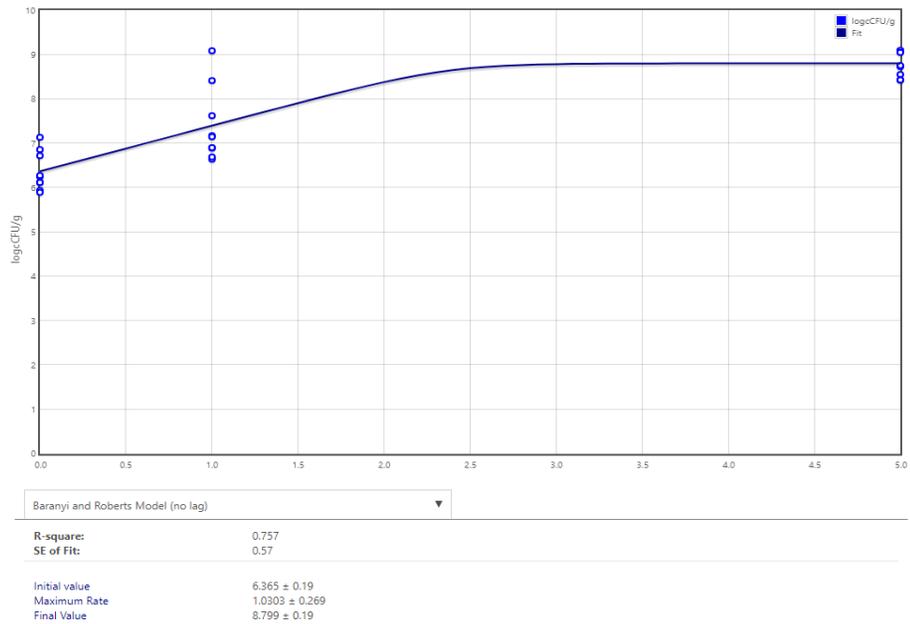
Anexo 6. Sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en pavo a diferentes temperaturas y días en piel de pavo ahumada.

a) Piel ahumada a 37 °C días 0, 1 y 2.

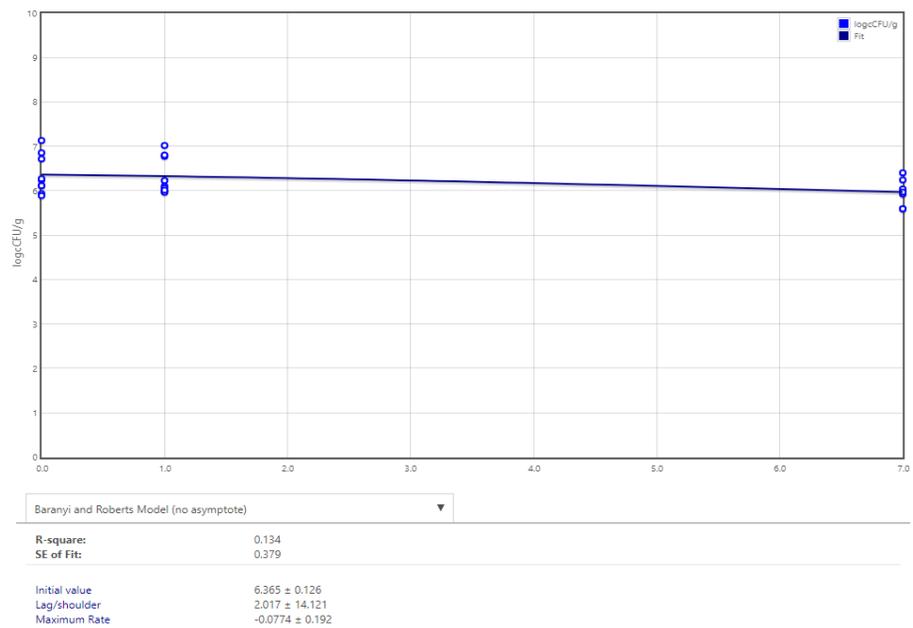


Continuación anexo 6

b) Piel ahumada a 25 °C días 0, 1 y 5.

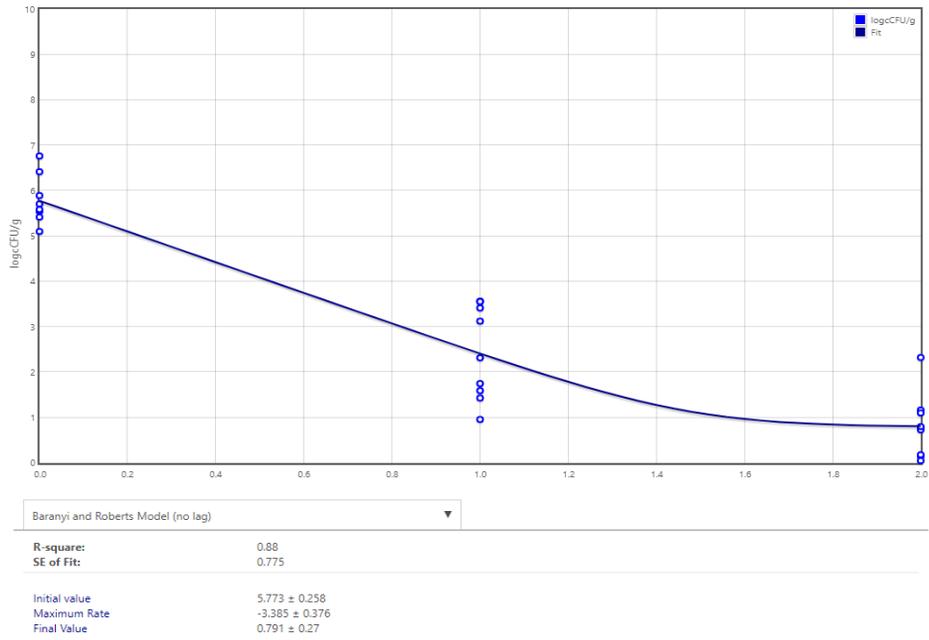


c) Piel ahumada a 4 °C días 0, 1 y 7.

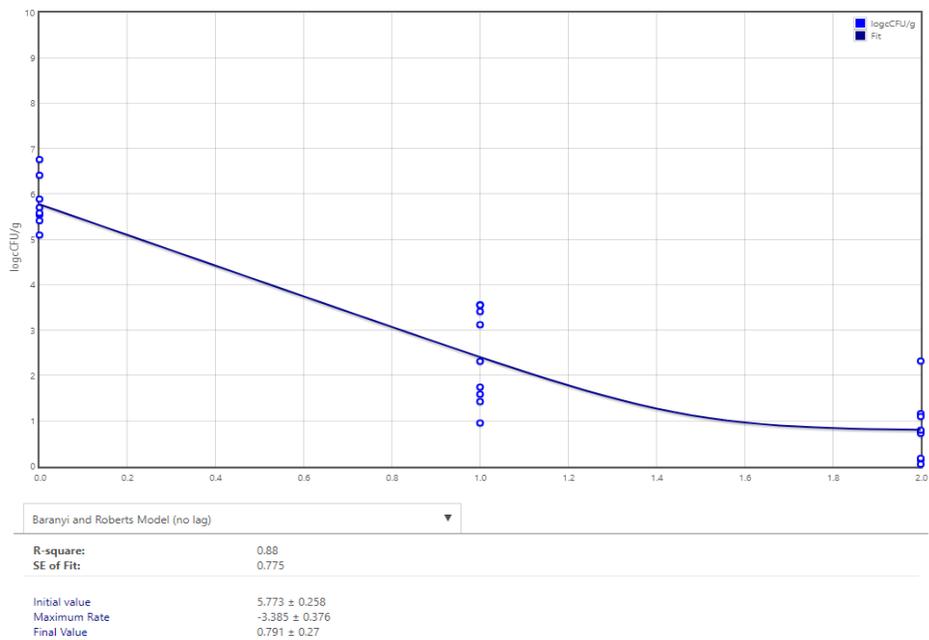


Anexo 7. Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en pavo a diferentes temperaturas y días en piel de pavo ahumada con Flavo®Fresh.

a) Piel ahumada + FF a 37 °C día 0, 1 y 2.



b) Piel ahumada + FF a 25 °C día 0, 1 y 5.



Continuación Anexo 7.

c) Piel + FF a 4 °C día 0, 1 y 7.

