

CUANTIFICACIÓN DE PATÓGENOS EN EMBUTIDO FERMENTADO CON CULTIVO INICIADOR

*Tatiana Beldarraín-Iznaga**, *Eva Sevillano*, *Sunelys García*, *Ramón-Santos* y *Magdalena Ramos*
Instituto de Investigación para la Industria Alimenticia. Carretera al Guatao km 3½, La Habana, C.P. 17 100,
Cuba.

E-mail: tatybeldarrain@gmail.com

Recibido: 17-12-2021 / Revisado: 22-12-2021 / Aceptado: 27-12-2021 / Publicado: 04-01-2022

RESUMEN

Para evaluar la capacidad del cultivo iniciador *Lactobacillus acidophilus* LA16 de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* spp. y *Staphylococcus aureus* en un embutido fermentado, se inocularon los patógenos en sistema cárnico modelo y en embutido tipo chorizo. Se cuantificó cada patógeno y se evaluaron cuatro modelos de inactivación para obtener el de mejor ajuste. Para validarlo, se prepararon diferentes variantes de chorizo con y sin cultivo iniciador. Los patógenos se inocularon a concentración inicial de 10^3 UFC/g y el cultivo iniciador a 10^4 UFC/g. La reducción de 2,5 log UFC/g observada en los patógenos ocurrió entre los tres y seis días para las variantes con *L. acidophilus* adicionado y entre los siete y ocho días para las variantes sin cultivo iniciador. Para el chorizo, este comportamiento fue descrito por el modelo bifásico que podría ser empleado para cuantificar *E. coli* y *S. aureus*.

Palabras clave: cultivo iniciador, patógenos, chorizo, modelos de inactivación no térmica.

ABSTRACT

Pathogens quantification in sausage with starter culture

To evaluate the ability of *Lactobacillus acidophilus* LA16 as starter to inhibit the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in a fermented sausage, the pathogens were inoculated in the model meat system and in chorizo. Each pathogen was quantified and four inactivation models were evaluated to obtain the best fit. To validate the model, different variants of chorizo were prepared with or without starter. Pathogens were inoculated at concentration of 10^3 UFC/g CFU/g and the starter culture at 10^4 UFC/g CFU/g. The reduction of 2.5 log CFU/g observed in the pathogens occurred between three and six days for the variants with *L. acidophilus* and between seven and eight days for the variants without starter. This behavior was described by the biphasic model and it could be used to quantify *Escherichia coli* and *S. aureus* in chorizo.

Keywords: starter, pathogens, fermented sausage chorizo type, modeling non- thermal inactivation.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) siguen siendo un grave problema de salud a pesar de las medidas de control adoptadas durante la producción de alimentos (1, 2). La mayoría de los brotes de ETA reportados en los últimos años fueron causados por agentes bacterianos como *Escherichia coli* (2). Por otro lado, los productos cárnicos ocupan un importante papel (3, 4). Aunque los embutidos fermentados poseen

***Tatiana Beldarraín-Iznaga:** *Licenciada en Microbiología (U.H., Cuba), Investigadora Auxiliar; Master en Ciencia y Tecnología de Alimentos (IFAL, 2006) y Doctora en Ingeniería de Alimentos (U.B.B., Chile). Sus principales líneas de trabajo se relacionan con la Microbiología de Alimentos, uso de biopolímeros para incrementar la estabilidad de probióticos en diferentes condiciones para su incorporación en matrices alimentarias. Posee experiencia en el área de tecnología de productos cárnicos.*

bajo riesgo sanitario debido a sus características físico-químicas (5), *E. coli* o *Staphylococcus aureus* pueden sobrevivir (6–9). Tanto los organismos internacionales como la legislación cubana, exigen ausencia de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp, *Escherichia coli* 0157:H7, así como recuentos de *Staphylococcus aureus* y de coliformes menores a 10^2 UFC/g (8-10). Las bacterias ácido-lácticas (BAL) constituyen uno de los grupos predominantes de la microbiota de embutidos fermentados (10, 13). Las BAL (como *Lactobacillus acidophilus*) son reconocidos generalmente como seguros (GRAS) por la FDA (14) y han demostrado su eficacia para inhibir el crecimiento de patógenos (13, 15–17) debido al antagonismo asociado con la producción de metabolitos antimicrobianos (18).

Se han desarrollado modelos matemáticos que estiman el crecimiento o la inactivación de microorganismos en función de factores ambientales (8, 9, 19). En el caso de los embutidos fermentados, los modelos han permitido cuantificar el efecto inhibitorio de la microbiota fermentativa sobre microorganismos patógenos (20). Sin embargo, estos modelos utilizan datos ya existentes en la literatura, estimando los parámetros de interés. En este sentido, se necesita más información cuantitativa que permita estimar *in situ* el comportamiento de la microbiota durante la fermentación. El objetivo del trabajo fue evaluar la capacidad del cultivo iniciador *Lactobacillus acidophilus* LA16 de inhibir el crecimiento de patógenos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en un sistema modelo y en chorizo crudo fermentado y cuantificarlo, en ambos sistemas, mediante modelos matemáticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

L. acidophilus LA16 se recibió del banco de cepas del IIIA mientras que *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 se recibieron del banco de cepas del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, La Habana). Se prepararon en caldo triptona soya (TSB) y se incubaron durante 48 h a 30 °C (21).

Con el fin de imitar la concentración de nutrientes y aditivos de un embutido fermentado, se preparó el caldo SB, rico en nutrientes y su pH se ajustó a 5 (15). Se prepararon 500 mL de SB que se esterilizaron por filtración (acetato de celulosa, 0,22 μ m) y se dispensaron en cinco frascos estériles con tapa plástica de rosca. Se tomaron 10 mL de cada microorganismo (concentración

de 10^4 UFC/mL) previamente crecido en caldo TSB que se inocularon en caldo SB para preparar cinco variantes con *E. coli*, *S. aureus*, *L. acidophilus*, *E. coli* + *L. acidophilus* y *S. aureus* + *L. acidophilus*. Se incubaron a 18 ± 2 °C durante 48 h. A diferentes tiempos (0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36 y 48 h) realizaron los conteos microbianos. Los datos del crecimiento para los tres microorganismos se ajustaron mediante la ecuación modificada de Gompertz (22) (Tabla 1). A partir de la estimación de los parámetros, realizadas por el modelo, se estimó la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) (h^{-1}), la duración de la fase de latencia (LPD) (h), el tiempo de generación (tg) (h), la tasa de crecimiento exponencial (TCE) y la Nmax (log UFC/mL) para cada microorganismo, empleando las ecuaciones (2, 3, 4, 5 y 6) ($e = 2,7182$). Para evaluar la inhibición de los patógenos en estudio por *L. acidophilus* se ajustaron los datos experimentales mediante el modelo logarítmico lineal, de Weibull, bifásico y el lineal con cola (Tabla 1).

Para evaluar el efecto inhibitorio del cultivo iniciador sobre el desarrollo de *E. coli* y *St. aureus* se elaboraron dos tipos de chorizo, uno con el cultivo iniciador *L. acidophilus* y otro sin cultivo iniciador para promover la fermentación espontánea de las BAL. Se utilizaron formulaciones desarrolladas en trabajos anteriores (21) y se prepararon los inóculos de *St. aureus*, de *E. coli* y de *L. acidophilus* que se mezclaron, asepticamente con la masa de chorizo. Se inocularon 10^3 UFC/g de los patógenos y 10^4 UFC/g del cultivo iniciador. Se prepararon seis variantes: chorizo con cultivo iniciador, chorizo con cultivo iniciador + *E. coli*, chorizo con cultivo iniciador + *S. aureus*, chorizo sin cultivo iniciador, chorizo sin cultivo iniciador + *E. coli* y chorizo sin cultivo iniciador + *S. aureus*. Cada masa se dejó macerar por 24 h, para volver a mezclar por 10 min. El proceso de fermentación se hizo durante 30 días ($T = 18 \pm 2$ °C; HR = 80 ± 5 %), en condiciones artesanales. Se evaluó la calidad microbiológica de cada chorizo (12) y se realizaron conteos de *Lactobacillus* sp (Agar MRS, 37 °C, 72 h) (9). Para estimar la inactivación de cada patógeno en el chorizo se eligió el modelo de mejor ajuste (Tabla 1).

Todos los datos experimentales se ajustaron para predecir el comportamiento de cada patógeno mediante regresión no lineal, utilizando el complemento GInaFiT v1.7 de Microsoft Excel 2016 (23). Se tomó 95 % de intervalo de confianza y los índices estadísticos usados para comparar los modelos de inactivación fueron la

Tabla 1. Ecuación modificada de Gompertz y modelos empleados para estimar los datos de crecimiento e inactivación de microorganismos

Modelos para estimar los parámetros de crecimiento	Ecuación	Modelos de inactivación	Ecuación
$N(t) = N_0 + C * (e^{-e^{B*(t-M)}})$	(1)	Logarítmico lineal	$Nt = N_0 x e^{-k_{max} x t}$ (7)
$\mu_{max} (h^{-1}) = \frac{(B x C)}{e}$	(2)	Weibull	$Nt = N_0 x 10^{-\left(\frac{t}{\delta}\right)^p}$ (8)
$LPD (h) = M - \frac{1}{B}$	(3)	Bifásico	$Nt = N_0 + \log_{10}\{(f x e^{k_{max} 1 x t})\} + [(1 - f) x e^{-k_{max} 2 x t}]$ (9)
$tg (h) = \frac{\log e}{N_0 x B}$	(4)	Lineal con cola	$Nt = [(N_0 - N_{res}) x e^{-k_{max} x t}] + N_{res}$ (10)
$TCE (h^{-1}) = \frac{N_0 x B}{e}$	(5)		
$N_{max} = N_0 + C$	(6)		

N(t) (log UFC/mL): log de los recuentos microbianos obtenidos para cualquier tiempo (t); No: recuento inicial (log UFC/mL); B: tasa relativa de crecimiento máximo (h⁻¹); M: tiempo al cual el rango de crecimiento es máximo (h), μ_{max} : tasa máxima de crecimiento (h⁻¹), LPD: duración de la fase de latencia (h), tg: tiempo de generación (h), TCE: tasa de crecimiento exponencial, Nmax: concentración máxima de crecimiento (log UFC/mL), e = 2,7182, kmax constante cinética (h⁻¹), δ es el tiempo en que disminuye una unidad logarítmica el crecimiento, p es un factor de forma, f es la fracción de la población inicial en la mayoría de la población, 1-f es la fracción de la población en la subpoblación, kmax₁ y kmax₂ (h) son las tasas de inactivación de la mayoría de la población y de la subpoblación, Nres es la población resistente (cola) (log UFC/g).

suma del error al cuadrado (SSE), raíz del error cuadrático medio (RMSE), R², el factor de sesgo (FS) y el factor de exactitud (FE).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores experimentales del recuento de cada microorganismo en SB medio a 30 °C, así como los recuentos ajustados por la ecuación de Gompertz, muestran que los tres microorganismos (*L. acidophilus*, *S. aureus* y *E. coli*) se adaptaron rápidamente a las condiciones de pH = 5 y 18 °C (Fig 1). Tanto *E. coli* como *S. aureus* comenzaron su fase exponencial después de 9 h de incubación mientras que *L. acidophilus* lo logró después de las 12 h. Además, las concentraciones máximas obtenidas a las 48 h para los tres microorganismos fueron de 10⁷ UFC/mL. La ecuación modificada de Gompertz ajustó el crecimiento para los tres con R² fue de 0,99 y error estándar entre 0,09 y 0,12 (Tabla 2). Los conteos iniciales de los microorganismos

(No) se estimaron en el orden de tres unidades log, mientras que la tasa relativa de crecimiento (B) fueron de 0,37 y 0,38 h⁻¹ para *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente, y más baja para *L. acidophilus* (0,33 h⁻¹), valor que está íntimamente relacionado con la velocidad de crecimiento. Por otra parte, la duración de la fase de latencia (M) se estimó entre 15 y 16 h para *E. coli* y *S. aureus* mientras que *L. acidophilus* se demora mucho más en adaptarse al medio (18 h).

La velocidad máxima de crecimiento en el sistema cárnico modelo muestra que, independientemente de la cepa, los tres alcanzaron 10⁷ UFC/g a las 48 h, lo cual fue estimado correctamente por el modelo. *L. acidophilus* es una cepa termófila y homofermentativa, usa la vía Emden–Meyerhoff para la obtención de energía y solo tiene como balance dos moléculas de ATP (24), por lo cual su crecimiento es lento en comparación con *E. coli* y *S. aureus*. Con relación al resto de los parámetros, se observa que tanto *E. coli* como *S.*

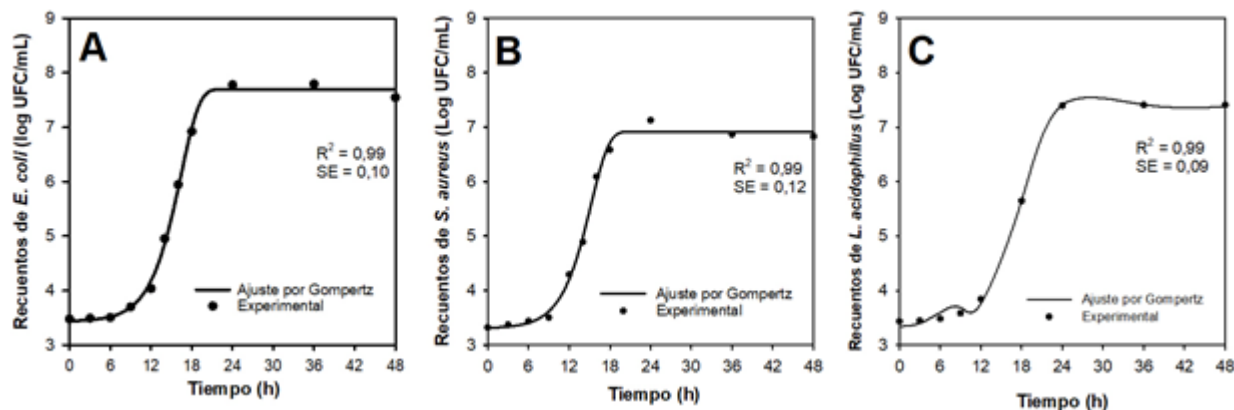


Fig. 1. Curva de crecimiento de *E. coli*, *S. aureus* y *L. acidophilus* en sistema cárnico modelo (30 °C, 48 h).

Tabla 2. Parámetros del ajuste realizada por el modelo de Gompertz para la curva de crecimiento de cada microorganismo

	No (log UFC/mL)	B (h ⁻¹)	C (log UFC/mL)	M (h)	μmax (h ⁻¹)	LDP (h)	tg (h)	TCE (h ⁻¹)	Nmax (log UFC/mL)	R ²	SE
<i>E. coli</i>	3,47	0,37	4,26	16,41	0,58	13,71	0,34	0,47	7,73	0,99	0,10
<i>S. aureus</i>	3,32	0,38	3,61	15,23	0,50	12,60	0,34	0,46	6,93	0,99	0,12
<i>L. acidophilus</i>	3,34	0,33	3,98	18,61	0,48	15,58	0,39	0,41	7,32	0,99	0,09

aureus poseen una alta μ_{max} (0,58 y 0,50 h⁻¹, respectivamente), lo que podría estar dado porque el medio es rico en nutrientes (15), así como a que han desarrollado estrategias para su crecimiento en ambientes adversos. Se ha observado que ambos microorganismos utilizan el mecanismo de *quorum sensing* en respuesta a las fluctuaciones ambientales. Ellas producen y liberan moléculas-señal llamadas autoinductores que conducen a una alteración en la expresión génica y, por supuesto, a su adaptación a diferentes condiciones como los bajos pH (25). Tanto la duración de la fase Lag (LDP) como el tiempo de duplicación (tg) son más bajas para *E. coli* y *S. aureus* (13 h y 0,34 h) que para *L. acidophilus* (15 h, 0,39 h). Esto podría deberse a que las especies de *Lactobacillus* usan la energía adicional obtenida de la fermentación directa de la glucosa para distintas funciones de crecimiento (15), de ahí su menor velocidad de duplicación. La tasa de crecimiento exponencial (TCE) es más alta para *E. coli* y *S. aureus* (0,47 y 0,46 h⁻¹, respectivamente) que para *L. acidophilus* (0,48 h⁻¹). Independientemente del tiempo,

todos los microorganismos estudiados alcanzan una población máxima (Nf) de 10⁷ UFC/g. A partir de este valor el crecimiento se ve limitado, posiblemente por el agotamiento de los nutrientes presentes en el sistema modelo.

Los datos experimentales de la cinética de inactivación de *E. coli* y *S. aureus*, promovidos por la acción de *L. acidophilus* en el sistema cárnico modelo muestran que ambos microorganismos inhibieron su crecimiento entre las 36 y las 48 h (Fig. 2). Se ha observado que las bacterias ácido lácticas pueden ejercer una acción inhibitoria frente a otros microorganismos como resultado de la competencia por los nutrientes y/o de la producción de compuestos antagonistas tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y enzimas (26). El efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos se encuentra en la reducción del pH y en la acción de las moléculas de ácido no disociadas. El ácido láctico es el ácido orgánico más importante de fermentación BAL y el grado de la disociación depende del pH. La naturaleza lipofílica del ácido no disociado permite que se

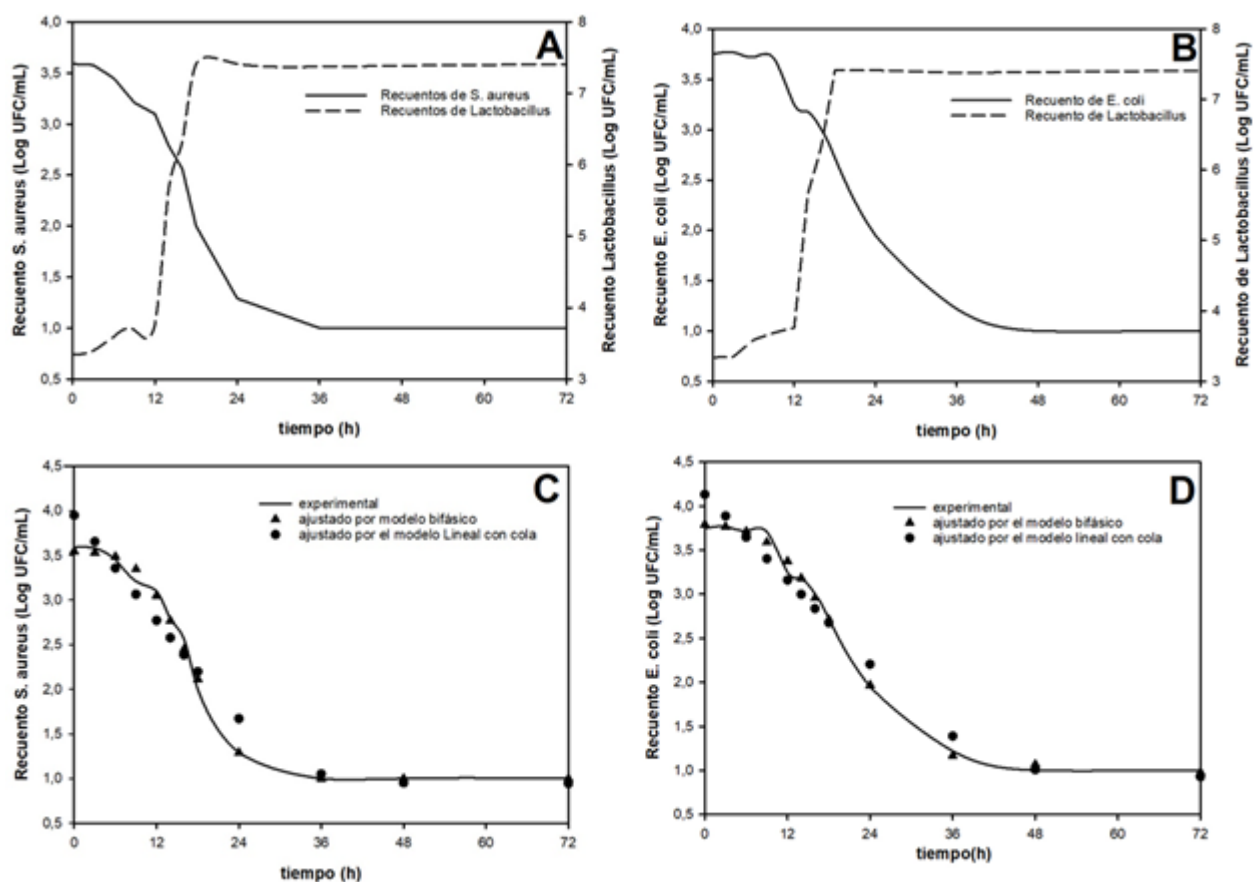


Fig. 2. Curva de inactivación de *E. coli* (A y C) y *S. aureus* (B y D) por *L. acidophilus* en sistema cárnico modelo y ajustes realizados por modelo bifásico y modelo lineal con cola ($T = 18 \pm 2$ °C).

Tabla 3. Medidas estadísticas y valores de parámetros obtenidos al ajustar 4 modelos usando GlnaFIT para inactivación de *E. coli* y *S. aureus* en sistema cárnico modelo

Patógeno	Tipo de modelos	SSE	RMSE	R ²	FS	FE	No (Log UFC/mL)	kmax	δ	p	kmax ₁ /kmax ₂	Nres (log UFC/mL)
<i>E. coli</i>	Log. lineal	0,20	0,45	0,75	0,96	1,21	3,73	0,11				
	Weibull	0,17	0,41	0,81	0,98	1,16	4,12		11,25	0,70		
	Bifásico	0,006	0,07	0,99	1	1	3,79				0,32/0,01	
	Lineal con cola	0,04	0,21	0,95	1	1,04	4,13	0,19				0,93
<i>St. aureus</i>	Log. lineal	0,31	0,55	0,84	0,94	1,30	3,33	0,10				
	Weibull	0,25	0,50	0,88	1	1,21	3,91		10,83	0,63		
	Bifásico	0,007	0,08	0,99	1	1	3,55				0,43/0,03	
	Lineal con cola	0,06	0,24	0,96	1	1,06	3,95	0,23				0,98

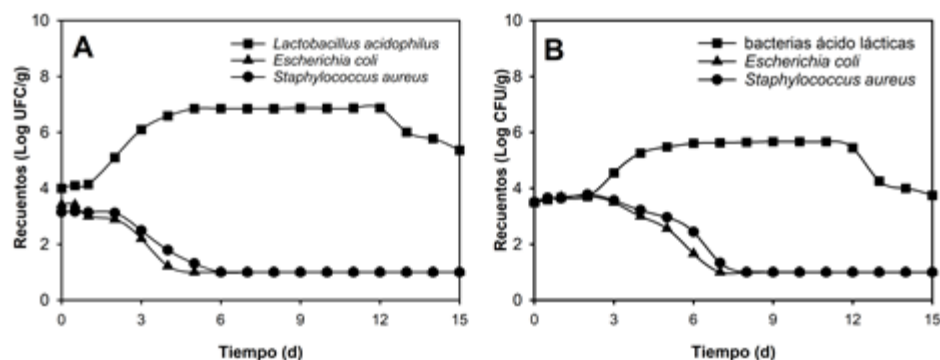


Fig. 3. Cinética de inactivación de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en chorizo con cultivo iniciador *L. acidophilus* (A) y sin cultivo iniciador (B) ($T = 18 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, $HR = 80 \pm 5 \%$).

difunda a través de la membrana celular y colapsar el gradiente de protones electroquímico. Esto afecta la permeabilidad de la membrana celular, lo que altera los sistemas de transporte de sustrato (27).

Los parámetros cinéticos de cada modelo (N_0 , k_{max} , δ , p , k_{max_1} , k_{max_2} y N_{res}) y los valores estadísticos se obtuvieron mediante el programa GInaFit (Tabla 4). Los cuatro modelos ajustaron los datos experimentales de inactivación de los patógenos *E. coli* y *S. aureus* con factor de sesgo y de exactitud cercanos a uno. La suma del error al cuadrado (SSE) y RMSE fueron altos para los modelos log-lineal y de Weibull y mucho menor para los modelos bifásico y lineal con cola que mostraron mayores coeficientes de determinación por lo que ajustan los datos y se podrían utilizar para predecir el comportamiento de *E. coli* y *S. aureus* en un sistema cárnico. Basado en una comparación estadística de los modelos, el modelo bifásico fue el de mejor ajuste ($R^2 = 0,99$; $RSME < 0,1$; FE y $FS = 1$), para ambos microorganismos y por esa razón fue elegido para estimar los parámetros cinéticos de la inactivación de los patógenos en el chorizo.

Basado en las estimaciones del modelo bifásico la velocidad con que *L. acidophilus* inhibe a *E. coli* y *S. aureus* es de $0,09 \text{ h}^{-1}$ y $0,12 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Una de las características más importantes que debe tener un cultivo iniciador es que al agregarlo directamente a la masa cárnica debe implantarse en el alimento, convertirse en la microbiota dominante de la matriz

alimentaria y dirigir la fermentación para que mejore la vida útil del producto, la salubridad y aumente su aceptabilidad (5, 18, 28). En relación a la viabilidad del cultivo en la matriz cárnica (Fig. 3) se observan altos conteos, por encima de seis unidades a los tres días, de hecho desde su inoculación aumentó en dos unidades log, lo que significa que *L. acidophilus* es capaz de colonizar el sistema compuesto por carne de cerdo, sales y especias ya que al ser inoculado se alcanzaron concentraciones finales de entre 6 y 7 log UFC/g. Incrementos similares obtuvieron otros autores para productos como embutidos Cacciatore, Felino y Milano (2,5; 2,0 y 1,5 log UFC/g, respectivamente) (9).

El ajuste realizado por el modelo bifásico para predecir el comportamiento de cada patógeno en el chorizo tanto con cultivo como sin cultivo iniciador fue excelente (Tabla 3). La cinética de inactivación de *E. coli* y *S. aureus* durante la etapa de maduración secado de la masa de chorizo (Fig. 3) mostró que cada microorganismo respondió diferente a los cambios ocurridos durante la maduración del producto y en todas las variantes la disminución fue de 2,5 log UFC/g. Esto podría explicarse porque las bacterias grampositivas son más resistentes a los procesos dinámicos que ocurren durante la fermentación debido a la composición de su pared celular (8). La disminución de ambos microorganismos patógenos ocurrió tanto al emplear *L. acidophilus* como cultivo iniciador como cuando durante la maduración espontánea del embutido. Lo distintivo es que cuando no hay cultivo iniciador adicionado la

inactivación de ambos microorganismos es más lenta. Este comportamiento se ha informado por otros autores, observando disminución de los conteos de *E. coli* O157:H7 de 10^2 UFC/g durante el proceso de fermentación-secado de embutidos fermentados sin la adición de cultivos iniciadores mientras que al inocular cultivos iniciadores como *L. rhamnosus* la disminución es de 10^5 UFC/g (15). Por otro lado, el ajuste realizado por el modelo bifásico fue excelente tanto para describir el comportamiento de ambos microorganismos en chorizo con cultivo iniciador como sin cultivo iniciador (Fig. 4), por lo cual puede ser empleado para cuantificar la concentración *E. coli* y *S. aureus* en chorizo.

CONCLUSIONES

El cultivo iniciador *Lactobacillus acidophilus* LA16 inhibió *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en sistema modelo y en el chorizo. La ecuación modificada de Gompertz se ajusta para predecir el comportamiento de ambos patógenos en el sistema cárnico modelo y respondieron de forma diferente a los cambios ocurridos durante la maduración del embutido. El modelo bifásico fue el que mejor ajustó los datos experimentales obtenidos tanto en el sistema cárnico modelo como en el chorizo y puede ser empleado para cuantificar *E. coli* y *S. aureus* en un chorizo.

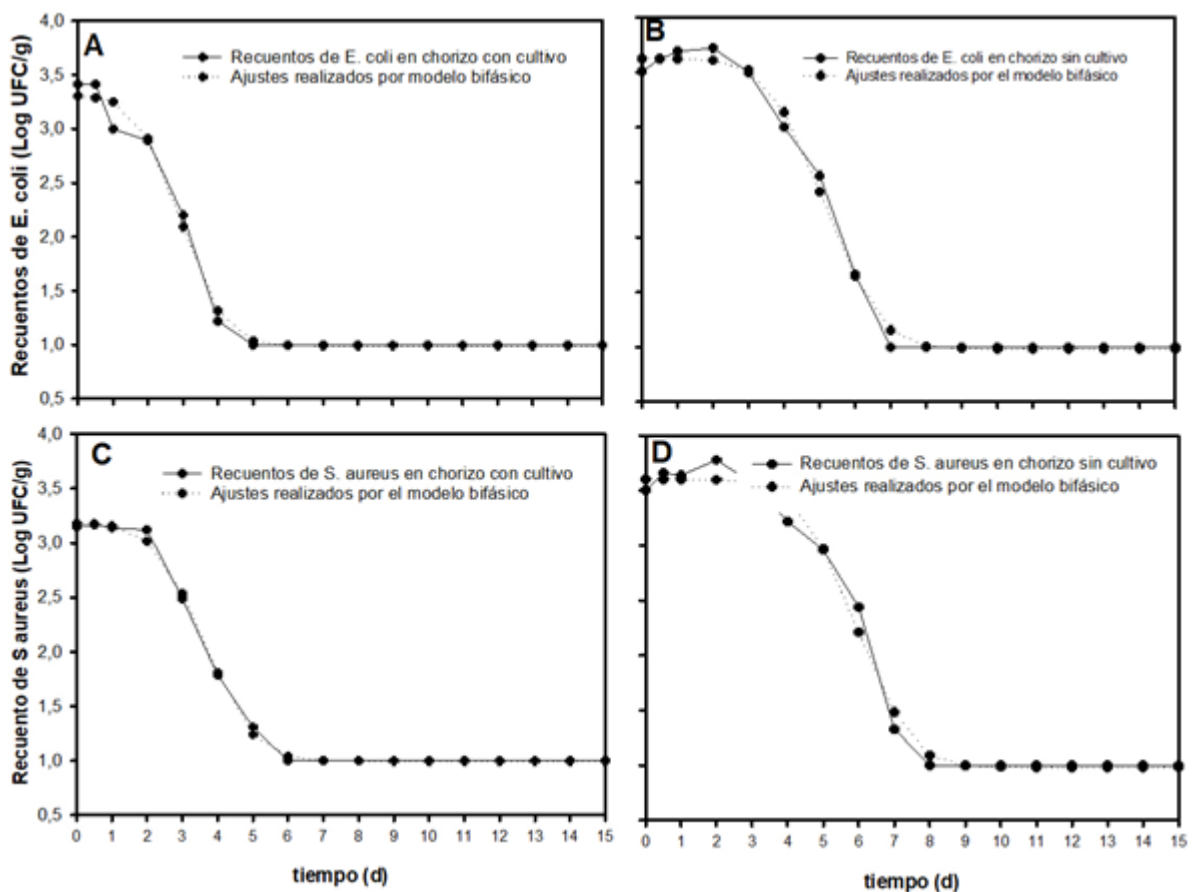


Fig. 4. Ajuste realizado por el modelo bifásico para la cinética de inactivación de *E. coli* (A y B) y *S. aureus* (C y D) en chorizo con cultivo iniciador *L. acidophilus* (A y C) y sin cultivo iniciador (B y D) ($T = 18 \pm 2$ °C, HR = 80 ± 5 %).

Tabla 4. Medidas estadísticas y valores de parámetros obtenidos al ajustar el modelo bifásico usando GInaFiT para inactivación de *E. coli* y *S. aureus* en chorizo con y sin cultivo iniciador

Patógeno	Cultivo	SSE	RSME	R ²	FS	FE	No	kmax ₁
	<i>L. acidophilus</i>						(log UFC/g)	
<i>E. coli</i>	x	0,009	0,09	0,99	1	1	3,30	2,40
	-	0,008	0,08	0,99	1	1	3,63	2,03
<i>St. aureus</i>	x	0,001	0,04	0,99	1	1	3,18	2,02
	-	0,015	0,12	0,95	1	1	3,61	2,03

REFERENCIAS

- Wang S, Weller D, Falardeau J, Strawn LK, Mardones FO, Adell AD, Switt Moreno, AI. Food safety trends: From globalization of whole genome sequencing to application of new tools to prevent foodborne diseases. *Trends Food Sci Technol* 2016;57:188-98.
- La Storia A, Villani F, Giello M, De Filippis F, Ercolini D. Impact of *Lactobacillus curvatus* 54M16 on microbiota composition and growth of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages. *Food Microbiol* 2017;72:1-15.
- Ge Q, Pei H, Liu R, Chen L, Gao X, Gu Y, Hou Q, Yin Yo, Yu H, Wu M, Zhang W, Zhou, G. Effects of *Lactobacillus plantarum* NJAU-01 from Jinhua ham on the quality of dry-cured fermented sausage. *LWT* 2019;101:513-8.
- Meira NVB, Holley RA, Bordin K, Macedo REF d., Luciano FB. Combination of essential oil compounds and phenolic acids against *Escherichia coli* O157:H7 in vitro and in dry-fermented sausage production. *Int J Food Microbiol* 2017;260:59-64.
- Gonzales-Barron U, Cadavez V, Pereira AP, Gomes A, Araujo JP, Saavedra MJ, Estevinho L, Butler F, Pires P, Dias T. Relating physicochemical and microbiological safety indicators during processing of linguíça, a Portuguese traditional dry-fermented sausage. *Food Res Int* 2015;78:50-61.
- Mataragas M, Bellio A, Rovetto F, Astegiano S, Decastelli L, Coccolin L. Risk-based control of food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in the Italian fermented sausages Cacciatore and Felino. *Meat Sci* 2015;103:39-45.
- Mataragas M, Bellio A, Rovetto F, Astegiano S, Greci C, Hertel C, Decastelli L, Coccolin L. Quantification of persistence of the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* during manufacture of Italian fermented sausages. *Food Control* 2015;47:552-9.
- Rubio B, Possas A, Rincón F, García-Gimeno RM, Martínez B. Model for *Listeria monocytogenes* inactivation by high hydrostatic pressure processing in Spanish chorizo sausage. *Food Microbiol* 2018;69:18-24.
- Christieans S, Picgirard L, Parafita E, Lebert A, Gregori T. Impact of reducing nitrate/nitrite levels on the behavior of *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in French dry fermented sausages. *Meat Sci* 2018;137:160-7.
- NC-ISO 585. Contaminantes microbiológicos en alimentos. Requisitos sanitarios. Cuba, 2013.
- Rubio R, Martín B, Aymerich T, Garriga M. The potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679 survives the passage through the gastrointestinal tract and its use as starter culture results in safe nutritionally enhanced fermented sausages. *Int J Food Microbiol* 2014;186:55-60.
- Rodríguez-Sánchez S, Ramos IM, Seseña S, Poveda JM, Palop ML. Potential of *Lactobacillus* strains for health-promotion and flavouring of fermented dairy foods. *LWT* 2021;143: 111102.
- Pragalaki T, Bloukas JG, Kotzekidou P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in liquid broth medium and during processing of fermented sausage using autochthonous starter cultures. *Meat Sci* 2013;95(3):458-64.
- Dalzini E, Cosciani-Cunico E, Bernini V, Bertasi B, Losio M-N, Daminelli P, Varisco G. Behaviour of *Escherichia coli* O157 (VTEC), *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and shelf life of low fat salami. *Food Control* 2015;47:306-11.
- Holck AL, Axelsson L, Rode TM, Høy M, Måge I, Alvseike O, L'Abée-Lund TM, Omer MK, Granum P, Heir E. Reduction of verotoxigenic *Escherichia coli* in production of fermented sausages. *Meat Sci* 2011;89(3):286-95.

16. Correia JC, Bover-Cid S, Bolivar-Araceli, Zurera G, Pérez-Rodríguez F. Modelling the interaction of the sakacin-producing *Lactobacillus sakei* CTC494 and *Listeria monocytogenes* in filleted gilthead sea bream (*Sparus aurata*) under modified atmosphere packaging at isothermal and non-isothermal conditions. *Int J Food Microbiol* 2019;297:72-84.
17. Mataragas M, Drosinos EH, Vaidanis A, Metaxopoulos I. Development of a predictive model for spoilage of cooked cured meat products and its validation under constant and dynamic temperature storage conditions. *J Food Sci.* 2006;71(6): M157-M167.
18. Pérez-Rodríguez F, Valero A. Predictive Microbiology in Foods. Hartel RW, editor. London: Springer New York Dordrecht Heidelberg London; 2013. 129 p.
19. Beldarrain T, Moya Y, Piloto S, Cepero Y, Bruselas A, Santos R, Guerra MA, Frómata Z, Rodríguez F. Empleo de *Lactobacillus acidophilus* como cultivo bioprotector. Parte II. *Cienc Tecnol Aliment* 2010;20(1):17-21.
20. Pla ML, Oltra S, Esteban MD, Andreu S, Palop A. Comparison of Primary Models to Predict Microbial Growth by the Plate Count and Absorbance Methods. *Biomed Res Int* 2015;2015.
21. Geeraerd AH, Valdramidis VP, Van Impe JF. GInaFit, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *Int J Food Microbiol.* 2005;102(1):95-105.
22. Gänzle MG. Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Curr Opin Food Sci.* 2015;2:106–17.
23. Kalia VC. Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnol Adv* 2013;31(2):224-45.
24. Seleshe S, Kang SN. Effect of different *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus plantarum* strains on quality characteristics of dry fermented sausage after completion of ripening period. *Food Sci Anim Resorces* 2021:1-32.
25. Wang Y, Tashiro Y, Sonomoto K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. *J Biosci Bioeng* 2015;119(1):10-8.
26. Du S, Cheng H, Ma JK, Li Z jun, Wang C hua, Wang YL. Effect of starter culture on microbiological, physiochemical and nutrition quality of Xiangxi sausage. *J Food Sci Technol* 2019;56(2):811-23.