Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

EFECTO Y OPTIMIZACIÓN DE LA ADICIÓN DE NISINA Y NaCl EN LA INACTIVACIÓN TÉRMICA DE *Listeria monocytogenes* EN CARNE MOLIDA DE RES MARINADA EN SALSA CHIPOTLE

Por:

Ezequiel Hernández Mendoza

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora Septiembre 2019

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ezequiel Hernández Mendoza, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias

Dra. Etna Aida Peña Ramos
Directora de Tesis

Dr. Vijay Kumar Juneja
Integrante del comité

Dr. Martín Valenzuela Melendres
Integrante del comité

Dra. Susana María Scheuren Acevedo
Integrante del comité

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Efecto y Optimización de la Adición de Nisina y NaCl en la Inactivación Térmica de *Listeria monocytogenes* en Carne Molida de Res Marinada en Salsa Chipotle" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Ezequiel Hernández Mendoza, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

CIAD

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a CONACyT por el apoyo económico brindado por medio de las becas otorgadas durante estos dos años para la realización de la Maestría en Ciencias.

Seguidamente, se agradece al CIAD A.C., por el apoyo económico otorgado para la estancia realizada, por facilitar las instalaciones y por el aprendizaje adquirido durante la realización del posgrado.

Asimismo, se agradece al Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), especialmente a la Unidad de Residuos Químicos y de Microbiología Predictiva en Wyndmoor, PA. Por el apoyo financiero, la facilitación de sus instalaciones y la oportunidad de realizar la fase experimental del proyecto de tesis.

Personalmente quiero agradecer principalmente a mi asesora, la Dra. Etna Aida Peña Ramos por haberme aceptado y dado la oportunidad de ser su estudiante de maestría desde el primer momento en que nos pusimos en contacto. De igual manera muchas gracias por todo su tiempo, dedicación y sobre todo la paciencia brindada durante todas las asesorías, revisiones y correcciones tanto del trabajo escrito como de la presentación oral. Gracias por enseñarme y guiarme a través de estos dos años de un principio a fin, en este trabajo se ve reflejado todo su gran apoyo. Una vez más, muchas gracias por abrirme la puerta a nuevas oportunidades al mismo tiempo de ayudarme a mejorar personalmente tanto en el ámbito académico como profesional. Por siempre agradecido. Muchas Gracias por su confianza brindada.

También agradezco al Dr. Martín Valenzuela Melendres y la Dra. Susana Maria Scheuren Acevedo por su paciencia y participación dentro del comité de tesis. Gracias por su atención en todo momento que solicite de su ayuda, así como por sus acertadas contribuciones y apoyo durante la revisión del manuscrito y las juntas de comité que ayudaron a enriquecer nuestro proyecto de tesis.

I want to thank Dr. Vijay K. Juneja, for giving me the opportunity of working at his laboratory in the USDA for my thesis experiment. At the same time, thanks for sharing your knowledge and advices at all time to improve this project. I also want to thank Angie Osoria and Barry Harter for their technical support, which make much easier and faster the lab work. At the same time, thanks for all your recommendations and advices during my internship at the ARS.

Por otra parte, agradezco a mis Maestros Dr. Juan Pedro Camou, I.Q. Germán Cumplido y Dr. Alfonso García Galaz, por su apoyo, consejos y enseñanzas.

Le agradezco especialmente a mi madrina Marina Mendoza Martínez, por estar presente y apoyarme a lo largo de mi vida.

Por último, agradezco a las nuevas amistades encontradas durante el transcurso de estos dos años: Karen Sotelo, Miguel (Mike) Camacho, Isabel Clark, Alonso Martínez, Perlette Romo, Luis Falcón… y, a los amigos a distancia; porque a pesar de estar lejos siempre se está cerca, Carlos (Charlos) Martínez y Aline Orozpe. Finally, but not less important, I want to thank Denis Pchelkin for his friendship and support, and also for let in me stay at his house during my internship at the USDA.

DEDICATORIA

A mi familia,

Ezequiel Hernández de la Rosa
Rosa Mendoza Martínez
Pamela Hernández Mendoza

Gracias mamá. Gracias papá. Gracias hermana. Por todo su apoyo y consejos a lo largo de mi vida. Porque sin ustedes nada de esto hubiera sido posible. Ahora ya soy Maestro en Ciencias por y para ustedes y por eso se los dedico.

CONTENIDO

APROBACIÓN 2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL 3
AGRADECIMIENTOS 4
DEDICATORIA 6
CONTENIDO 7
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE CUADROS 10
LISTA DE ECUACIONES 11
RESUMEN 12
ABSTRACT 13
1. INTRODUCCIÓN 14
2. ANTECEDENTES 16
2.1 La Cocina Mexicana y la Carne de Res 16
2.2 Microbiología de la Carne 17
2.3 *Listeria monocytogenes* 18
2.4 Métodos para el Control Microbiológico en la Industria de la Carne 19
2.4.1 Métodos Físicos para el Control de Patógenos en la Carne 20
2.4.1.1 Esterilización 20
2.4.1.2 Pasteurización 21
2.4.2 *Sous-vide* Como Proceso de Pasteurización 21
2.4.3 Valor-*D*, Valor-*z* y Modelos de Predicción. 23
2.4.4 Métodos Químicos para el Control de Patógenos en la Carne 27
2.4.5 La Sal Como Aditivo en la Industria de la Carne 27
2.4.6 Bacteriocinas: La Nisina como Antimicrobiano de Origen Natural 29
2.5 La Aplicación de la Microbiología Predictiva en la Industria de la Carne 31
2.6 Metodología de Superficie de Respuesta 32
3. HIPOTESIS 35
4. OBJETIVOS 36
4.1 Objetivo General 36
4.2 Objetivos Específicos 36
5. MATERIALES Y MÉTODOS 37
5.1 Diseño Experimental 37
5.2 Activación de Cepas y Preparación de los Inóculos 38
5.3 Obtención de la Matriz Cárnica y Preparación de la Salsa de Chipotle 39
5.4 Preparación de la Muestra 39
5.5 Inactivación Térmica y Conteo Bacteriano 40

CONTENIDO (continuación)

5.6 Análisis Cinético 41
5.7 Análisis Estadístico 41

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 43
6.1 Valores-*D* de *L. monocytogenes* en Carne de Res en Salsa Chipotle 43
6.2 Modelo Predictivo 46
6.3 Efectos de la Temperatura, Nisina y Sal 49
6.4 Interacción Temperatura-Nisina 53
6.5 Condiciones Optimas 54
6.6 Efecto de la Nisina y la Sal en los Valores-z 55

7. CONCLUSIONES 58

8. RECOMENDACIONES 59

9. REFERENCIAS 60

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Definición del valor-*D*. Para una inactivación isotérmica, el valor-*D* es el tiempo requerido para conseguir una reducción de un ciclo log en una bacteria viable a una temperatura dada.…..……..	23
2	Definición del valor-*z*. El valor-*z* es el incremento requerido de la temperatura para una reducción de un ciclo log en el valor-*D* ……..	25
3	Relación entre los valores-*D* observados y ajustados de *L. monocytogenes* en carne de res en salsa chipotle. La línea central (línea de identidad) y las otras líneas representan 95% del límite de confianza……	48
4	Gráfico 3D de superficie de respuesta del efecto de la temperatura en la raíz cuadrada de los valores-*D* para *L. monocytogenes* en carne molida de res en salsa chipotle en los valores centrales de nisina (75 UI) y sal (1%)……..	50
5	Gráfico 3D de superficie de respuesta del efecto de la sal en la raíz cuadrada de los valores-*D* para *L. monocytogenes* en carne molida de res en salsa chipotle en los valores centrales (60 ° y 75 UI) de temperatura y nisina……...…….	51
6	Gráfico 3D de superficie de respuesta del efecto de interacción entre la temperatura y nisina en el punto central de sal (1%) sobre la raíz cuadrada de los valores-*D* para *L. monocytogenes* en carne molida de res en salsa chipotle…….	53
7	Perfil predictivo con las condiciones óptimas de temperatura, nisina y sal para la inactivación de *L. monocytogenes* en carne molida de res en salsa chipotle …...……...……..	55
8	Valores-*z* (logaritmo del valor-*D*) de *L. monocytogenes* calculados a partir del valor estimado de los valores-*D* en carne molida de res en salsa chipotle con nisina (0-150 UI) y sal (0-2%)…….…….	56

LISTA DE CUADROS

Cuadros		Página
1	Valores-*D* para *L. monocytogenes* en distintas matrices cárnicas……..	24
2	Investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de la nisina con distintos tratamientos físicos y/o químicos en diferentes productos cárnicos …….	30
3	Investigaciones de inactivación térmica de *L. monocytogenes* que generaron modelos de predicción primarios y secundarios ……...	33
4	Diseño compuesto central de precisión uniforme para temperatura, nisina y sal ...……	37
5	Cepas utilizadas con su designación y origen de aislamiento……	39
6	Valores-D observados y predichos para la inactivación de *L. monocytogenes* en carne molida de res en salsa chipotle con la adición de nisina y sal....……..	44
7	Coeficientes de regresión (CR) estimados codificados y análisis de varianza del modelo de regresión para los valores-*D* (min) de *L. monocytogenes* es carne de res en salsa chipotle suplementadas con nisina y sal…….…….	47

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación		Página
1	Fórmula para calcular el proceso térmico de letalidad (F)……..	26
2	Modelo matemático correspondiente al diseño central compuesto..…	38
3	Modelo matemático que explica la interacción entre los factores estudiados y da origen a la predicción de los valores-*D* ..……	48

RESUMEN

La inocuidad de platillos a base de carne molida, como las albóndigas en chipotle, procesados *sous-vide*, puede verse comprometida debido a las temperaturas moderadas que se utilizan, sobre todo cuando en su preparación se desea minimizar el nivel de sal. La bacteriocina nisina por su estabilidad térmica puede ser una buena alternativa para asegurar la disminución de la resistencia al calor de *Listeria monocytogenes* (*Lm*), considerado uno de los patógenos más resistentes al calor presente en los productos cárnicos listos para consumir. El objetivo fue generar el modelo de predicción en el nivel de adición de nisina y sal, para disminuir la resistencia térmica de *Lm* durante la cocción *sous-vide* de albóndigas de res en salsa chipotle y optimizar las variables. Se utilizó un coctel de cinco cepas, el cual fue inoculado en la carne de res en combinación (3:2) con salsa chipotle, adicionada con los aditivos. Después, se realizó la cocción *sous-vide* a diferentes temperaturas (55-65 °C) y concentraciones de nisina (0-120 UI) y sal (0-2 %), establecidas por un diseño compuesto central. Los valores-*D* variaron de 49.71 a 0.27 min de 55 a 65 °C, dependiendo de los niveles de los factores estudiados. Mediante superficie de respuesta se obtuvo un modelo predictivo ($p<0.05$) el cual describe ($R^2=0.96$) que la variación de los valores-*D* fue explicada por los efectos ($p<0.05$) lineales de los 3 factores, la interacción nisina y temperatura, y cuadráticos de sal y temperatura. Se observó que mientras la nisina presentó un efecto bactericida, la sal ejerció un efecto protector durante la inactivación térmica de *Lm*. Adicionar 120 UI de nisina y 0.4 % de sal al producto cárnico a una temperatura de 62 °C puede ayudar a asegurar a la inocuidad volviendo a las células de *Lm* más sensible al efecto del calor. Los resultados de este estudio permitirán a la industria cárnica utilizar distintas temperaturas de cocción *sous-vide* y asegurar la inocuidad de este tipo de producto, mediante la incorporación del nivel adecuado de nisina y sal para asegurar la inactivación térmica de *Lm* en albóndigas de res en salsa chipotle.

Palabras clave: Nisina, Sal, Inactivación térmica, *Listeria monocytogenes,* Valor-*D,* Valor-*z*

ABSTRACT

Food safety in ground beef meat entrees, like meatballs on chipotle sauce, *sous-vide* processed can be compromise as a result of the mild temperatures used, especially when levels of salt are reduced during its preparation. Due to its thermal resistance nisin can be a good alternative to ensure the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* (*Lm*), since it is one of the main thermoresistant pathogens that can be in ready-to-eat food. The objective was to optimize the amount of nisin and salt concentrations to thermal inactivate *Lm* during the *sous-vide* cooking of beef meatballs marinated on chipotle sauce, and to generate a predictive model. A five-strain cocktail was prepared and inoculated in ground beef in combination (3:2) with the chipotle sauce added with nisin and salt. After, meat samples were *sous-vide* cooked at different temperatures, nisin (0-120 IU) and salt (0-2%) concentrations, established by a central composite design. Depending on the levels of these factors, *D*-values ranged from 49.71 to 0.27 min. A predictive model ($p<0.05$) was obtained by response surface, which described that D-values variation was explained by the linear effects of the 3 factors, the interaction between nisin and temperature, and the quadratic effects of salt and temperature. It was observed that nisin presented a bactericidal effect while salt presented a protective effect during the thermal inactivation of *Lm*. Adding 120 IU of nisin and 0.4 % of salt to the meat product at a 62 °C temperature can help to ensure food safety by making *Lm* cells more sensitive to heat lethal effect. The results of the present study will allow to the meat industry to use different *sous-vide* cooking temperatures and ensure food safety in this kind of products by the addition of the proper nisin and salt levels to effectively inactivate *Lm* in meatballs marinated on chipotle sauce.

Keywords: Nisin, Salt, Thermal inactivation, *Listeria monocytogenes*, *D*-value, *z*-value

1. INTRODUCCIÓN

El sabor auténtico de la cocina mexicana, es en la actualidad una de las tendencias de innovación más demandadas alrededor del mundo (BBC Good Food team, 2018). Entre los platillos a base de carne de res más populares están las albóndigas en salsa chipotle, ya que es uno de los más reconocidos alrededor del mundo (Martínez, 2017). Dada su popularidad, este platillo no sólo se elabora y consume a nivel casero, sino que también es preparado y comercializado a nivel industrial y de servicio (hospitales y restaurantes), por lo que el aseguramiento de su calidad e inocuidad es de gran relevancia para los consumidores y la industria de la carne. Con la finalidad de responder a estas demandas de sabor y autenticidad, un proceso de pasteurización que permite conservar, e inclusive mejorar el perfil sensorial de los productos cárnicos, es el *sous-vide*. Este consiste en colocar el alimento dentro de bolsas de plástico termoresistentes, sellarlas con vacío y cocinar (pasteurizar) el alimento. Sin embargo, las temperaturas utilizadas durante este proceso que suelen ser moderadas (60-90 °C) (Baldwin, 2012). De esta manera, el uso de estas temperaturas bajas, aunado con la molienda de la carne que se utiliza para elaborar las albóndigas pueden comprometer la inocuidad del producto final por el riesgo de contaminación de bacterias patógenas termoresistentes (Cornejo & Egas, 2017).

La eficacia del proceso de inactivación térmica de un patógeno puede ser verificada estableciendo los valores-*D* y *z*. El valor-*D* indica el tiempo requerido para la reducción del 90% de un microorganismo a una temperatura determinada; y el valor-*z*, establece el cambio de temperatura que se requiere para reducir un logaritmo en el valor-*D* (O'Bryan et al., 2006). Cabe mencionar que para cada patógeno en particular corresponde un valor-*D*, el cual está directamente relacionado con la composición de la matriz cárnica y la formulación del producto a elaborar. Por lo que no se pueden utilizar los valores-*D* previamente establecidos para otros platillos y productos, independientemente si son o no de la misma matriz cárnica (Murphy et al., 2004).

L. monocytogenes es un patógeno que por sus características (termoresistente, es capaz de desarrollarse en refrigeración y resistente a bajos pH) puede comprometer la inocuidad de los productos cárnicos listos para consumir, si los tratamientos de cocción o conservación no aseguran

su inactivación (Saludes et al., 2015; Varela et al., 2016). Por lo tanto, el uso de antimicrobianos como sistema de barreras para asegurar la inocuidad del producto final durante las condiciones de cocción *sous-vide* son necesarios.

Uno de los ingredientes más comunes en la formulación de productos cárnicos es la sal, la cual es adicionada ya sea para ejercer su capacidad para solubilizar las proteínas de la carne y/o para impartir sabor a los productos. Al mismo tiempo, la sal cuenta con actividad antimicrobiana atribuida a su capacidad de reducir la actividad de agua de los alimentos. Sin embargo, para ejercer este efecto, dependiendo de la bacteria, generalmente es necesario adicionar concentraciones elevadas, por arriba del 2%, lo cual es contrario a las recomendaciones que diversas organizaciones de salud han emitido de reducir la ingesta de sal, con un máximo recomendado de 5g/día (OMS), por su relación con la incidencia con enfermedades cardiovasculares (Ruusunen & Puolanne, 2005). Para atender esta recomendación y al mismo tiempo asegurar la inocuidad, en especial en productos cárnicos procesados a temperaturas bajas, es necesario utilizar antimicrobianos como una barrera adicional.

Existen reportes del uso de sustancias antimicrobianas de origen natural como el extracto de semillas de toronja (Valenzuela et al., 2016) o polifenoles de manzanas (Juneja et al., 2013) que ayudan a disminuir la resistencia térmica de este patógeno. Asimismo, las bacteriocinas, como la nisina (Nazir et al., 2017), son compuestos peptídicos naturales termoestables, que han demostrado tener actividad bactericida y/o bacteriostática (Chikindas et al., 2018; Álvarez et al., 2016) contra *L. monocytogenes* en diferentes matrices cárnicas (Castellano et al., 2011; Solomakos et al., 2008). Cabe mencionar que existen escasos reportes del uso combinado de nisina y sal como agentes antimicrobianos en matrices cárnicas, así como su evaluación en conjunto en la inactivación térmica de *L. monocytogenes*. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la nisina y sal en las cinéticas de inactivación térmica (valores-*D* y *z*) de *L. monocytogenes* durante la cocción *sous-vide* de albóndigas de carne de res en salsa chipotle y generar su modelo de predicción.

2. ANTECEDENTES

2.1 La Cocina Mexicana y la Carne de Res

A nivel mundial, una de las tendencias de innovación más importantes es el consumo de productos de la comida tradicional mexicana con sabores autóctonos y caseros (Pilcher, 2012; Soldatenko, 2015). Existe una gran diversidad de platillos dentro de la gastronomía mexicana preparados con carne de res (carne en chile rojo, albóndigas, picadillo, machaca, caldos, tacos, enchiladas, burritos, etc.) (Lee et al., 2014); entre los platillos mexicanos a base de carne molida de res, las albóndigas en salsa chipotle, es uno de los más reconocidos alrededor del mundo (Martinez, 2017). Tradicionalmente, en la elaboración de este platillo se utiliza carne con una proporción de carne magra:grasa de 85:15. Dada su popularidad, este platillo no sólo se elabora y consume a nivel casero, sino que también es preparado y comercializado a nivel industrial y de servicio (hospitales y restaurantes), por lo que el aseguramiento de su calidad e inocuidad es de gran relevancia para los consumidores y la industria de la carne.

México ocupa el octavo lugar como productor y consumidor de carne de res, por detrás de países como Estados Unidos, Argentina y Brasil (FIRA, 2017), donde gran aporte del consumo de la carne de res es por medio de su molienda (Davis, 2014). Rubio et al. (2013), reportan que la composición de la carne de res que se utiliza para la elaboración de este producto tiene en promedio un 71.5±1.9% de humedad, 22.2±0.2% de proteína, 2.9±0.3% de grasa y 1.1% de cenizas totales. Tales características deben ser consideradas ya que tienen un impacto en la conservación e inocuidad microbiológica del producto.

2.2 Microbiología de la Carne

Como se mencionó, la molienda de carne es uno de los procesos que se aplica a un volumen muy alto de la carne de res que se produce. Sin embargo, este proceso tiene la desventaja de incrementar de manera significativa el riesgo y los niveles de contaminación por microrganismos. Esto es debido a que las bacterias que en un principio solamente se encontraban sobre la superficie de la pieza entera de la carne, ahora se encontrarán dispersas entre toda la matriz cárnica (FSIS, 2013). Aunado a esto, la composición y las características de la carne, tales como: actividad de agua (Aw) (0.99), potencial oxido-reducción (Eh) (en función del molido de la carne), pH (5.4-5.6) y temperatura (según el almacenamiento y manejo 4-25 °C), hacen de esta matriz el medio idóneo para el desarrollo de bacterias (Restrepo et al., 2001). De esta manera, la carne ofrece a los microorganismos los sustratos necesarios para su crecimiento y metabolismo (Lopez et al., 2015).

No obstante que previo al sacrifico, la carne en la canal *per se* es estéril, entonces, ¿de dónde surgen los microorganismos como las bacterias que contaminan a la carne? Existen diversas fuentes de contaminación en la cadena de producción: en el proceso de sacrificio y transformación de músculo a carne se puede dar por contaminación cruzada por medio de las vísceras, mala manipulación de las piezas y por contacto con superficies inertes contaminadas (pisos, paredes, mesas y cuchillos); además durante la distribución y en los puntos de venta (Yang et al., 2017). En conjunto con lo anterior, los cambios en la población de tales bacterias se verán influenciados por efecto de factores extrínsecos como el tiempo, medio ambiente y las condiciones de almacenamiento. Así como también por factores intrínsecos de los mismos productos como son la formulación, composición, y procesamiento (Rouger et al., 2017). Por lo tanto, la inocuidad o deterioro microbiano de la carne molida va a depender del tipo y cantidad de bacterias presentes en la carne antes y posterior al proceso de molienda.

Existen diferentes tipos de bacterias que pueden estar presentes en la carne, dentro de las cuales se encuentran las benéficas, deteriorativos, y patógenas. Siendo estas últimas las de interés en la presente investigación. Dentro de las principales bacterias patógenas asociadas a la carne de res se encuentran *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus, Clostridium perfrigens, Escherichia coli*

O157:H7 y *Listeria monocytogenes* (Restrepo et al., 2001; Rodrigues et al., 2017; Varela et al., 2016). Cabe destacar que la presencia de bacterias patógenas en la carne, no necesariamente afectan la calidad del producto, por lo que a simple vista no se puede distinguir entre un producto contaminado y uno inocuo. La presente investigación se enfoca en el patógeno *L. monocytogenes*, ya que cuenta con características de adaptación que lo vuelve resistente a tratamientos térmicos con temperaturas habituales de cocción. Así puede desarrollarse cuando las prácticas y procesos que se implementan en la industria cárnica de manufactura no son los adecuados, y originar así un problema de inocuidad dentro de la industria de la carne.

2.3 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un patógeno que se describe como bacilo Gram positivo, el cual presenta diploformas dispuestas en "V", no posee cápsula ni espora y tiene flagelos perítricos, gracias a los cuales presenta movilidad alrededor de los 30 °C, pero es inmóvil a 37 °C (NOM-210-SSA1-2014). Características de este patógeno, tales como su capacidad de sobrevivir en un amplio rango de condiciones ambientales como anaerobiosis (sin oxígeno), resistencia frente a concentraciones altas de sal (osmotolerancia) y especialmente su termoresistencia (resistente a temperaturas de cocción) y termoestabilidad en temperaturas de refrigeración (1 a 8 °C) hacen de este patógeno una amenaza para la industria de la carne, especialmente en alimentos listos para su consumo. Además, existe evidencia de que algunas cepas, como Scott A, son resistentes a bajos pH (Martinez & Mauriz, 2013). De igual manera, este patógeno posee mecanismos de adaptación y supervivencia tales como la formación de biopelículas, quorum sensing y resistencia antimicrobiana (Gandhi & Chikindas, 2007).

Esta reportado que es uno de los patógenos más virulentos, con una tasa de mortalidad entre un 20 a 30% y se desarrolla intracelularmente causando listeriosis. Enfermedad que es más probable que infecte a mujeres embarazadas y sus recién nacidos, adultos de 65 años o mayores y personas inmunocomprometidas (de Noordhout et al., 2014). Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, 2016) informaron que se estima que 1600 personas contraen listeriosis

cada año y aproximadamente 260 mueren a causa de ella. Por lo cual la agencia de inocuidad alimentaria de Estados Unidos, ha dictaminado cero tolerancia respecto a la presencia de esta bacteria en carne lista para su consumo (FSIS/USDA, 2003).

A pesar de lo antes mencionado, existen registros de brotes y decomisos asociados con este patógeno. En el año 2018, la CDC reportó que hubo un brote de listeriosis en productos de puerco (hamburguesas) y otro vinculado a jamón. Por otro lado, la agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, 2019a), posee en su base de datos, una lista de todos los fideicomisos potencialmente contaminados por tal bacteria en donde se ven involucrados productos cárnicos. Lo cual, a su vez, conlleva a una gran pérdida económica por motivo de retiro del producto del mercado. Debido a estos reportes, la industria se ve en la necesidad de mejorar los métodos microbiológicos de detección actuales y al mismo tiempo implementar nuevas tecnologías para el control de este patógeno y asegurar la inocuidad de los productos cárnicos.

2.4 Métodos para el Control Microbiológico en la Industria de la Carne

Se les conoce como métodos para el control microbiológico a todos aquellos procesos que tienen como finalidad evitar el desarrollo bacteriano, en este caso particularmente dentro de la industria de la carne, y con ello prevenir la merma e incidencia de brotes. De manera muy general, estos métodos se han establecido para controlar la calidad y preservar los productos al mismo tiempo que se asegura su inocuidad. Sin embargo, existen limitaciones dentro de los métodos actuales que va en relación a los altos costos de inversión y control completa de las variables y su impacto en la calidad y aceptabilidad de los productos. Por lo que en los últimos años se ha trabajado en la optimización de los métodos físicos ya establecidos y la aplicación de sustancias químicas con interacciones sinérgicas entre los métodos. Estas nuevas tecnologías buscan mejorar la inocuidad de la carne y minimizar la deterioración de la calidad mediante la disminución de los tiempos de exposición frente al tratamiento. Además, es altamente deseable que sean de bajos costo, así como al mismo tiempo que sean amigables al medio ambiente y que tengan una mejora efectiva al valor añadido de los productos (Pereira & Vicente, 2010).

2.4.1 Métodos Físicos para el Control de Patógenos en la Carne

Recientemente, se han investigado y aplicado diversos métodos físicos para el control de bacterias en carne, dentro de los principales se encuentran: la ozonificación, luz pulsada, irradiación (radiación con UV) y altas presiones (Huang et al., 2017; Pandiselvam et al., 2019; Pedrós-Garrido et al., 2018). Si bien estos procesos tienen un alto potencial, su implementación a nivel industrial requiere una inversión sumamente elevada, tanto en su adquisición, como en su operación, lo cual ha limitado su implementación y uso rutinario en la industria cárnica. De tal manera que, en la actualidad, el método físico tradicional por excelencia sigue siendo el tratamiento térmico, y es aún el más estudiado y de mayor uso para el control microbiológico. Además, es más económico en comparación con los procesos antes mencionados que requieren más recursos.

Los tratamientos térmicos utilizados para la conservación de la carne y sus productos consisten en modificaciones de temperatura ya sea por el decremento, como la congelación y refrigeración; o el incremento, como la esterilización, pasteurización y la cocción (Smelt & Brul, 2014). Para cuestiones prácticas, a los procesos en los que se aplica calor para el control microbiológico, son los que comúnmente se denominan como procesos o tratamientos térmicos. La intensidad de estos tratamientos va a depender del tipo de microorganismo o espora a tratar, y estos pueden afectar las propiedades organolépticas de la carne Los procesos térmicos tradicionales para el control microbiológico son la esterilización y la pasteurización.

2.4.1.1 Esterilización. La esterilización es un tratamiento térmico el cual usa una temperatura de 121 °C durante al menos 15 minutos. Tales condiciones son efectivas para inactivar a cualquier patógeno, incluyendo sus esporas. Por lo cual, es un proceso utilizado especialmente en producto enlatados en contra de *Clostridium spp* (Ryniecki et al., 2018). Desde el punto de vista microbiológico, es el tratamiento térmico más efectivo de todos el cual asegura la inocuidad del producto en su totalidad. Sin embargo, existe una desventaja, al usar dichas condiciones se sacrifica la calidad del producto, ya que se generan cambios desfavorables en las características organolépticas en el producto final. Esto ocasiona una disminución en la preferencia y

aceptabilidad de los productos cárnicos con este tipo de procesamiento. Por esta razón la industria se encuentra en constante desarrollo e implementación de procesos térmicos menos severos como la pasteurización.

2.4.1.2 Pasteurización. La pasteurización consiste en usar temperaturas por debajo de los 100 °C, generalmente entre los 60 y 80 °C, con el fin de controlar la cantidad de microorganismos en los productos (Ryniecki et al., 2018). Este tratamiento es menos severo que la esterilización y solo conlleva a la inactivación de ciertos microorganismos de interés. Debido a que se usan temperaturas menores a las de la esterilización, las características organolépticas del producto final se ven menos perjudicadas. Sin embargo, al mismo tiempo que se reduce la severidad del proceso térmico los productos cárnicos se conservaran menos tiempo debido a la microbiota restante, además de que existe la posibilidad de que bacterias patógenas termoresistentes sobrevivan durante el tratamiento aplicado. Recientemente, con el fin de satisfacer las demandas de los consumidores se ha implementado el proceso térmico *sous-vide*, muy similar al del pasteurizado con la diferencia de que en este se manejan condiciones de vacío.

2.4.2 *Sous-vide* Como Proceso de Pasteurización

Actualmente, se ha intensificado el estudio e implementación de la pasteurización al vacío, o denominada también *sous-vide*, con la finalidad de crear o mejorar la calidad sensorial de nuevos productos cárnicos y/o los tradicionales. Este método consiste en introducir el alimento, crudo o precocinado, en bolsas de plástico, sellarlas con vacío y someterlas a temperaturas moderadas controladas con precisión (Baldwin, 2012). Este proceso ofrece una alternativa contra tratamientos más drásticos o más largos como la esterilización y la pasteurización normal, respectivamente y es considerado como un tipo de procesamiento mínimo. Cabe aclarar que el proceso *sous-vide* también es utilizado como método de cocción. Para distinguir entre una cocción y una pasteurización *sous-vide* dependerá del estadio inicial del producto. Si el producto se maneja crudo

desde un inicio, entonces al proceso se le conoce como cocción *sous-vide*. Por el otro lado, si el producto se maneja con previa cocción, el proceso se denomina pasteurización *sous-vide*.

Este método permite optimizar procesos al mismo tiempo que generar ganancias económicas por medio de la reducción del tiempo y/o la temperatura requerida durante el proceso. Esto, a nivel industrial es de gran impacto, ya que el simple hecho de disminuir tan solo unos minutos el tratamiento requerido, puede ayudar al productor a ahorrar costos de energía además de no perjudicar la calidad del producto, sino al contrario, la mejora. Existen trabajos recientes en donde se ha evaluado el efecto de la pasteurización *sous-vide* en cuanto a las propiedades finales de distintos productos. Jeong et al. (2018), evaluaron este método tomando en cuenta diferentes temperaturas, tiempos y grados de vacío sobre las propiedades de calidad, estructurales y microbiológicas del jamón de puerco. En sus resultados pudieron encontrar satisfactoriamente, que el método *sous-vide* ayuda a mejorar tales características. Sánchez del Pulgar et al. (2012), por su parte evaluaron como el vacío, la temperatura y el tiempo de cocción afectan las características fisicoquímicas, de textura y estructura durante la cocción *sous-vide* de papada de cerdo, encontrando de igual manera que este proceso mejora las características organolépticas en el producto final. Roldán et al. (2013), mencionan que en su experimento el uso de las temperaturas más bajas otorgó mejores características fisicoquímicas, histológicas y estructurales en lomo de cordero

Ahora bien, la disminución, ya sea de la temperatura o el tiempo de exposición frente al tratamiento térmico, puede comprometer la inocuidad del producto frente a la presencia de bacterias patógenas termoresistentes. En especial *L. monocytogenes* que por su habilidad de adaptarse y tolerar condiciones adversas es capaz de evadir barreras químicas antimicrobianas y sobrevivir, principalmente en productos mínimamente procesados (Ciampi, 2009; Dominguez-Hernandez et al., 2018; Hill et al., 2002; Rodrigues et al., 2017; Stringer & Metris, 2017). De tal manera, que ya sea por el tiempo y/o las malas prácticas de manufactura puede conllevar al desarrollo bacteriano, comprometiendo la inocuidad del producto. Entonces, ¿cómo se puede determinar la eficacia de un proceso térmico durante la inactivación de patógenos? La eficacia de los procesos térmicos puede ser evaluada como la sensibilidad de una bacteria al tratamiento térmico a partir del cálculo

de las cinéticas de inactivación térmica; también conocidos como valores-*D* y *z* (O'Bryan et al., 2006).

2.4.3 Valor-*D*, Valor-*z* y Modelos de Predicción.

Los valores-*D* y *z* miden la sensibilidad de una bacteria frente al tratamiento térmico y por lo tanto pueden ser utilizados para determinar la eficacia de tratamientos en la inactivación de patógenos. Al graficar el Log del número de células bacterianas que sobreviven a la exposición del calor vs el tiempo de exposición al tratamiento térmico (Figura 1), la pendiente de la línea que se dibuja permite el cálculo del valor-*D* o tiempo de reducción decimal (min), que indica el tiempo requerido a una temperatura específica, para inactivar al 90 % de la población bacteriana. En otras palabras, el tiempo requerido para la reducción de un ciclo logarítmico en el número de microorganismos a una temperatura determinada.

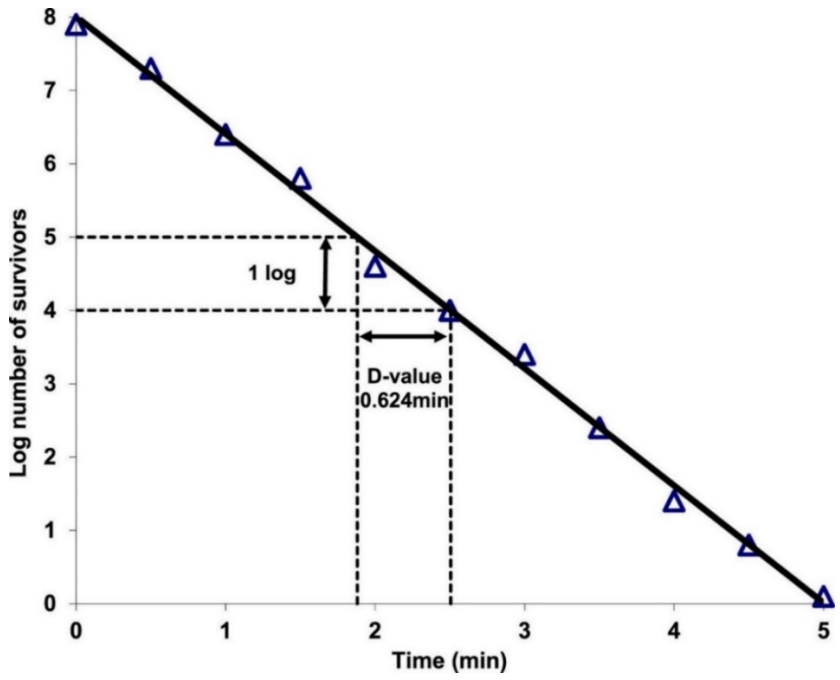

Figura 1. Definición del valor-*D*. Para una inactivación isotérmica, el valor-*D* es el tiempo requerido para conseguir una reducción de un ciclo log en una bacteria viable a una temperatura dada.

Cabe resaltar que el cálculo del valor-*D* durante la inactivación térmica de patógenos es específico para cada patógeno, así como para la composición *per se* (grasa:magro) y formulación (aditivos) de la matriz cárnica. A continuación, se presenta en el Cuadro 1, distintos valores-*D* para *L. monocytogenes* en diferentes matrices cárnicas, en donde se pueden observar estos efectos por las variaciones entre el tipo de matriz cárnica, composición y formulación del platillo. Se puede apreciar que, independientemente de su formulación, en los platillos a base de carne de res, los valores-*D* son menores en comparación con las otras matrices cárnicas (pollo, pavo), lo que indica una mayor sensibilidad del patógeno, frente al efecto letal del calor. Llegando a obtener inclusive valores-*D* hasta tres veces menores.

Cuadro 1. Valores D para *L. monocytogenes* en distintas matrices cárnicas.

Matriz cárnica	**Valores D-60 (min)**	**Autor**
Carne de puerco marinada en salsa de tomatillo (tomate verde)	3.24	Valenzuela-Melendres et al., 2016
Carne de res marinada en salsa de chile rojo	3.51	
Carne molida de res	4.33	Juneja et al., 2013
Carne de res molida	3.91	Murphy et al., 2004
Carne de pavo molida	8.05	
Empanadas de pollo frito	22.98	Osaili et al., 2006
Pechuga de pollo marinada en Teriyaki	10.39	Karyotis et al., 2017

Por otra parte, otro parámetro importante que describe la sensibilidad de un microorganismo al calor es el valor-*z*. Conforme la temperatura aumenta, el valor-*D* disminuye y el rango del cambio de temperatura en el valor-*D* es representado por el valor-*z*. En la Figura 2 se observa que este valor indica el cambio de temperatura en el que se obtiene una variación de un Log en el valor-*D*. El valor-*z* es la constante de resistencia térmica (°C) que hace referencia a la medida del incremento de temperatura requerida para causar una reducción del 90 % en el tiempo de reducción decimal. El valor-*z* se puede calcular a partir de la inactivación térmica del patógeno haciendo uso de los factores de experimentación con diferentes temperaturas (Stringer & Metris, 2017).

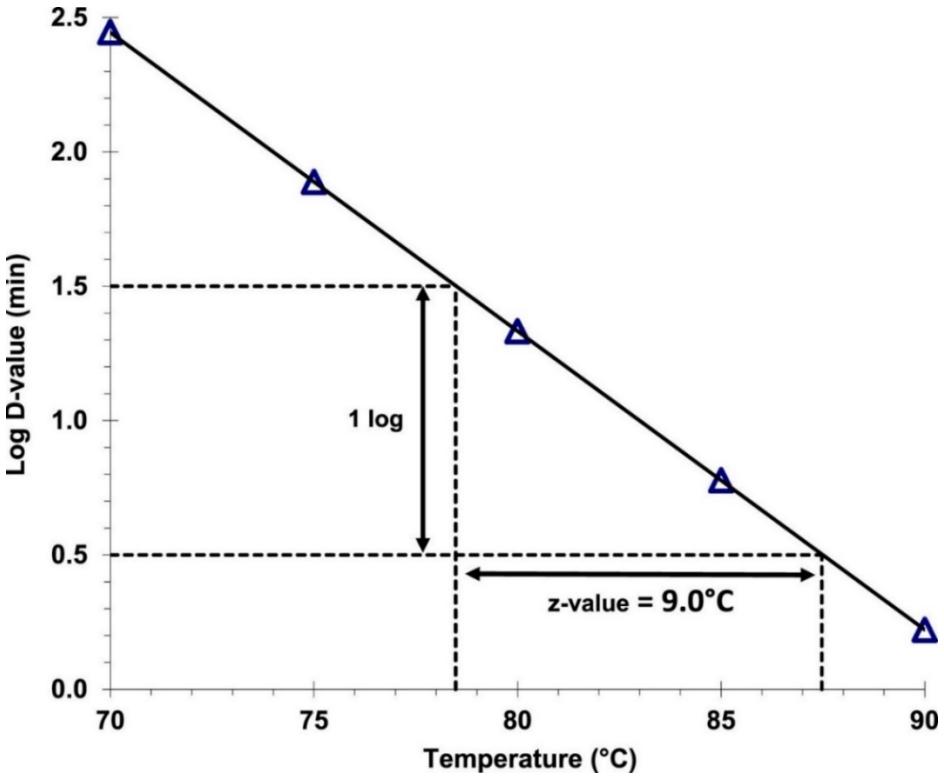

Figura 2. Definición del valor-*z*. El valor-*z* es el incremento requerido de la temperatura para una reducción de un ciclo log en el valor-*D*.

Por lo tanto, los valores-*z* son calculados a partir del conjunto de valores-*D* para una determinada temperatura. El valor-*z* tienen su función para poder calcular la letalidad térmica o bien, valor-*F*. Este valor hace referencia al tiempo (minutos) que se requiere para obtener la inactivación bacteriana a una temperatura definida (°Celsius), en un alimento específico. La letalidad térmica,

dentro de la industria también es conocida como esterilidad comercial y para su cálculo se utiliza la siguiente fórmula matemática (ecuación 1).

$$\text{(ec. 1)}\quad F = \int_0^t 10^{\frac{T-T(ref)}{z}}\, dt$$

En la práctica, por medio del valor-*F*, se puede calcular la severidad de procesos térmicos dinámicos. Por ejemplo, si se desea asegurar una reducción de 6 logaritmos de *L. monocytogenes*, se puede calcular la temperatura necesaria dentro de un empaque de comida de manera de que este sea calentado por 20 minutos en un baño de agua a 66 °C. Asimismo, este tratamiento térmico puede calcularse para que sea equivalente a calentar por 2.2 minutos a 70 °C y que sea suficiente para asegurar la inactivación del patógeno (Stringer & Metris, 2017). Posteriormente, los resultados, pueden subirse a una base de datos, de la cual, la industria puede tomar los datos y hacer uso de ellos para establecerlos como parte de su proceso térmico en la inactivación de patógenos.

De acuerdo con lo anterior, cabe resaltar la importancia de determinar estos valores de manera específica para cada tipo de productos a base de carne de res. Hay que tomar en cuenta que no se desea afectar de manera negativa las características organolépticas del producto a causa del incremento de la temperatura para la inactivación de los patógenos. De tal manera, que lo que se desea es obtener un producto de calidad, pero que al mismo tiempo posea un control microbiológico apropiado. Por estas razones se hace uso de aditivos químicos como métodos de barrera adicional con el fin de que actúen en sinergia con los tratamientos térmicos actuales. Así, se podrán mejorar las condiciones de elaboración de productos con el fin de asegurar la inocuidad del producto final al mismo tiempo de obtener características organolépticas deseables para el consumidor.

2.4.4 Métodos Químicos para el Control de Patógenos en la Carne

Los métodos químicos son aquellos en donde se añaden sustancias adicionales a los productos, ya sea como parte de su formulación, sin aplicar necesariamente un proceso, o para que actúen como barreras antimicrobianas en combinación con el tratamiento físico. Estos se clasifican en dos tipos: inorgánicos y en orgánicos y naturales. Dentro de los inorgánicos se encuentran los fosfatos, sulfatos, sorbatos, nitritos y el cloruro de sodio (NaCl), también conocido como la sal de mesa, los cuales son aditivos alimentarios ampliamente utilizados en los productos cárnicos. La implementación de estos tipos de aditivos a la carne es principalmente para dar características de funcionalidad, sabor y su conservación.

2.4.5 La Sal Como Aditivo en la Industria de la Carne

El cloruro de sodio (NaCl o sal de mesa) es un aditivo que ha sido utilizado a lo largo del tiempo, primeramente, como un ingrediente que se utilizó en altas concentraciones como un mecanismo para el control y preservación de la carne. Esto es debido a su capacidad para reducir la actividad de agua en el alimento. La sal actúa entrando al citoplasma de la bacteria donde eventualmente, debido a la alta concentración, causara la lisis de la bacteria por medio de la despolarización de la membrana. Actualmente el uso de la sal en la industria de la carne está más enfocado en la funcionalidad tecnológica que proporciona a los productos cárnicos por su capacidad de extraer la proteína que ayuda en la emulsificación durante la elaboración de productos cárnicos; además proporciona sabor. No obstante, su habilidad para actuar como agente conservador, y por lo tanto como método de barrera químico depende del nivel de concentración y del tipo del producto cárnico (Balamurugan et al., 2016; CHEN & SHELEF, 1992; Taormina, 2010).

Los productos cárnicos contienen alrededor del 2 al 3% de sal (AMI, 2009; Ruusunen & Puolanne, 2005) y debido a que se ha demostrado que existe una correlación positiva entre el alto consumo de sodio y la prevalencia de problemas cardiovasculares como la hipertensión, enfermedades

coronarias y fallo renal, se ha recomendado reducir el consumo de sodio en la dieta. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido un consumo máximo de 2g/día de sodio, lo que es equivalente a 5g/día de sal de acuerdo con la relación de estequiometria en la formula molecular. Asimismo, por parte de Estados Unidos, la FDA (2019b), ha establecido que el consumo diario de nivel de sodio en la dieta debe ser menor a 2300 mg/día.

No obstante, existe evidencia de que la reducción de sal en los productos cárnicos puede conllevar a un riesgo sanitario, ya que al reducirla se promueve más rápido la putrefacción de productos cárnicos crudos (Fougy et al., 2016) debido a la eliminación de una barrera química para el control de patógenos. Sin embargo, estudios como el de Juneja et al. (2014) y Juneja et al. (2013), han observado que el aumento en los niveles de sal en el producto cárnico ejerce un efecto protector para *L. monocytogenes*, volviendo a la bacteria más termoresistente frente al tratamiento térmico. Por este motivo la disminución o el incremento en los niveles de sal puede afectar directamente en la resistencia térmica de *L. monocytogenes*.

Por otro lado, estudios como el de Jaenke et al. (2017), muestran que en carnes procesadas (salchichas, salmón ahumado, jamón de puerco, pollo y carne marinada) es posible reducir hasta un 70% la sal, sin impactar significativamente la aceptabilidad del consumidor. Sin embargo, se recomienda hacer uso de otras sustancias como método de barreras en contra de patógenos. Por lo que existe un reto actual para la industria en donde es necesario optimizar los niveles de sal y conocer la concentración que al mismo tiempo permita asegurar la inocuidad del producto cárnico (Desmond, 2006). Por lo anterior, como respuesta a la demanda de los consumidores en cuanto a la reducción de los niveles de sal, recientemente se han realizado investigaciones sobre la efectividad de compuestos de origen natural respecto a su actividad antimicrobiana contra patógenos, dentro de las cuales se destacan los extractos de diversas plantas o frutos y las bacteriocinas provenientes de bacterias ácido lácticas (Ghabraie et al., 2016).

2.4.6 Bacteriocinas: La Nisina como Antimicrobiano de Origen Natural

Las bacteriocinas son compuestos peptídicos, sintetizadas ribosomalmente por bacterias acido lácticas (BAL). Por su origen alimentario son consideradas como compuestos "generalmente reconocidas como seguras" (GRAS por sus siglas en ingles), y son ideales como alternativa para usarse como biopreservantes o biocontroladores microbianos (Chikindas et al., 2018). Existen diversos tipos de bacteriocinas que provienen de diferentes BAL, lo que permite diferenciarlas y clasificarlas (Field et al., 2018; Monroy & Jos, 2009). Dentro de las termoestables se encuentran la clase I, donde la principal bacteriocina de este grupo es la nisina, proveniente de *Lactococcus lactis* (Nazir et al., 2017). La nisina además de ser la más estudiada, es la única aprobada hasta el momento por la FDA para ser utilizada como preservativo en los alimentos. Tanto el Reglamento Tecnico Centroamericano (RTCA, 2005) y la USDA establecen un máximo de 500mg/kg de nisina comercial (96% de pureza) en carnes y productos cárnicos de la ingesta diaria (Jones et al., 2005).

Estos compuestos han sido estudiados, en los últimos años, y han demostrado tener la habilidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, tanto deteriorativos como patógenos, lo cual extiende la vida útil del producto alimenticio preservando su valor nutritivo y su inocuidad (Monroy & Jos, 2014). Las bacteriocinas, cuentan con gran poder bactericida y/o bacteriostático, son altamente específicas contra cepas de la misma especie (Singh, V. P., 2018), son efectivas en amplios rangos de pH, siendo más efectivas en concentraciones ácidas (Chikindas et al., 2018), y son termoestables (<10kDa) (Alvarez-Sieiro et al., 2016). Esta última característica las vuelve idóneas para ser usadas como parte de la tecnología de barreras, en combinación con otros agentes antimicrobianos o con tratamientos físicos, como lo es la cocción *sous-vide* (Jones et al., 2005).

La nisina (clase I-lantipéptidos), tiene un mecanismo dual a través de la inhibición de la síntesis de la pared celular y la formación de poros. Ambos mecanismos son facilitados por la unión de la molécula de la nisina en el lípido II, que es el principal transportador de subunidades de peptidoglicano (las unidades de la pared celular). En concentraciones bajas, la nisina impide la adecuada síntesis de la pared celular, lo que conduce a la bacteria a su inactivación. Mientras que, a concentraciones altas, la nisina se une al lípido II, con lo que comienza la inserción en la

membrana y la formación del poro, lo cual conduce a la pérdida de componentes celulares tales como los iones y el ATP (Perez et al., 2015).

El empleo de estas sustancias es un método de gran interés en la industria de la carne para inhibir o destruir a microorganismos patógenos como *L. monocytogenes*, y tiene como objetivo final la obtención de un producto inocuo para el consumidor (Ramu et al., 2015; Singh, V. P., 2018). En el Cuadro 2, se muestran distintos trabajos en donde se ha evaluado el uso de la nisina para la reducción logarítmica de *Listeria spp* en diferentes tipos de productos cárnicos, empleando diferentes métodos de aplicación (solución, aerosol, superficialmente), o en combinación con otras sustancias químicas. y/o la aplicación de calor. En los resultados de estos trabajos se evidencia la capacidad que tiene la nisina para reducir la presencia de este patógeno, independientemente de la matriz con la que experimentaron. Sin embargo, en las referencias buscadas no fue posible encontrar algún reporte en donde se haya evaluado el efecto de la nisina en la cinética de inactivación térmica de *Listeria* spp. en algún tipo de matriz cárnica. Por lo tanto, sería de gran relevancia poder evaluar el efecto de distintas concentraciones de nisina sobre los parámetros térmicos de *Listeria monocytogenes*, y una manera de poder analizar tal efecto es a partir de un modelaje por medio de la microbiología predictiva.

Cuadro 2. Investigaciones sobre la actividad antimicrobiana de la nisina con distintos tratamientos físicos y/o químicos en diferentes productos cárnicos.

Tratamiento	Patógeno	Matriz	Autor
Nisina con EDTA + atmosfera modificada	Bacterias Gram positivas	Pollo fresco	Economou et al., 2009
Lisozima, nisina y EDTA (superficialmente)	*L. monocytogenes*	Jamón y bologna	Gill & Holley, 2000
Nisina en spray + vacío	*L. innocua*	Carne de res	Cutter & Siragusa, 1996
Nisina y/o lisozima + pasteurización en empaque	*L. monocytogenes*	Bologna de pavo lista para consumo	Mangalassary et al., 2007, 2008
Calor + nisina	*L. monocytogenes*	Medio de cultivo	However et al., 2000; Modi et al., 2000

2.5 La Aplicación de la Microbiología Predictiva en la Industria de la Carne

La microbiología predictiva hace uso de los modelos matemáticos con el fin de predecir el control microbiano en función de las condiciones ambientales y de cultivo específicas. Por lo tanto, existen diferentes tipos de modelos (primarios, secundarios y terciarios) y estos deben ser seleccionados tomando en cuenta el propósito de la investigación (McKellar & Lu, 2004). Los modelos son herramientas muy efectivas en cuanto al desarrollo de tratamientos térmicos para el control de patógenos de una manera más sistemática y eficiente (Li et al., 2018). Estos son utilizados para estimar tiempos y temperaturas requeridas para garantizar reducciones logarítmicas específicas de patógenos. Una de las principales aplicaciones de la microbiología predictiva radica en que a partir de los modelajes, estos pueden ser de gran utilidad dentro de la industria como estrategias de control de calidad y se pueden incorporar a sistemas de inocuidad alimentaria como lo es el HACCP (Adams et al., 2015).

Un modelo de primer orden es aquel que describe el comportamiento de un patógeno en función del tiempo de calentamiento, donde la temperatura es uniforme. Mientras que un modelo de segundo orden es aquel que se desarrolla por medio de una regresión paso a paso o una regresión por superficie de respuesta para predecir la variable respuesta (valores-*D*) adquirida a partir de un modelo primario; de acuerdo a cualquier otra variable independiente. En otras palabras, un modelo secundario es el resultado de un primer modelaje afectado por la temperatura y otro factor involucrado, como la concentración de aditivos de la formulación de un producto cárnico (Gil et al., 2017).

Existen trabajos en donde por medio de diferentes modelos de primer orden se ha evaluado la inactivación térmica de patógenos en distintas matrices cárnicas. Siguemoto et al. (2018), por medio del modelo de Weibull, obtuvieron las cinéticas de inactivación por tratamientos isotérmicos convencionales sobre *E. coli* y *L. monocytogenes*. Osaili et al. (2006), usaron un modelo de regresión lineal en el cálculo de las cinéticas de inactivación térmica de *E. coli* O157:H7, *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes* en empanadas de carne con pollo molido listo para su

consumo. López et al. (2018), hicieron uso del modelo de Baranyi, para el cálculo de los valores-D sobre la inactivación térmica de *Salmonella spp.* en pollo molido.

2.6 Metodología de Superficie de Respuesta

La metodología de superficie de respuesta es una herramienta que consiste en un modelaje de segundo orden con el fin de explicar los efectos e interacciones de dos o más factores a través de una variable respuesta, además permite optimizar tal respuesta por el análisis de la superficie ajustada (McKellar & Lu, 2004; Dean et al., 2017). Esta metodología puede ser usada para la predicción de características de calidad en la elaboración de un producto, en química analítica, para la optimización de la actividad antimicrobiana de ciertos compuestos frente a bacterias, entre otras aplicaciones (Ammer et al., 2016; Bezerra et al., 2008; Dean et al., 2017; Sangcharoen et al., 2017).

Existen trabajos recientes en donde se han generado modelos de predicción para el crecimiento o inhibición para *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos, que han demostrado la efectividad de sustancias orgánicas y de origen natural. Estos antimicrobianos se han evaluado ya sea solos, combinados o en sinergia con un tratamiento térmico para determinar su efecto en la inactivación térmica de *Listeria monocytogenes*. En la literatura se han reportado distintos modelos primarios y secundarios. En el Cuadro 3 se muestran diferentes matrices cárnicas las cuales fueron tratadas con distintos marinados o aditivos en donde se predijo la letalidad térmica de *L. monocytogenes* y se observaron los efectos de los tratamientos a partir de un modelaje.

Cuadro 3. Investigaciones de inactivación térmica de *L. monocytogenes* que generaron modelos de predicción primarios y secundarios.

Tratamiento	Matriz	Efectos	Autor
Salsa Teriyaki	Pechuga de pollo	Lineales	Karyotis et al., 2017
Extracto de semilla de toronja	2 platillos: puerco y res	Lineales y de interacción	Valenzuela-Melendres et al., 2016
Lactato de sodio, diacetato de sodio y pediocina	Bologna	Lineales, cuadráticos y de interacción	Maks et al., 2010
Sal y polifenoles de manzana	Carne molida	Lineales, cuadráticos y de interacción	Juneja et al., 2013

En un estudio realizado por Singh et al. (2016), utilizaron esta metodología para la optimización de las temperaturas de cocción del tratamiento *sous-vide* y almacenamiento. Ellos observaron en sus resultados que por medio de este método el producto final puede tener mejores oportunidades dentro del mercado ya que presentó límites aceptables de los parámetros bioquímicos, microbiológicos y de evaluación sensorial por 65 días de almacenamiento.

Por medio del uso de estas herramientas se satisface y se asegura la inocuidad de productos cárnicos listos para su consumo que el cliente opta por consumir hoy en día. Además, a partir de esta herramienta se le puede ofrecer a la industria que manejan tratamientos drásticos, una alternativa en sus procesos actuales. De esta manera se puede llegar a generar un ahorro que se traduciría en una ganancia económica al reducir el tiempo y/o la temperatura requerida en los tratamientos actuales. Asimismo, los resultados obtenidos a través del modelaje pueden incorporarse a base de datos abiertas al público, para que la información este al alance y, quien vaya a realizar un producto con características similares o con sustancias previamente modeladas puedan hacer uso de la información. Sin embargo, no hay un modelo predictivo que incluya la nisina y sal como factores

en carne de res marinada en salsa chipotle y debido a que es un alimento en tendencia es necesario conocer el comportamiento que tendrá el patógeno de interés en tal producto.

.

3. HIPOTESIS

La adición de nisina es capaz de reducir el tiempo para inactivar térmicamente a *Listeria monocytogenes* en carne de res molida en salsa chipotle con niveles bajos de sal.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la nisina y sal en los parámetros de inactivación térmica (valores-*D* y *z*) de *Listeria monocytogenes* durante el proceso *sous-vide* de carne de res molida marinada en salsa chipotle y generar su modelo de predicción.

4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la nisina y sal en la reducción térmica de *Listeria monocytogenes* en carne molida de res en salsa chipotle (establecer los valores-*D* y *z*).

- Generar un modelo de predicción de los valores-*D* de *Listeria monocytogenes* en carne molida de res en salsa chipotle en función de la temperatura, y concentración de nisina y sal añadidas en la formulación.

- Establecer las condiciones óptimas de temperatura, concentración de nisina y sal para la inactivación térmica de *Listeria monocytogenes* en carne molida de res en salsa chipotle.

- Validar las condiciones óptimas obtenidas mediante el modelo de predicción del valor-*D* de *Listeria monocytogenes* en carne molida de res es salsa chipotle.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La parte experimental del proyecto se realizó en la Unidad de Investigación e Inocuidad de Alimentos del Servicio de Investigación Agricola (ARS, por sus siglas en inglés) del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (del inglés, USDA) en Wyndmoor, Pensilvania, Filadelfia.

5.1 Diseño Experimental

Con la finalidad de optimizar y modelar el efecto combinado de la nisina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), NaCl (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) y la temperatura sobre la inactivación térmica de los patógenos, se usó un diseño compuesto central de precisión uniforme (Cuadro 4). El diseño del experimento consistió de 8 puntos factoriales, 8 puntos axiales a una distancia de ±1.68 del centro y seis réplicas del punto central, con un total de 20 tratamientos. Este diseño tuvo como factores de variación diferentes concentraciones de nisina (0, 30, 75, 120 y 150 UI) y sal (0, 0.4, 1, 1.6 y 2 %), así como diferentes temperaturas (55, 57, 60, 63 y 65 °C). Además, se incluyeron 5 tratamientos sin nisina y sal como controles negativos, correspondientes a cada temperatura de prueba, y cada condición experimental se realizó por duplicado.

Cuadro 4. Diseño compuesto central de precisión uniforme para temperatura, nisina y sal.

	-α	-1	0	+1	+α
Temperatura (°C)	55	57	60	63	65
Nisina (UI[1])	0	30	75	120	150
Sal (%)	0	0.4	1	1.6	2

[1] Unidades internacionales

Estadísticamente los efectos de los factores se analizaron por superficie de respuesta y el modelo predictivo se generó por medio de regresión lineal múltiple. Los criterios de inclusión en el modelo

predictivo de los factores evaluados se determinaron mediante el programa estadístico JMP 11. El modelo matemático correspondiente al diseño central compuesto se puede observar en la ecuación 2.

$$\text{(Ec. 2)} \qquad y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i X_1 + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i<j}^{3} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Donde *y* son los valores-*D* (minutos); *β0, βi, βii*, y *βij* son el intercepto, los coeficientes del efecto linear, cuadrático, y la interacción, respectivamente; y *Xi-j* son las variables independientes temperatura, nisina y sal.

5.2 Activación de Cepas y Preparación de los Inóculos

Se utilizaron cinco cepas de *L. monocytogenes* (Cuadro 5), las cuales estaban crioconservadas a -80 °C en Caldo Infusión Cerebro-Corazón (Difco Laboratories Inc., Detroit, MI) con 15% de glicerol. Estas se activaron transfiriendo 0.1 mL del inoculo al mismo medio y se incubó a 37 °C durante 24 h. Se realizaron dos transferencias bajo las mismas condiciones. Posteriormente, a partir del inoculo anterior, se transfirió 0.1 mL a 50 mL de caldo soya tripticasa (Sigma-Aldrich, S. Louis, MO) y se incubó a 37 °C por 16 h con agitación constante. Por último, cada cultivo se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos, se decantó, se le agregó a cada cultivo 9.9 mL de agua peptonada al 1% y se realizó una segunda centrifugación con las mismas condiciones. Para fines experimentales se preparó un coctel de las cinco cepas activadas de *L. monocytogenes*. Este se preparó al agregar 2 mL de agua peptonada al precipitado resultante de las centrifugaciones. Por último, se diluyeron y combinaron todas las cepas.

Cuadro 5. Cepas utilizadas con su designación y origen de aislamiento.

Coctel de cepas	Designación	Aislamiento
Listeria monocytogenes	Scott A	Clínico (Resistente a bajos pH)
Listeria monocytogenes	MF27137	Vaquilla/Novillo
Listeria monocytogenes	MF385221	Pollo molido
Listeria monocytogenes	MF46869	Salchicha de puerco fresca

5.3 Obtención de la Matriz Cárnica y Preparación de la Salsa de Chipotle

La carne molida de res (semimembranosus) 80:20 (magro:grasa) se obtuvo de un comercio de la localidad en un solo lote, con el fin de homogenizar la matriz y obtener las mismas características para todas las repeticiones. La carne fue almacenada en congelación a -20 °C hasta 24 h antes de su uso, esta fue precocida a 90 °C durante 10 minutos. Para la elaboración de la salsa chipotle se utilizaron tomates saladette, y chiles chipotles adquiridos de un mercado de la localidad y en línea, respectivamente. La salsa se preparó mezclando y licuando los ingredientes en una concentración final de 7% chile chipotle, 93% tomate y 1% sal. La nisina y el NaCl se añadieron como parte de la formulación de la salsa chipotle de acuerdo a las proporciones establecidas por tratamiento.

5.4 Preparación de la Muestra

El platillo de carne con chipotle se preparó mezclando (Magic bullet, USA) la carne y la salsa chipotle en una proporción de 3:2, añadiendo en la salsa las distintas concentraciones de nisina y sal de acuerdo al esquema del diseño central compuesto (Cuadro 4). Muestras de 5 g del platillo fueron colocadas en bolsas para vacío y fueron refrigeradas a 8 °C.

A cada bolsa se le inoculó 0.1 mL del coctel bacteriano de *L. monocytogenes* y se mezclaron mecánicamente por medio de una mezcladora de bolsas (MiniMix Bag Mixer, Interscience, St. Nom., France) durante dos minutos para lograr su distribución homogénea en toda la muestra y

obtener una concentración final $\geq 10^7$ log UFC/g. Posteriormente, cada bolsa fue comprimida contra una superficie plana hasta la formación de una capa delgada (0.5 – 1 mm de espesor), con el fin de asegurar la distribución uniforme del calor en la muestra. Finalmente, las bolsas fueron selladas en una selladora al vacío (Model A300/16, Multivac Inc., Kansas City, MO) y se procedió al tratamiento térmico.

5.5 Inactivación Térmica y Conteo Bacteriano

Las muestras preparadas para cada tratamiento fueron colocadas en un recipiente con divisiones. Después se sumergieron en un baño de agua caliente (VWR, 89202-990, USA) para proceder a realizar la pasteurización *sous-vide*, a la temperatura indicada por el diseño central compuesto a intervalos de tiempo definidos, según la temperatura de exposición. Se monitoreó la temperatura interna a través de termopares (Fisher®, 15060300, USA) colocados por dentro y en el centro de una muestra y cuando esta alcanzó la temperatura establecida de acuerdo al tratamiento, se retiró del baño de agua y se determinó como el tiempo inicial o cero. Después de cada tratamiento térmico, las muestras fueron sumergidas en un baño de agua-hielo durante dos minutos y se analizaron después de 90 min, con el fin de que las bacterias térmicamente estresadas se recuperen y simular lo más posible a un escenario real.

Cada bolsa se abrió en condiciones estériles, se les agregó 5 mL de agua peptonada y fueron homogenizadas mecánicamente durante dos minutos. Posteriormente, se transfirió el exceso de líquido de cada muestra a tubos de ensayo y se realizaron las diluciones seriadas correspondientes en tubos de ensaye con agua peptonada. Después se sembraron en placas de agar soya tripticasa (Difco, Sparks, MD) y una vez con las cajas petri sembradas, por medio de la técnica de extendido en placa, se le agregó una capa adicional de agar selectivo Oxford modificado (BD, France) y estas fueron incubadas a 30 °C (Labline-Thermo Scientific 460-1CE, USA) por 48 h. Después del tiempo de incubación se realizó un conteo de las células sobrevivientes.

5.6 Análisis Cinético

A partir de los resultados de los conteos bacterianos se calculó el logaritmo de unidades formadoras de colonias por gramo (log UFC/g). Estos se modelaron, para el cálculo de los valores-*D* en una curva de muerte térmica a través del modelo de Weibull por medio del programa GinaFit de Excel (Microsoft Office®) y se graficó el log UFC/g en el eje de las *Y* contra el tiempo de calentamiento (minutos) en el eje *X*, a temperatura constante. Por otra parte, el cálculo de los valore z, se realizó a partir del incremento requerido de la temperatura para una reducción de un ciclo log en el valor-*D* por medio del reciproco negativo de la regresión de los valores-*D* en el programa de Excel (Microsoft Office®).

5.7 Análisis Estadístico

Una vez obtenidos los valores-*D*, se determinó la media de cada tratamiento y se seleccionaron las curvas que presentaron un coeficiente de correlación mayor a 0.90. El efecto de la temperatura, concentración de nisina y sal, se determinó a través de un modelo polinomial de segundo orden, el cual incluyó términos lineales, cuadráticos y de interacción de los factores. Los valores-*D* fueron transformados a su raíz cuadrada para normalizar la variación de la variable de respuesta.

El análisis estadístico se realizó por medio del procedimiento de metodología de superficie de respuesta en el paquete estadístico JMP 11. Tal metodología estima el análisis de varianza de la regresión por el método de mínimos cuadrados. La significancia de los factores y sus interacciones se consideraron a niveles de probabilidad en el error de $p<0.05$. El modelo más adecuado, se seleccionó tomando en cuenta el coeficiente de determinación o R^2, la significancia del análisis de varianza (ANOVA) y la no significancia de la falta de ajuste. Se consideraron solo los efectos significativos ($p<0.05$) y se creó un modelo reducido a partir de ellos, se hizo uso de la estrategia de eliminación hacia atrás, paso por paso en base al umbral de significancia del modelo con una probabilidad <0.05. Para representar los efectos de los parámetros estudiados, se construyeron

gráficas de superficie de respuesta en 3D del modelo seleccionado. Por último, haciendo uso de la herramienta de maximizar deseabilidad (las condiciones óptimas fueron determinadas mediante un análisis canónico de la superficie de respuesta/ condiciones óptimas establecidas por el modelo) se obtuvieron los puntos óptimos de cada factor a los que se les realizaron pruebas en el laboratorio y, por último, se compararon los resultados del modelo de predicción con los datos reales por medio de una prueba *t* de ‘’student’’.

Adicional a las corridas experimentales definidas por el diseño compuesto central, con la finalidad de contar con controles negativos, se determinó el efecto de las temperaturas de inactivación estudiadas (55, 57, 60, 63 y 65 °C) sobre el valor D de los patógeno, sin la incorporación de ninguno de los compuestos evaluados. Los valores D generados (tratamientos del diseño y controles negativos), se analizaron en el programa estadístico NCSS12® para la verificación de su normalidad.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Valores-*D* de *L. monocytogenes* en Carne de Res en Salsa Chipotle

Se determinaron los valores-*D* (tiempo de reducción decimal) en la inactivación térmica de un coctel de cuatro cepas de *L. monocytogenes* inoculadas en carne molida de res marinadas en salsa chipotle para establecer los efectos e interacciones de la nisina, sal y la temperatura. Los valores-*D* observados se presentan en el Cuadro 6. Como era de esperarse, los valores-*D*, disminuyeron conforme se incrementó la temperatura; lo que es el resultado de una disminución paralela de la resistencia térmica por parte del patógeno, sin tomar en cuenta la concentración de nisina o sal. Los valores-*D* observados, en los controles negativos, disminuyeron de 30.84 a 0.57 min a 55 y 65 °C respectivamente.

La adición de nisina en el modelo cárnico hizo más susceptible al patógeno frente al tratamiento térmico; la sal, de manera contraria, lo volvió más termoresistente. El incremento de nisina (manteniendo fijo el nivel de sal, ya sea 0.4% o 1.6%) disminuyó el valor-D. A 57 °C, en niveles bajos de sal (0.4%) con la adición de 30 UI de nisina se observó un valor-D de 16.37 min, mientras que al incrementar el nivel de nisina a 120 IU este valor disminuyó en un 4.52% (15.36 min). Sin embargo, al incrementar los niveles de sal (1.6%) con niveles bajos de nisina (30 IU), el valor-*D* aumentó a 19.66 min; mientras que el incremento a 120 UI de nisina lo disminuyó en un 12.76% (17.15 min).

Cuadro 6. Valores-D observados y predichos para la inactivación de *L. monocytogenes* en carne molida de res en salsa chipotle con la adición de nisina y sal.

Temperatura (°C)	**Nisina (IU)**	**NaCl (%)**	**Valor-D Observado[a] (min)**	**Valor-D predicho[b] (min)**
55	0	0	30.84	43.46
	75	1	49.71	51.75
57	0	0	12.22	19.55
	30	0.4	16.37	24.80
	120	0.4	15.36	24.98
	30	1.6	19.66	31.89
	120	1.6	17.15	31.53
60	0	0	3.20	8.77
	75	1	7.84[c]	13.30
	150	1	6.38	10.53
	0	1	12.02	17.37
	75	2	9.88	13.26
	75	0	2.77	6.33
63	0	0	2.47	4.36
	30	0.4	4.00	5.47
	120	0.4	0.27	2.04
	30	1.6	3.63	9.03
	120	1.6	1.83	4.18
65	0	0	0.57	3.71
	75	1	0.57	3.88

[a]Medias de duplicados
[b]Intervalo de confianza, limite mayor
[c]Promedio de las mediciones centrales

A la temperatura de 60 °C, los valores-*D* obtenidos variaron de 2.77 a 12.02 min. La adición de 75 UI de nisina al producto resultó en el valor-*D* más bajo a esta temperatura con una disminución del

13.43% (2.77 min) con respecto al control. En contraparte, la adición de solamente 1% de sal al producto dio como resultado un valor-*D* de 12.02 min, lo que indicó un incremento de 3 veces en la resistencia térmica del patógeno con respecto al control (3.20 min). Ahora bien, al agregar 75 UI de nisina y 1% de sal, se obtuvo un valor-*D* promedio de 7.84 min. Tal valor incrementó a 9.88 min al aumentar el nivel de sal al 2%, pero disminuyó a 6.38 min al aumentar el nivel de nisina a 150 UI. Por último, al comparar el valor-*D* del tratamiento central a 60 °C, con el valor-*D* a la temperatura de 55 °C con la misma concentración de aditivos, el valor-*D* del punto central fue 6 veces menor que el valor obtenido a 55°C. Sin embargo, al aumentar la temperatura a 65 °C, con los mismos niveles de los aditivos, el valor-*D* disminuyó a 0.57 min.

Un comportamiento similar al de 57 °C se puedo observar a la temperatura de 63 °C, es decir, que ambos niveles de sal, el incremento de nisina ocasionó una reducción de los valores-*D*. A 63 °C, la adición de niveles bajos de sal (0.4%) y nisina (30 UI) generó un valor-*D* de 4 min y al aumentar la nisina a 120 UI, se logró disminuir el valor-*D* en un 92.25% (0.27 min). Al aumentar la concentración de sal al 1.6%, los valores-*D* obtenidos fueron 3.63 y 1.83 min con 30 y 120 UI, respectivamente, lo que representa que al incrementar la concentración de nisina permite reducir en aproximadamente un 50% el valor-*D*. Estos resultados hacen notorio el efecto bactericida de la nisina, al disminuir los valores-*D* de los diferentes tratamientos a una misma temperatura. Además de ser mejor el efecto a concentraciones bajas de sal, lo cual fue algo deseable, así este compuesto puede ejercer un mejor efecto antimicrobiano al añadir bajos niveles de sal.

Como ya se ha mencionado, dado que los parámetros térmicos son específicos para cada tipo de alimento, los valores-*D* de *L. monocytogenes* obtenidos en el presente estudio sin aditivos y a diferentes temperaturas (controles negativos), difieren con los reportados en otros estudios. En un estudio realizado con la misma matriz cárnica (carne de res molida), se reportaron valores-*D* para *L. monocytogenes* de 36.91, 11.28, 3.91, 2.40 y 1.41 min a 55, 57.5, 60, 62.5 y 65 °C, respectivamente (Murphy et al., 2004). Al compararlos con los resultados del presente trabajo es posible notar variaciones que pueden ser atribuidas al efecto del marinado (chile chipotle). En un trabajo previo, realizado por Valenzuela-Melendres et al. (2016), se encontraron valores-*D* de 26.19, 6.67, 3.51 y 2.03 min a 55, 57.5, 60 y 62.5 °C, respectivamente, para el platillo típico mexicano de carne de res con chile rojo. Estos valores en comparación con los obtenidos son

menores, posiblemente debido no solo a las diferencias en el tipo de salsas empleadas, sino además a que en el trabajo previo se utilizó carne picada y no molida, como en el presente estudio.

De la misma manera, existen diferencias importantes a comentar entre los resultados del presente estudio con los valores-*D* en otras investigaciones realizadas en diferentes matrices cárnicas como pollo marinado en salsa Teriyaki (Karyotis et al., 2017), muslo/pata de pollo (Murphy et al., 2004) y carne de pavo molida (Murphy et al., 2004) en la inactivación térmica de *L. monocytogenes.* Karyotis et al. (2017), en muslo de pollo marinado en salsa teriyaki, reportaron en sus tratamientos controles, valores-D de 54.81, 14.86 y 10.39 min a 55, 57.5 y 60 °C, respectivamente. Estos valores son 77.7, 21.60 y 224.7 % mayores a los obtenidos en nuestra investigación. Asimismo, Murphy et al. (2004), reportan valores-D de 33.11, 17.09, 8.05, 2.88 y 0.92 min a 55, 57.5, 60, 62.5 y 65 °C, respectivamente, los cuales son 7.36, 39.85, 151, 16.59 y 61.4% mayores a los obtenidos en la investigación.

Esto puede dar a entender que el proceso térmico requerido para la inactivación de *L. monocytogenes* en carne de res es mucho menos drástico que en otro tipo de matrices cárnicas. Lo que a su vez indica que el patógeno es más termosensible en el platillo estudiado y por lo tanto el proceso de letalidad sería menor en comparación con otros productos del mercado, lo cual puede ser benéfico para mantener las características organolépticas en el producto final y cumpliría con las demandas de los consumidores. Los resultados obtenidos confirman que es evidente que hay cambios en los valores-*D* durante la inactivación térmica de *L. monocytogenes* y estos dependen de la temperatura y concentración de nisina y sal añadidos al modelo cárnico, volviéndola más termoresistente o termolábil.

6.2 Modelo Predictivo

Con la finalidad de establecer la significancia de los efectos que ejercieron las variaciones en los niveles de adición de nisina y sal sobre la inactivación térmica de *Listeria monocytogenes* observada, se obtuvo un modelo de regresión. Los valores-*D* observados fueron transformados a

su forma de raíz cuadrada, para normalizar la varianza de la variable de respuesta. La reducción del modelo se realizó con el método de "backward" (eliminando términos) del procedimiento de la regresión, mediante el cual se eliminaron los términos que resultaron no significativos en el modelo completo. En el Cuadro 7 se presentan los coeficientes de regresión en términos codificados de los factores que resultaron significativos, así como sus parámetros estadísticos. Es posible notar en este cuadro que los factores que quedaron excluidos en el modelo fueron las interacciones no significativas NaCl x nisina, NaCl x temperatura y nisina x nisina.

El modelo reducido para la raíz cuadrada de los valores-*D* obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.96, una probabilidad de error <0.0001, y una falta de ajuste no significativa (p>0.05) en el modelo (Cuadro 7). Estos parámetros estadísticos indican que el 96% de la variabilidad de la respuesta fue explicada por el modelo y que describe satisfactoriamente los datos experimentales, por lo que puede ser utilizado para estimar los valores-D dentro de los límites de temperatura, nisina y sal evaluados en este estudio. Esto puede ser constatado en la Figura 3 y en el Cuadro 6 que describen la concordancia entre los valores reales y los predichos por el modelo.

Cuadro 7. Coeficientes de regresión (CR) estimados codificados y análisis de varianza del modelo de regresión para los valores-*D* (min) de *L. monocytogenes* es carne molida de res en salsa chipotle suplementadas con nisina y sal.

Término	**CR**	**Error Std**	**t**	**Prob>|t|**
Intercepto	2.837	0.113	25.11	<.0001*
Temperatura	-1.552	0.092	-16.79	<.0001*
Nisina	-0.268	0.089	-3	0.0076*
Sal	0.310	0.089	3.47	0.0027*
Temperatura*Temperatura	0.292	0.066	4.42	0.0003*
Sal*Sal	-0.243	0.080	-3.03	0.0072*
Nisina*Temperatura	-0.231	0.075	-3.08	0.0064*
R^2	0.96			
Valores p				
Regresión				<0.0001
Falta de ajuste				0.2293

La magnitud del efecto de los factores estudiados se refleja en los coeficientes de regresión codificados (CR^c) obtenidos a través del modelo. Los efectos de estos factores son dependientes del signo que presenten, en otras palabras, un signo positivo indica un incremento en la variable respuesta; por el contrario, un signo negativo se va a reflejar en un decremento de los valores-*D*. El modelo matemático que explica la interacción entre los factores estudiados y da origen a la predicción de los valores-*D* se muestra a continuación en la Ecuación 3.

(Ec. 3) Sqrt(Valor-*D*) = 198.78865 – 6.08997 (Temperatura) - 0.117633 (Nisina) + 1.86989 (NaCl) – 0.002060 (Nisina*Temperatura) + 0.046861(Temperatura^2) – 0.676334 (NaCl^2)

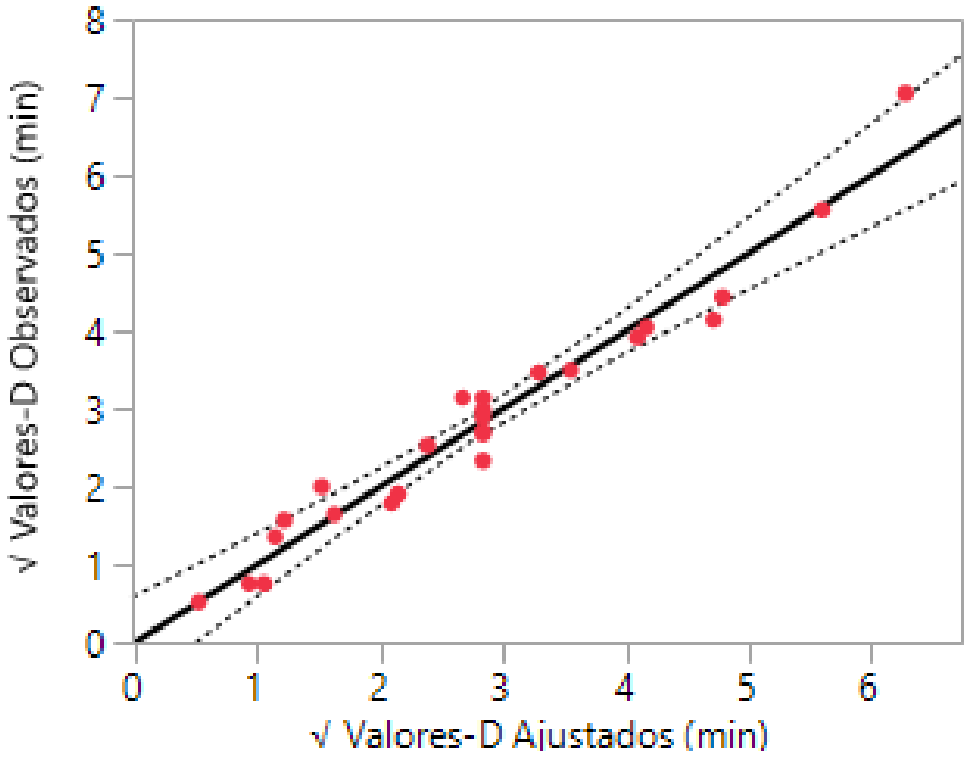

Figura 3. Relación entre los valores-*D* observados y ajustados de *L. monocytogenes* en carne molida de res en salsa chipotle. La línea central (línea de identidad) y las otras líneas representan 95% del límite de confianza.

6.3 Efectos de la Temperatura, Nisina y Sal

La temperatura presentó tanto un efecto lineal como cuadrático significativos ($p<0.05$) en los valores-*D* sobre *L. monocytogenes* en la carne de res en salsa chipotle (Cuadro 7), los cuales se aprecian en la Figura 4. El efecto lineal se puede observar a partir de los 55 °C por medio del decremento paralelo en los valores-*D* conforme aumenta la temperatura hasta aproximadamente los 61 °C. A partir de los 61 °C en adelante se observa como el gráfico presenta un punto de inflexión y el cambio del efecto letal del calor en *L. monocytogenes* es menos marcado en comparación a las temperaturas más bajas. Respecto a los valores predichos de los controles negativos se observó una disminución del 80% en los valores-*D* (34 min) de 55 a 60 °C, mientras que de 60 a 65 °C la reducción solo fue del 20% de 8.77 a 0.57 (8.2 min).

Esto era de esperarse ya que se ha demostrado que la temperatura causa la desnaturalización de las proteínas, ARNr y ADN y, en consecuencia, cambios irreversibles de los lípidos de la pared celular, lo que origina una fuga del contenido intracelular y ocasiona la muerte celular. Cualquier variación en este factor puede llegar afectar significativamente la resistencia térmica del patógeno, y puede comprometer la inocuidad del producto. De tal manera, resulta de gran importancia poner especial atención durante el procesamiento *sous-vide* dado las temperaturas moderadas que se utilizan en este tipo de proceso. El efecto de la temperatura ha sido ampliamente investigado en diferentes matrices cárnicas, incluyendo carne molida de res. En un metaanálisis realizado por Huang et al. (2019), analizaron el comportamiento de valores-*D* en diferentes matrices cárnicas, incluyendo res, para estudiar la resistencia térmica de *L. monocytogenes* en donde pudieron observar, por medio de un modelo reducido, que el 92.4% de las variaciones en la resistencia térmica del patógeno se debían a este factor.

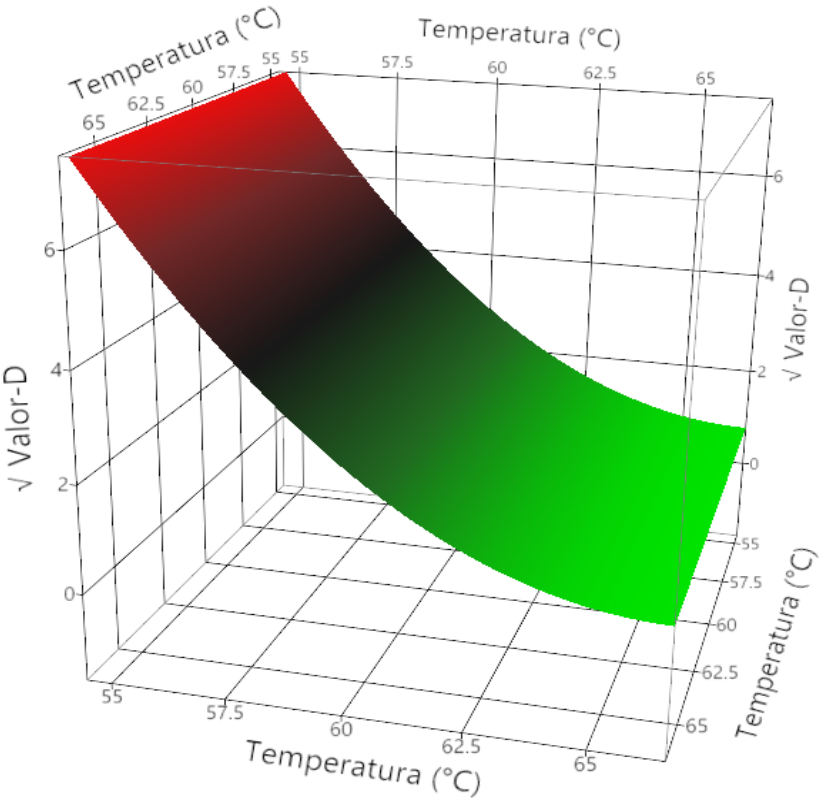

Figura 4. Gráfico 3D de superficie de respuesta del efecto de la temperatura en la raíz cuadrada de los valores-*D* para *L. monocytogenes* en carne molida de res en salsa chipotle en los valores centrales de nisina (75 UI) y sal (1%).

La sal, de igual manera presentó un efecto lineal y cuadrático significativo ($p<0.05$) respecto a los valores-*D* (Cuadro 7), los cuales se pueden observar través de la Figura 5. Se puede apreciar como al aumentar la sal de 0 a aproximadamente 1.5% se incrementa linealmente la resistencia térmica de *L. monocytogenes*. Mientras que a concentraciones superiores a 1.5% se empieza a observar el efecto cuadrático de este compuesto, por medio del inicio de una curvatura en el gráfico. Cabe destacar que en el gráfico se aprecia que a valores por encima del 2% la sal pasa de tener un efecto protector a un efecto antibacteriano. Esto coincide con lo reportado en la literatura donde se ha establecido que se necesitan concentraciones altas de sal para que está ejerza un efecto antibacteriano (Wijnker et al., 2006).

De acuerdo con la herramienta del perfil de predicción del software, la incorporación de solamente 1% de sal en el modelo cárnico a 60 °C incrementa el valor-*D* en un 137.05% respecto al control

(de 4.48 a 10.62 min). Asimismo, a la misma temperatura, un incremento al 1.5% de sal, aumenta el valor-*D* estimado 150.70% (11.23 min) con referencia al control. Este comportamiento respecto al incremento de los valores-*D* al subir los niveles de sal se observaron en todo el rango de las temperaturas estudiadas (graficas no mostradas). Los valores-*D* estimados a 55, 57, 63 y 65 ºC se incrementan en un 47.99, 69.81, 287.77 y 381.8% con respecto al control con la adición del 1% de sal de acuerdo con el perfil de predicción del software. Esto deja evidente el efecto protector que ejércelo niveles bajos de sal contra el efecto letal del calor en *L. monocytogenes* en carne de res en salsa chipotle.

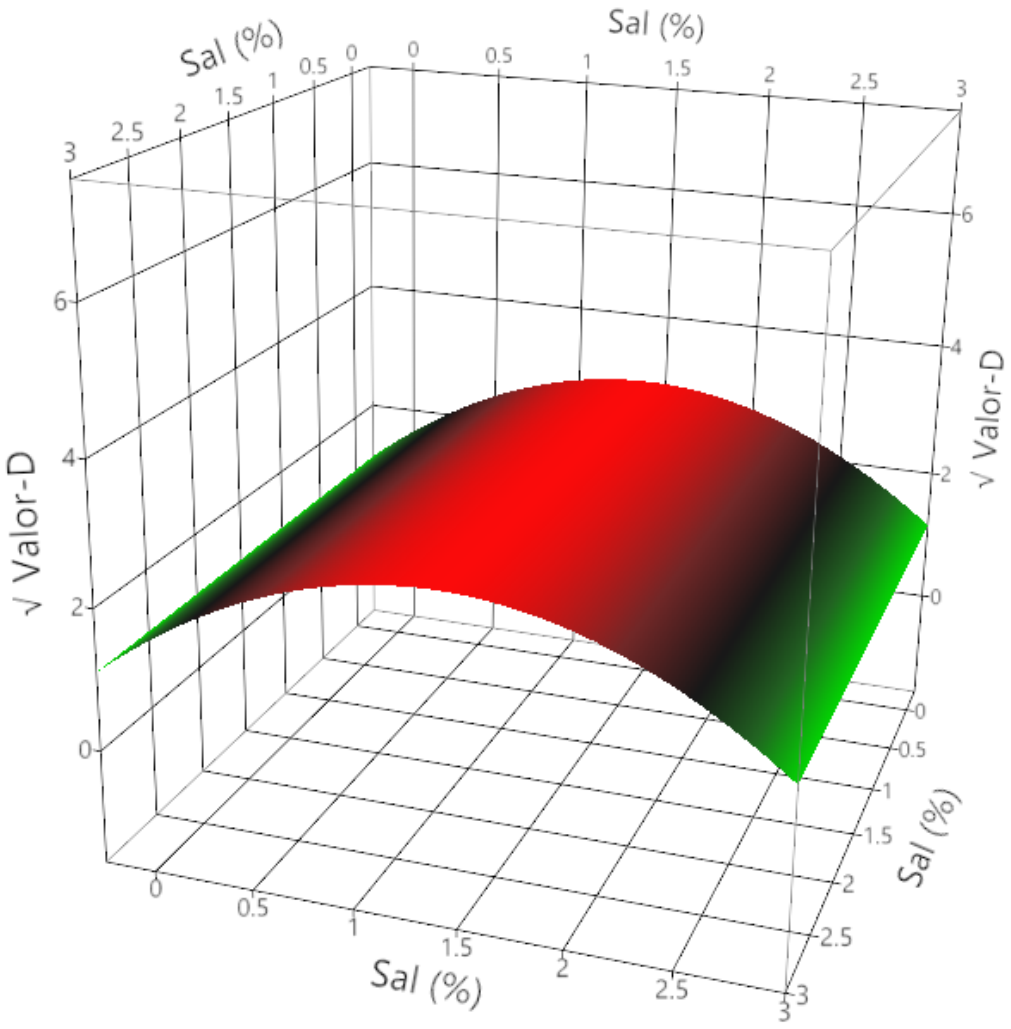

Figura 5. Gráfico 3D de superficie de respuesta del efecto de la sal en la raíz cuadrada de los valores-*D* para *L. monocytogenes* en carne molida de res en salsa chipotle en los valores centrales (60 °C y 75 UI) de temperatura y nisina.

Este efecto protector también ha sido reportado en estudios previos en distintas matrices, como pavo (Juneja, et al., 2014) y puerco (Lihono et al., 2003). Una de las explicaciones a las que se le puede adjudicar el efecto protector es, que la adición de solutos como la sal reduce la actividad de agua en el alimento y al reducir esta actividad de agua se presenta una falta de penetración del calor a través del medio en proceso de cocción, lo que protege al patógeno del efecto letal del calor. Esto concuerda con los datos obtenidos, ya que a niveles altos de sal se obtuvieron valores-*D* mayores (Cuadro 6).

Por otra parte, la variación en el nivel de adición de nisina en el presente estudio, también presentó un efecto significativo ($p<0.05$) en la inactivación térmica de la bacteria (Cuadro 7), disminuyendo los valores-*D* (Cuadro 6). El signo negativo del coeficiente de regresión de este factor, ratifica el efecto que tuvo el incrementar los niveles de nisina en la disminución de los valores-*D*, lo que se puede atribuir a su capacidad antibacteriana. Se ha demostrado que la nisina actúa a nivel pared celular ya que tiene la habilidad de unirse específicamente al receptor del lípido II, con lo que previene que los monómeros de peptidoglicano se unan y formen la pared celular, lo que causa la lisis. Otro mecanismo antimicrobiano que puede presentar la nisina, es mediante inserción en la membrana celular, con lo que origina poros que causan un incremento en la permeabilidad, lo que conlleva a una falla en el potencial de membrana y salida de contenido intracelular como aminoácidos, nucleótidos e iones. Por consecuencia, la célula dañada no puede producir la suficiente energía, ni macromoléculas, lo que conduce a una muerte celular (Punyauppa-path et al., 2015).

En la literatura científica que se consultó no fue posible encontrar algún reporte previo del efecto de nisina en la inactivación térmica de *L. monocytogenes*. No obstante, existen diversos estudios que confirman su habilidad para inhibir el crecimiento de este patógeno en diversas matrices cárnicas, dentro de las cuales se incluye la carne molida de res (Solomakos et al. 2008; Abdollahzadeh et al., 2014; Murray & Richard, 1997; Zimet et al., 2018). De tal manera que los resultados obtenidos coinciden con los reportados en la literatura, los cuales afirman que la nisina es capaz de afectar significativamente a *L. monocytogenes*.

6.4 Interacción Temperatura-Nisina

El efecto de interacción entre la temperatura y la nisina, sobre los valores-*D* ajustados para *L. monocytogenes* en carne de res en salsa chipotle se puede observar en el gráfico de superficie de respuesta en 3D en la Figura 6. El efecto de la nisina sobre los valores-*D* fue dependiente de la temperatura de inactivación ($p<0.05$). A temperaturas bajas la nisina disminuye los valores-*D*, pero lo hace de una manera muy leve, casi nula de apreciar. Sin embargo, a temperaturas altas el valor-*D* de igual manera disminuye, pero esta vez lo hace con mayor intensidad. Esto se puede deber al efecto sinérgico entre el mecanismo de acción del calor y la nisina, previamente descritos, sobre la membrana de la bacteria. Efecto que incrementa conforme aumenta la temperatura y la concentración de nisina.

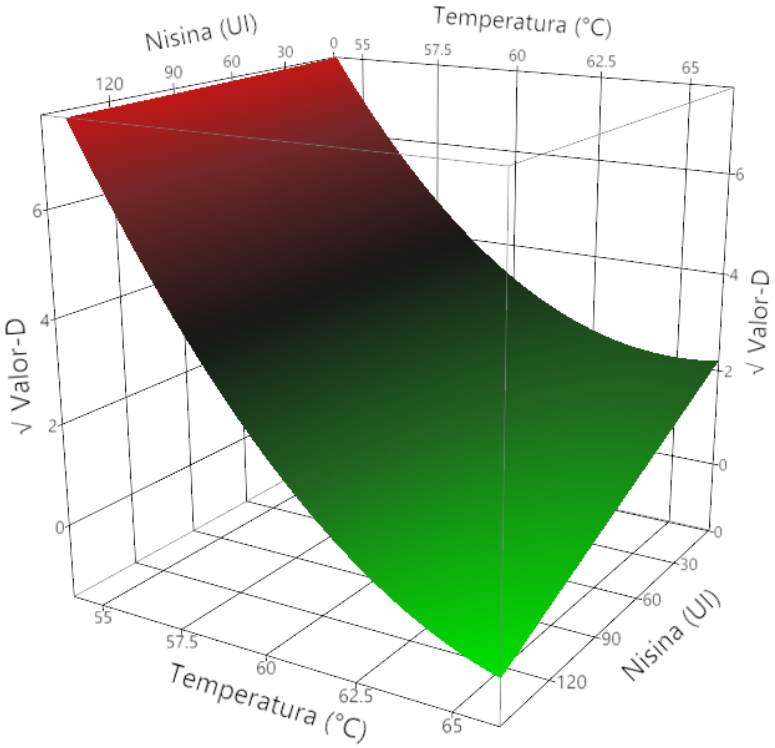

Figura 6. Gráfico 3D de superficie de respuesta del efecto de interacción entre la temperatura y nisina en el punto central de sal (1%) sobre la raíz cuadrada de los valores-*D* para *L. monocytogenes* en carne molida de res en salsa chipotle.

No se encontraron reportes similares en cuanto al efecto de la nisina durante la inactivación térmica de *L. monocytogenes* por lo que el efecto interactivo de estos factores sobre los valores-*D* solo pudo ser contrastado con los efectos de otros antimicrobianos en la inactivación del patógeno en carne molida y productos cárnicos res. Juneja et al. (2013), evaluaron polifenoles de manzana en carne molida de res y obtuvieron un decremento en los valores-*D* ajustados de 4.72 a 2.88 min con la adición de 1% de polifenoles a 60 ºC. Al incrementar su concentración de polifenoles a 2% a la misma temperatura, los valores-*D* disminuyeron en un 53.6% respecto al control (de 4.72 a 2.19 min). Valenzuela-Melendres et al. (2016), usaron extracto de semilla de toronja en carne de res con chile rojo, con lo que obtuvieron una disminución en el tiempo de inactivación térmica de 11.4% a 60 ºC (de 3.51 a 3.11 min), al añadir 800 ppm. En comparación con los resultados del presente estudio, a la temperatura de 60 ºC, se obtuvo una reducción del 21.2, 42.6, 60.5 y 70.7 % con la adición de 30, 75, 120 y 150 UI de nisina, respectivamente (de 4.47 a 3.71, 2.70, 1.86 y 1.38 min). Se puede apreciar que a partir de las 120 UI de nisina, la reducción en los valores-D es mayor a lo reportado por los otros compuestos naturales.

6.5 Condiciones Optimas

Una de las ventajas del uso de la metodología de superficie de respuesta es que, a partir del modelo es posible optimizar la respuesta mediante la función de maximizar deseabilidad, que en este caso fue obtener un valor-*D* mínimo. Al aplicar la función de maximizar deseabilidad, fue posible encontrar que las condiciones óptimas de los factores incluidos en el modelo de predicción fueron la combinación de 63 ºC para la temperatura, 120 UI de nisina y 0.4% de sal para obtener el mínimo valor-*D* de 0.2735 min (Figura 7). Este valor fue validado por medio de una prueba *t* de student en donde se comparó con resultados experimentales y se encontró que no existieron diferencias entre el valor del modelo predictivo y los experimentales.

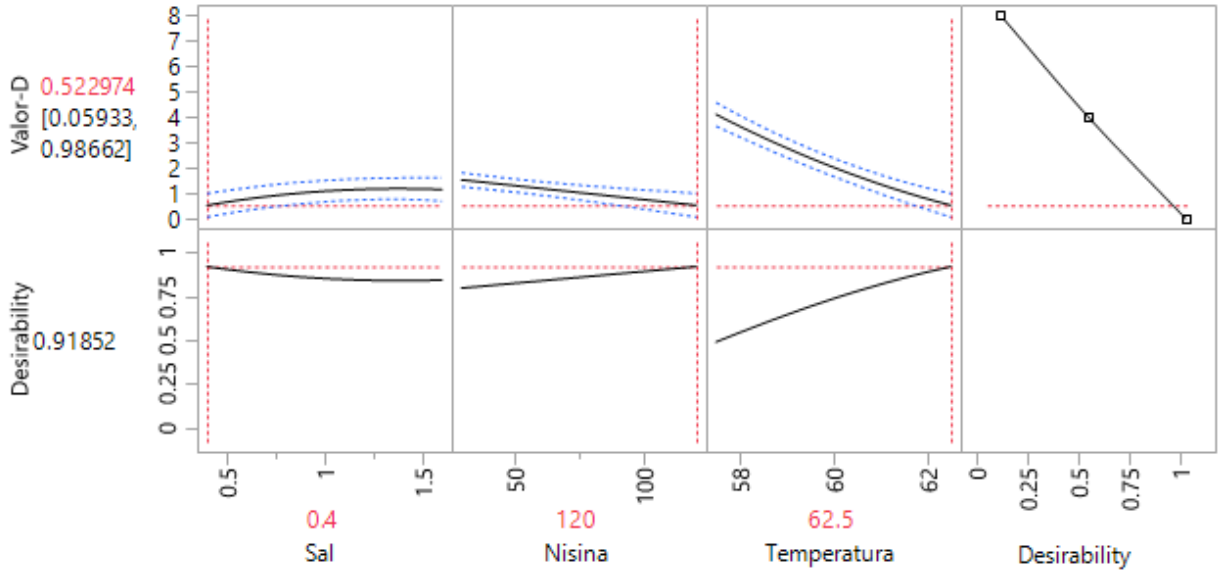

Figura 7. Perfil predictivo con las condiciones óptimas de temperatura, nisina y sal para la inactivación de *L. monocytogenes* en carne molida de res en salsa chipotle.

Otra de las estrategias de optimización que esta metodología permite realizar es por medio del perfilador de contorno en donde se pueden manipular los datos dentro de los rangos establecidos para obtener la mínima variable respuesta. Con esta función se pueden obtener los valores de distintas combinaciones de nisina, sal o temperatura dentro del rango estudiado para obtener un valor especifico de la variable respuesta. Esta función puede ser de gran utilidad para la industria en caso de que las sustancias con las que se trabaje sean de un valor comercial alto. También si la industria busca atender las demandas de productos cárnicos bajos en sal, se puede fijar un nivel de sal, preferentemente bajo y poder así determinar qué nivel de nisina se debería utilizar para lograr el menor valor-*D*.

6.6 Efecto de la Nisina y la Sal en los Valores-*z*

El impacto de diferentes concentraciones de nisina y sal en la resistencia térmica (valor-*z*) de *L. monocytogenes* en carne molida de res en salsa chipotle se muestra en la Figura 8. Se puede observar un decremento en el valor-*z* al aumentar los niveles de nisina, excepto cuando no hay sal

en el modelo cárnico. Además, se observa que entre mayor es la concentración de sal, el efecto de la nisina en la disminución de los valores-*z* es más marcado. Los valores-*z* disminuyeron de 10.20 a 3.68 °C al utilizar nisina de 0 a 150 UI, respectivamente, con un 1.6% de NaCl. Asimismo, si el objetivo son productos bajos en sal, a la concentración de 0.4% de sal el valor-*z* disminuyó de 8.42 a 2.46 °C con 0 y 120 UI, respectivamente.

Por otra parte, a concentraciones bajas de nisina (0-75 UI) se apreció un incremento en los valores-*z* conforme la concentración de sal se aumentó de 0 a 1.6%. Lo mismo ocurre con 120 UI de nisina, excepto a la concentración de 0.4 % de sal, el cual corresponde con los valores óptimos del modelo de predicción. Por último, con 150 UI de nisina los valores-*z* disminuyen de 5.07 a 2.59 °C de 0 a 2 % de sal, respectivamente

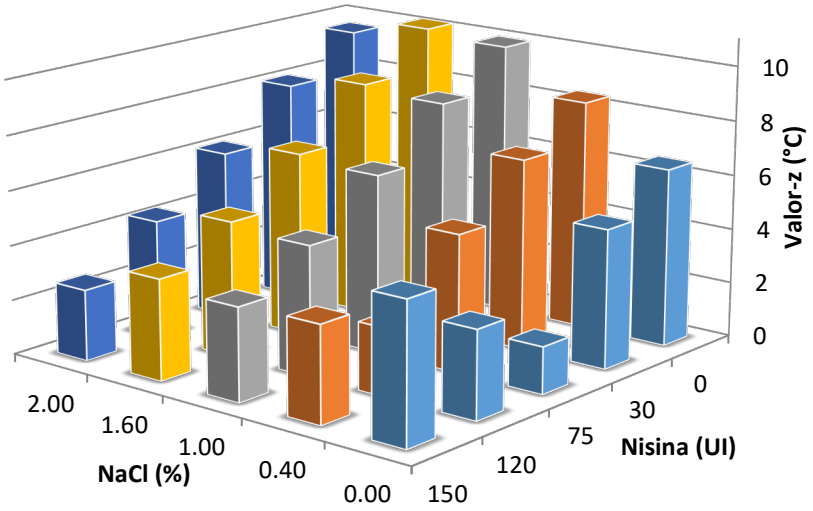

Figura 8. Valores-*z* (logaritmo del valor-*D*) de *L. monocytogenes* calculados a partir del valor estimado de los valores-*D* en carne molida de res en salsa chipotle con nisina (0-150 UI) y sal (0-2%).

Tanto el cálculo apropiado de los valores-*D* y *z* son fundamentales para mantener la inocuidad alimentaria durante el proceso térmico frente a patógenos de interés en los productos cárnicos. Estos resultados sugieren que se necesitan cambios menores en la temperatura para obtener el 90%

de la reducción en los valores-*D* de *L. monocytogenes* evaluada en carne de res con salsa chipotle adicionada con nisina y sal.

7. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que la temperatura y la nisina exhiben un efecto antimicrobiano ($p<0.05$) durante la pasteurización sous-vide reduciendo la resistencia térmica de *L. monocytogenes* en carne de res en salsa chipotle. De manera contraria, la sal presentó un efecto protector hacia el patógeno, aproximadamente hasta la concentración del 1.5%.

Se generó un modelo de predicción estableciéndose condiciones óptimas de temperatura (63 ºC), concentración de nisina (120 UI) y sal (0.4 %) para la inactivación térmica de *Listeria monocytogenes* en carne de res en salsa chipotle.

El modelo predictivo desarrollado en este estudio puede ser utilizado para diseñar un tratamiento térmico adecuado y al mismo tiempo asegurar la inactivación de *L. monocytogenes* en carne de res en salsa chipotle por medio de la adición de nisina y con concentraciones de sal idóneas dentro de los rangos estudiados.

8. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios de validación del modelo obtenido y contrastarlos con la información generada, para corroborar la predicción de los valores-*D* de *L. monocytogenes* en carne molida de res marinada en salsa chipotle.

Estudios futuros, que complementen los resultados generados en el presente estudio, deben enfocarse a la vida de anaquel bajo condiciones óptimas de almacenamiento (temperatura), distribución y punto de venta, así como también en temperaturas de abuso.

Así mismo, se recomienda realizar una evaluación sensorial en la carne molida de res en salsa chipotle con la finalidad de determinar su aceptación por parte del consumidor.

REFERENCIAS

Adams, M. R., Moss, M. O., McClure, P. J., & Royal Society of Chemistry (Great Britain). 2015. *Food microbiology*.

Alfonso, H. L. L. B., & Suarez. 2015. Staphylococcus aureus en productos cárnicos. *Rev. Costarric. Salud Pública*. *25*(2):113–121.

Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl. Microbiol. Biotechnol. 100*(7):2939–2951.

AMI. 2009. *Salt Use in Meat and Poultry Products FACT SHEET Overview*. Retrieved from http://www.meatami.com

Ammer, M. R., Zaman, S., Khalid, M., Bilal, M., Erum, S., Huang, D., & Che, S. 2016. Optimization of antibacterial activity of *Eucalyptus tereticornis* leaf extracts against *Escherichia coli* through response surface methodology. *J. Radiat. Res. Appl. Sci. 9*(4):376–385.

Balamurugan, S., Ahmed, R., Chibeu, A., Gao, A., Koutchma, T., & Strange, P. 2016. Effect of salt types and concentrations on the high-pressure inactivation of Listeria monocytogenes in ground chicken. *Int. J. Food Microbiol. 218*:51–56.

Baldwin, D. E. 2012. Sous vide cooking: A review. *Int. J. Gastron. Food Sci. 1*(1):15–30.

Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. *76*(5):965–977.

CDC. (n.d.). Listeria Outbreaks | Listeria | CDC.

CDC. 2016. People at Risk | Listeria | CDC.

CHEN, N., & SHELEF, L. A. 1992. Relationship Between Water Activity, Salts of Lactic Acid, and Growth of Listeria monocytogenes in a Meat Model System. *J. Food Prot. 55*(8):574–578.

Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. T. 2018. ScienceDirect Functions and emerging applications of bacteriocins. *Curr. Opin. Biotechnol. 49*:23–28.

Ciampi, L. 2009. Listeria monocytogenes UN PELIGRO LATENTE PARA LA. *37*(1):1–8.

Cutter, C. N., & Siragusa, G. R. 1996. Reductions of Listeria innocua and Brochothrix thermosphacta on beef following nisin spray treatments and vacuum packaging. 23–33.

Davis, C. G. 2014. *SNAP and Diet Quality View project Southeast Asia's Import Demand for Skim Milk Powder View project Biing-Hwan Lin United States Department of Agriculture*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/43627842

de Noordhout, C. M., Devleesschauwer, B., Angulo, F. J., Verbeke, G., Haagsma, J., Kirk, M., … Speybroeck, N. 2014. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis. 14*(11):1073–1082.

Dean, A., Voss, D., & Draguljić, D. 2017. Response Surface Methodology (pp. 565–614). Springer, Cham.

Desmond, E. 2006. Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Sci. 74*(1):188–196.

Dominguez-Hernandez, E., Salaseviciene, A., & Ertbjerg, P. 2018. Low-temperature long-time cooking of meat: Eating quality and underlying mechanisms. *Meat Sci. 143*:104–113.

Economou, T., Pournis, N., Ntzimani, A., & Savvaidis, I. N. 2009. Nisin – EDTA treatments and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. *Food Chem. 114*(4):1470–1476.

FDA. 2019a. Recalls, Market Withdrawals, & Safety Alerts | FDA.

FDA. 2019b. Use the Nutrition Facts Label to Reduce Your Intake of Sodium in Your Diet | FDA.

Field, D., Ross, R. P., & Hill, C. 2018. Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. *Curr. Opin. Food Sci. 20*:1–6.

FIRA. 2017. *Panorama Agroalimentario | Carne de bovino 2017 Contenido 1*. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200639/Panorama_Agroalimentario_Carne_de_bovino_2017__1_.pdf

Fougy, L., Desmonts, M.-H., Coeuret, G., Fassel, C., Hamon, E., Hézard, B., … Chaillou, S. 2016. Reducing Salt in Raw Pork Sausages Increases Spoilage and Correlates with Reduced Bacterial Diversity. *Appl. Environ. Microbiol. 82*(13):3928–3939.

FSIS/USDA. 2003. *Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service 9 CFR Part 430 Control of Listeria monocytogenes in Ready-to-Eat Meat and Poultry Products; Final Rule*. Retrieved from https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2003-06-06/pdf/03-14173.pdf

FSIS. 2013. Carne Molida de Res e Inocuidad de Alimentos.

Gandhi, M., & Chikindas, M. L. 2007. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol. 113*(1):1–15.

Ghabraie, M., Vu, K. D., Huq, T., Khan, A., & Lacroix, M. 2016. Antilisterial effects of antibacterial formulations containing essential oils, nisin, nitrite and organic acid salts in a sausage model. *J. Food Sci. Technol. 53*(6):2625–2633.

Gil, M. M., Miller, F. A., Brandão, T. R. S., & Silva, C. L. M. 2017. Mathematical Models for Prediction of Temperature Effects on Kinetic Parameters of Microorganisms' Inactivation: Tools for Model Comparison and Adequacy in Data Fitting. *Food Bioprocess Technol. 10*(12):2208–2225.

Gill, A. O., & Holley, R. A. 2000. Surface Application of Lysozyme, Nisin, and EDTA to Inhibit Spoilage and Pathogenic Bacteria on Ham and Bologna. *J. Food Prot. 63*(10):1338–1346.

Hill, C., Cotter, P. D., Sleator, R. D., & Gahan, C. G. . 2002. Bacterial stress response in Listeria monocytogenes: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *Int. Dairy J. 12*(2–3):273–283.

However, C., Modi, K. D., Chikindas, M. L., & Montville, T. J. 2000. Sensitivity of nisin-resistant Listeria monocytogenes to heat and the synergistic action of heat and nisin. 249–253.

Huang, H.-W., Wu, S.-J., Lu, J.-K., Shyu, Y.-T., & Wang, C.-Y. 2017. Current status and future

trends of high-pressure processing in food industry. *Food Control*. *72*:1–8.

Jaenke, R., Barzi, F., McMahon, E., Webster, J., & Brimblecombe, J. 2017. Consumer acceptance of reformulated food products: A systematic review and meta-analysis of salt-reduced foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 57*(16):3357–3372.

Jeong, K., O, H., Shin, S. Y., & Kim, Y.-S. 2018. Effects of sous-vide method at different temperatures, times and vacuum degrees on the quality, structural, and microbiological properties of pork ham. *Meat Sci. 143*:1–7.

Jones, E., Salin, V., & Williams, G. W. 2005. *NISIN AND THE MARKET FOR COMMERICIAL BACTERIOCINS*. Retrieved from https://tind-customer-agecon.s3.amazonaws.com/79a997ee-44ab-4e18-8176-75b85fcd5924?response-content-disposition=inline%3B filename%2A%3DUTF-8%27%27CP%252001%252005%2520Nisin%2520Report.pdf&response-content-type=application%2Fpdf&AWSAccessKeyId=AKIAXL7W7Q3

Juneja, V. K., Altuntaş, E. G., Ayhan, K., Hwang, C.-A., Sheen, S., & Friedman, M. 2013. Predictive model for the reduction of heat resistance of Listeria monocytogenes in ground beef by the combined effect of sodium chloride and apple polyphenols. *Int. J. Food Microbiol. 164*(1):54–59.

Juneja, V. K., Garcia-Davila, J., Lopez-Rromero, J. C., Peña-Ramos, E. A., Camou, J. P., & Valenzuela-Melendres, M. 2014. Modeling the Effects of Temperature, Sodium Chloride, and Green Tea and Their Interactions on the Thermal Inactivation of Listeria monocytogenes in Turkey. *J. Food Prot. 77*(10):1696–1702.

Karyotis, D., Skandamis, P. N., & Juneja, V. K. 2017. Thermal inactivation of Listeria monocytogenes and Salmonella spp. in sous-vide processed marinated chicken breast. *Food Res. Int. 100*(July):894–898.

Lee, J. H., Hwang, J., & Mustapha, A. 2014. Popular Ethnic Foods in the United States : A Historical and Safety Perspective. *13*:2–17.

Li, R., Kou, X., Zhang, L., & Wang, S. 2018. Inactivation kinetics of food-borne pathogens subjected to thermal treatments: a review. *Int. J. Hyperth. 34*(2):177–188.

López-Romero, J. C., Valenzuela-Melendres, M., Juneja, V. K., García-Dávila, J., Camou, J. P., Peña-Ramos, A., & González-Ríos, H. 2018. Effects and interactions of gallic acid, eugenol and temperature on thermal inactivation of Salmonella spp. in ground chicken. *Food Res. Int. 103*(October 2017):289–294.

Maks, N., Zhu, L., Juneja, V. K., & Ravishankar, S. 2010. Sodium lactate, sodium diacetate and pediocin: Effects and interactions on the thermal inactivation of Listeria monocytogenes on bologna. *Food Microbiol. 27*(1):64–69.

Mangalassary, S., Han, I., Rieck, J., Acton, J., & Dawson, P. 2008. Effect of combining nisin and/or lysozyme with in-package pasteurization for control of Listeria monocytogenes in ready-to-eat turkey bologna during refrigerated storage. *Food Microbiol. 25*(7):866–870.

Mangalassary, S., Han, I., Rieck, J., Acton, J., Jiang, X., Sheldon, B., & Dawson, P. 2007. Effect of Combining Nisin and/or Lysozyme with In-Package Pasteurization on Thermal Inactivation of Listeria monocytogenes in Ready-to-Eat Turkey Bologna. *J. Food Prot.*

70(11):2503–2511.

Martinez, J., & Mauriz, I. 2013. DESAFÍOS DE LA HIGIENE, SEGURIDAD INSPECCIÓN Y ALIMENTARIAS TERCER PARA EL MILENIO.

Martinez, M. 2017. Albóndigas con Chipotle │Sigue esta sencilla receta - Tutorial e Imágenes.

McKellar, R. C., & Lu, X. 2004. *Modeling microbial responses in foods*. CRC Press.

Modi, K. D., Chikindas, M. L., & Montville, T. J. 2000. Sensitivity of nisin-resistant Listeria monocytogenes to heat and the synergistic action of heat and nisin. *Lett. Appl. Microbiol. 30*(3):249–253.

Monroy, C., & Jos, F. 2009. Revisi ´ on bibliogr ´ afica : Bacteriocinas producidas por bacterias probi ´ oticas. 63–72.

Monroy, C., & Jos, F. 2014. Revisi ´ on bibliogr ´ afica : Bacteriocinas producidas por bacterias probi ´ oticas. (November 2009).

Murphy, R. Y., Beard, B. L., Martin, E. M., Duncan, L. K., & Marcy, J. A. 2004. Comparative Study of Thermal Inactivation of Escherichia coli O157 : H7 , Salmonella , and Listeria monocytogenes in Ground Pork. *Food Microbiol.*

Murphy, R. Y., Beard, B. L., Martin, E. M., Keener, A. E., & Osaili, T. 2004. ARTICLE IN PRESS Predicting process lethality of Escherichia coli O157 : H7 , Salmonella , and Listeria monocytogenes in ground , formulated , and formed beef / turkey links cooked in an air impingement oven. *21*:493–499.

Murphy, R. Y., Martin, E. M., Duncan, L. K., & Beard, B. L. 2004. Thermal Process Validation for Escherichia coli O157 : H7 , Salmonella , and Listeria monocytogenes in Ground Turkey and Beef Products. *67*(7):1394–1402.

Murphy, R. Y., Martin, E. M., Duncan, L. K., Beard, B. L., & Marcy, J. A. 2004. *Thermal Process Validation for Escherichia coli O157:H7, Salmonella, and Listeria monocytogenes in Ground Turkey and Beef Products*. *Journal of Food Protection* (Vol. 67). Retrieved from https://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-67.7.1394

Nazir, F., Rehana Salim, I., Nargis Yousf, I., Bashir, M., Naik, I. H., Syed Zameer Hussain, I., … Zameer Hussain, S. 2017. Natural antimicrobials for food preservation. *~ 2078 ~ J. Pharmacogn. Phytochem. 6*(6):2078–2082.

NOM-210-SSA1-2014. 2014. *NORMA Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos*. Retrieved from http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015

O'Bryan, C. A., Crandall, P. G., Martin, E. M., Griffis, C. L., & Johnson, M. G. 2006. Heat Resistance of Salmonella spp., Listeria monocytogenes, Escherichia coli 0157:H7, and Listeria innocua M1, a Potential Surrogate for Listeria monocytogenes, in Meat and Poultry: A Review. *J. Food Sci. 71*(3):R23–R30.

Osaili, T., Griffis, C. L., Martin, E. M., Beard, B. L., & Keener, A. 2006. Thermal Inactivation Studies of Escherichia coli O157 : H7 , Salmonella , and Listeria monocytogenes in Ready-to-Eat Chicken-Fried Beef Patties. *69*(5):1080–1086.

Pandiselvam, R., Subhashini, S., Banuu Priya, E. P., Kothakota, A., Ramesh, S. V., & Shahir, S. 2019. Ozone based food preservation: a promising green technology for enhanced food safety. *Ozone Sci. Eng. 41*(1):17–34.

Pedrós-Garrido, S., Condón-Abanto, S., Clemente, I., Beltrán, J. A., Lyng, J. G., Bolton, D., … Whyte, P. 2018. Efficacy of ultraviolet light (UV-C) and pulsed light (PL) for the microbiological decontamination of raw salmon (Salmo salar) and food contact surface materials. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 50*:124–131.

Pereira, R. N., & Vicente, A. A. 2010. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Res. Int. 43*(7):1936–1943.

Perez, R. H., Teresa Perez, M. M., & Elegado, F. B. 2015. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: A Review of Biosynthesis, Mode of Action, Fermentative Production, Uses, and Prospects. *Int. J. Philipp. Sci. Technol. 08*(2):6–1.

Pilcher, J. 2008. The Globalization of Mexican Cuisine. *Hist. Compass*. *6*(2):529–551.

Ramu, R., Shirahatti, P. S., Devi, A. T., Prasad, A., Kumuda, J., Lochana, M. S., … Prasad, N. 2015. Bacteriocins and Their Applications in Food Preservation. *8398*(February 2016).

Reglamento Tecnico Centroamericano (RTCA). 2005. *Alimentos y Bebidas Procesadas. Aditivos Alimentarios*. Retrieved from http://www.puntofocal.gov.ar/notific_otros_miembros/gtm67_t.pdf

Restrepo, D. A., Arango, C. M., Amézquita, A., & Restrepo, A. 2001. *Industria de Carnes*. *Industria de carnes*.

Rodrigues, C. S., Sá, C. V. G. C. de, & Melo, C. B. de. 2017. An overview of Listeria monocytogenes contamination in ready to eat meat, dairy and fishery foods. *Ciência Rural*. *47*(2).

Roldán, M., Antequera, T., Martín, A., Mayoral, A. I., & Ruiz, J. 2013. Effect of different temperature–time combinations on physicochemical, microbiological, textural and structural features of sous-vide cooked lamb loins. *Meat Sci. 93*(3):572–578.

Rouger, A., Tresse, O., Zagorec, M., Rouger, A., Tresse, O., & Zagorec, M. 2017. Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. *Microorganisms*. *5*(3):50.

Rubio, S., Diego, L., Rub, V., Enrique, M., & Su, D. 2013. *y Calidad de carne Bovina*.

Ruusunen, M., & Puolanne, E. 2005. Reducing sodium intake from meat products. *Meat Sci. 70*(3):531–541.

Ryniecki, A., Jayas, D. S., & Jayas, D. S. 2018. Process Control for Thermal Processing. In *Computerized Control Systems in the Food Industry* (pp. 277–294). Routledge.

Saludes, M., Troncoso, M., & Figueroa, G. 2015. Presence of Listeria monocytogenes in Chilean food matrices. *Food Control*. *50*:331–335.

Sánchez del Pulgar, J., Gázquez, A., & Ruiz-Carrascal, J. 2012. Physico-chemical, textural and structural characteristics of sous-vide cooked pork cheeks as affected by vacuum, cooking temperature, and cooking time. *Meat Sci. 90*(3):828–835.

Sangcharoen, N., Klaypradit, W., & Wilaipun, P. 2017. Antimicrobial activity optimization of nisin, ascorbic acid and ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA) against

Salmonella Enteritidis ATCC 13076 using response surface methodology. *Agric. Nat. Resour. 51*(5):355–364.

Siguemoto, É. S., Gut, J. A. W., Martinez, A., & Rodrigo, D. 2018. Inactivation kinetics of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes in apple juice by microwave and conventional thermal processing. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 45*:84–91.

Singh, C. B., Kumari, N., Senapati, S. R., Lekshmi, M., Nagalakshmi, K., Balange, A. K., … Xavier, K. A. M. 2016. Sous vide processed ready-to-cook seerfish steaks: Process optimization by response surface methodology and its quality evaluation. *LWT*. *74*:62–69.

Singh, V. P. 2018. Recent approaches in food bio-preservation - a review. *8*:104–111.

Smelt, J. P. P. M., & Brul, S. 2014. Thermal Inactivation of Microorganisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 54*(10):1371–1385.

Soldatenko, M. 2015. Tacos and Coloniality: A Review Essay. *Diálogo*. *18*(1):135–142.

Stringer, S. C., & Metris, A. 2017. Predicting bacterial behaviour in sous vide food. *Int. J. Gastron. Food Sci.*

Taormina, P. J. 2010. Implications of Salt and Sodium Reduction on Microbial Food Safety. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 50*(3):209–227.

Valenzuela-Melendres, M., Peña-Ramos, E. A., Juneja, V. K., Camou, J. P., & Cumplido-Barbeitia, G. 2016. Effect of Grapefruit Seed Extract on Thermal Inactivation of Listeria monocytogenes during Sous-Vide Processing of Two Marinated Mexican Meat Entrées. *J. Food Prot. 79*(7):1174–1180.

Varela, Z. S., Lavalle, L. P., & Alvarado, D. E. 2016. Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos : una mirada en colombia Bacteria causing of foodborne diseases : an overview at colombia. *32*(1):105–122.

Wijnker, J. J., Koop, G., & Lipman, L. J. A. 2006. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. *Food Microbiol. 23*(7):657–662.

Yang, X., He, A., Badoni, M., Tran, F., & Wang, H. 2017. Mapping sources of contamination of Escherichia coli on beef in the fabrication facility of a commercial beef packing plant. *Food Control*. *75*:153–159.