Universidad Pública de Navarra **NafarroakoUnibertsitatePublikoa**

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

NEKAZARITZAKO INGENIAREN GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA

Caracterización microbiológica de tomate cubitado y sopa oriental a lo largo del proceso de fabricación industrial para la optimización de los tratamientos térmicos

presentado por

CARLOS IZURIAGA ECHEVERRÍA-k

aurkeztua

MÁSTER EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD EN LAS INDUSTRIAS AGROALIMENTARIAS

UNIBERTSITATE MASTERRA NEKAZARITZAKO ELIKAGAIEN INDUSTRIETAKO TEKNOLOGIAN ETA KALITATEAN

Septiembre, 2018

2018eko, Iraila

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN TECNOLOGÍA Y CALIDAD EN LAS INDUSTRIAS AGROALIMENTARIAS

Este Trabajo Fin de Máster ha sido desarrollado en el Departamento de Bioprocesos del Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria presentado por D. *Carlos Izuriaga Echeverría* al objeto de optar al título de Máster en Tecnología y Calidad en las Industrias Agroalimentarias, siendo su directora la Dra. Mª Jesús Cantalejo Díez, Profesora Titular de Universidad adscrita al Dpto. de Agronomía, Biotecnología y Alimentación de la ETSIA-UPNA, y co-directora, la Dra. Raquel Virto Resano, responsable técnico-científica de I+D+i de CNTA. Las directoras autorizan la presentación del TFM

VºBº Directora del trabajo:

Dra. Mª Jesús Cantalejo Díez

VºBº Co-directora del trabajo:

Dra. Raquel Virto Resano

Autor del trabajo:

Carlos Izuriaga Echeverría

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar quisiera agradecer a la Dra. Mª Jesús Cantalejo por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo y por la dedicación continua y el esfuerzo que ha hecho ayudándome en todo momento. Quisiera agradecer de igual manera a la Dra. Raquel Virto por acogerme con los brazos abiertos en el departamento de bioprocesos de CNTA. La pasión que dedica a su trabajo hace que todas las piezas de la maquinaria estén bien engranadas y por ello haya podido sacar este trabajo adelante. Especialmente agradecer su dedicación conmigo a David Alonso y Sergio Ramos por todo lo que me han enseñado y ayudado durante todo este periodo de tiempo. No puedo olvidarme de todos los compañeros de los laboratorios de bioprocesos, biotecnología y aguas, especialmente de Carolina y Alberto, por todos los momentos vividos. Cabe mencionar especialmente a Marta Gil, Mª José Saiz y Jorge Lorenzo ya que ellos fueron los artífices de que pudiera desarrollar con éxito mi estancia en el centro tecnológico. Gracias también a mi familia y amigos por haber estado siempre ahí. A tod@s vosotr@s, muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS 6
ÍNDICE DE FIGURAS 7
1. RESUMEN 8
2. ABSTRACT 9
3. INTRODUCCIÓN 10
3.1 El tratamiento térmico 10
3.1.1 Parámetros cinéticos de inactivación térmica de microorganismos 10
3.1.1.1 Valor D o Tiempo de Reducción Decimal 11
3.1.1.2 Valor Z o Constante de Resistencia Térmica 11
3.1.1.3 Valor de letalidad F ó Tiempo de destrucción térmica 11
3.2 Métodos para determinar la termorresistencia bacteriana 12
3.2.1 Termorresistómetro 12
3.3 Factores que influyen sobre la termorresistencia de los microorganismos 12
4. JUSTIFICACIÓN 14
5. OBJETIVOS 16
6. MATERIALES Y MÉTODOS 17
6.1 Materia prima 17
6.1.1 Tomate cubitado 17
6.1.2 Sopa oriental 19
6.2 Preparación de las muestras 21
6.3 Análisis microbiológico 22
6.3.1 Aerobios mesófilos 22
6.3.2 Anaerobios mesófilos 23
6.3.3 Mohos y levaduras 23
6.3.4 Esporos termófilos aerobios y anaerobios 24
6.3.5 Recuento de microorganismos 24
6.4 Técnicas moleculares 25
6.4.1 Amplificación por PCR a partir de una suspensión bateriana 25
6.4.2 Separación de DNA por electroforesis 25
6.4.3 Purificación y secuenciación 26
6.5 Esporulación 26

6.6 Ensayos de inactivación por tratamiento térmico 27
6.7 Tratamiento estadístico de los datos 29
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 30
7.1 Tomate cubitado 30
7.1.1 Caracterización microbiológica en las etapas previas al tratamiento térmico 30
7.1.2 Aislamiento de microflora microbiana resistente tras el tratamiento térmico 33
7.1.3 Ensayos de inactivación por tratamiento térmico 34
7.1.4 Resultados en *Alicyclobacillus acidocaldarius* 34
7.1.4.1 Determinación de la cepa más resistente 34
7.1.4.2 Determinación de las condiciones de esporulación de máxima resistencia 36
7.1.4.3 Influencia de las etapas previas de acondicionado antes del tratamiento térmico 38
7.1.4.4 Estudios de termorresistencia en las condiciones seleccionadas 39
7.2 Sopa oriental: 44
7.2.1 Caracterización microbiológica en las etapas previas al tratamiento térmico 44
7.2.1.1 POST-COCCIÓN (KORUMA) 44
7.2.1.2 POST-ENVASADO 48
8. CONCLUSIONES 51
9. BIBLIOGRAFÍA 53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización microbiana en cada punto del proceso de fabricación industrial del tomate cubitado 31
Tabla 2. Resultados de las pruebas de aislamiento e identificación en lotes de tomate cubitado suministrados por la empresa 34
Tabla 3. Ciclos de inactivación de las cepas de estudio a los tratamientos térmicos 35
Tabla 4. Condiciones de inactivación y recuentos de las cepas de estudio a las condiciones de esporulación planteadas 38
Tabla 5. Tiempos de reducción decimal a distintas temperaturas de A. acidocaldarius 41
Tabla 6. Recuentos microbianos en cada punto del proceso de elaboración de sopa oriental y en cada carga 47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del proceso de elaboración industrial de tomate cubitado..... 18
Figura 2. Diagrama de proceso de elaboración de sopa oriental 20
Figura 3. Izda. Preparación de la sopa oriental en bolsas Stomacher para la homogeneización de su contenido. Dcha. Contenido de la bolsa Stomacher tras la homogeneización 21
Figura 4. Esquema del termoresistómetro TR-SC..... 27
Figura 5. Termoresistómetro utilizado para las determinaciones de resistencia de calor 28
Figura 6. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios a lo largo del procesado industrial de tomate cubitado. Línea negra discontinua: límite de detección (<1 log ufc/g)..... 30
Figura 7. Recuento de microorganismos mesófilos anaerobios a lo largo del procesado industrial de tomate cubitado. Línea negra discontinua: límite de detección (<1 log ufc/g)..... 32
Figura 8. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios acidolácticos a lo largo del procesado industrial de tomate cubitado. Línea negra discontinua: límite de detección (<1 log ufc/g) 33
Figura 9. Ciclos de inactivación de distintas cepas de A. acidocaldarius en tomate cubitado sometido a distintos tratamientos térmicos. Cepas 48 y 695 pertenecen al cepario de CNTA. Cepa 690 aislada del tomate cubitado 35
Figura 10. Influencia del pH y la temperatura de esporulación en la resistencia al calor de *A. acidocaldarius* aislada de tomate cubitado 37
Figura 11. Influencia del pH y la temperatura de esporulación en la resistencia al calor de *A. acidocaldarius* aislada de tomate cubitado (perspectiva 3D)..... 37
Figura 12. Ciclos de inactivación de esporos de *A. acidocaldarius* con o sin etapas de acondicionamiento tras un tratamiento térmico a 98 ºC durante 75 minutos. Se indican los valores medios ± desviación estándar..... 39
Figura 13. Gráficas de supervivencia de esporos de *A. acidocaldarius* sometidos a distintos tratamientos térmicos. Las gráficas de supervivencia se ajustaron asumiendo una cinética exponencial..... 41
Figura 14. Gráfica de termodestrucción de esporos de *A. acidocaldarius* en tomate cubitado 42
Figura 15. Recuento de microorganismos tras la cocción de sopa oriental en la primera carga de sopa oriental. Línea negra discontinua: límite de detección (<1 log ufc/g)..... 44
Figura 16. Recuento de microorganismos tras la cocción de sopa oriental en la última carga de sopa oriental. Línea negra discontinua: límite de detección (<1 log ufc/g)..... 45
Figura 17. Recuento de microorganismos tras el envasado de sopa oriental en la primera carga de sopa oriental. Línea negra discontinua: límite de detección (<1 log ufc/g)..... 48
Figura 18. Recuento de microorganismos tras el envasado de sopa oriental en la última carga de sopa oriental. Línea negra discontinua: límite de detección (<1 log ufc/g)..... 48

1. RESUMEN

Los métodos de conservación tradicionales basados en tratamientos térmicos conllevan en muchas ocasiones una disminución de la calidad nutricional y organoléptica del alimento. Este aspecto, unido al hecho de que el consumidor demanda alimentos cada vez más frescos y naturales, que además de tener una vida útil prolongada mantengan sus cualidades nutricionales y sensoriales, ha llevado a perfeccionar los tratamientos térmicos existentes, ya que cuanto más intenso es el tratamiento térmico aplicado, mayores son los cambios indeseables ocasionados. Por ello, cuando se establecen los tratamientos térmicos más adecuados para un determinado producto se busca siempre un compromiso entre su calidad microbiológica, organoléptica y nutritiva.

Teniendo todo ello en cuenta, esta tesis fin de máster forma parte de un proyecto ideado por una empresa de la industria agroalimentaria y desarrollado en las instalaciones de CNTA (Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria) cuyo objetivo principal es el desarrollo de herramientas de gestión de peligros microbiológicos en alimentos, focalizándose en microorganismos de deterioro o alterantes en dos tipos de alimentos de estudio, uno ácido (tomate) y otro no ácido (sopa oriental), que permitan la toma de decisiones inteligentes sobre los tratamientos de conservación térmicos más adecuados para optimizar la calidad y rentabilidad de dichos productos alimentarios.

En este trabajo se ha evaluado la caracterización microbiológica de los dos productos en estudio a lo largo del proceso de fabricación industrial. Además se estudió la termorresistencia del microorganismo *A. acidocaldarius* hallado en tomate, poniendo de manifiesto la ineficacia del tratamiento térmico aplicado en la empresa y siendo por ello insuficiente para la total inactivación de este microorganismo.

2. ABSTRACT

Traditional methods of preservation based on thermal treatments often lead to a decrease of the nutritional and organoleptic quality of the food. Taking into account this aspect, with the fact that the consumer demands more and more fresh and natural foods that, in addition to having a long lifespan, they keep their nutritional and sensory qualities and therefore, it has led to improve the existing heat treatments. So, the more intense the heat treatment is applied, the greater the undesirable changes are caused. Likewise, when the most suitable heat treatments are applied for a particular product, a compromise between its microbiological, sensory and nutritive quality is always sought.

This Masters thesis is part of a project carried out by a company in the agrofood and performed in the facilities of CNTA (National Center for Technology and Food safety), whose main goal is the development of tools for the management of microbiological hazards in food, focusing on microorganisms spoilage in two types of foods: an acid one (tomato) and the other non-acid one (exotic soup), that allows us the smart decision-making on the thermal preservation treatments more suitable to optimize the quality and the profit of these foodstuffs.

In this paper, the microbiological characterization of the two products has been evaluated throughout the industrial manufacturing process. In addition, we studied the thermorresistance of the microorganism *A. Acidocaldarius* found in tomato. The heat treatment applied in the company was not sufficient for the total inactivation of this microorganism.

3. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, los consumidores demandan productos de alta calidad, con aromas y sabores naturales, además de sanos y nutritivos (Elez-Martinez and Martin-Belloso, 2007). La aceptación de estos productos por el consumidor depende de que la calidad, bioactividad y las características sensoriales se mantengan a niveles aceptables durante toda la vida útil (Gironés-Vilaplana et al., 2014).

3.1 El tratamiento térmico

El tratamiento térmico, además de ser el método más utilizado en la actualidad para la conservación de alimentos, es una de las principales técnicas utilizadas en la industria alimentaria para garantizar la destrucción de los patógenos, reducir los riesgos microbianos a niveles seguros, y proporcionar seguridad alimentaria (Doyle et al., 2001, Van Zuijlen et al., 2010, Garre et al., 2017). Sin embargo, la aplicación de un tratamiento térmico conlleva una reducción de las propiedades nutricionales y organolépticas de los alimentos tratados, lo cual confronta con tendencias actuales del mercado (demanda de productos mínimamente procesados) (McMeekin et al., 2007).

Entre este tipo de procesos se distingue la pasteurización y la esterilización. La primera es un proceso en el que se eliminan microorganismos patógenos, pero no garantiza un periodo mayor de vida útil a temperatura ambiente. Por otra parte, la esterilización comercial es la que elimina a la mayoría de los microorganismos presentes en el producto y permite un mayor almacenamiento a temperatura ambiente pero la calidad organoléptica de estos productos esterilizados, no siempre es la mejor, y puede provocar grandes pérdidas nutricionales si el tratamiento no está bien controlado (Singh and Heldman, 2009).

Por lo tanto, cada tratamiento térmico deberá ajustarse de forma que se consigan los resultados deseables y se minimicen los indeseables, por lo que es necesario un conocimiento detallado de la actuación del calor sobre los microorganismos, componentes y propiedades físicas, con el fin de poder optimizar el proceso para obtener los resultados buscados (Abril Requena, 2004).

3.1.1 Parámetros cinéticos de inactivación térmica de microorganismos

Un aspecto crítico en el cálculo de procesos térmicos es la necesidad de conocer los parámetros que cuantifican la influencia de las temperaturas letales sobre la inactivación de las poblaciones microbianas. El impacto de las temperaturas letales sobre las poblaciones microbianas requiere referirse al Tiempo de Reducción Decimal (Valor D) y al Tiempo de Destrucción Térmica (TDT o valor F), además del concepto de la Constante de Resistencia Térmica (valor Z) (MORALES-BLANCAS and TORRES,

2003). A continuación se exponen alguno de los conceptos relacionados con la resistencia de microorganismos.

3.1.1.1 Valor D o Tiempo de Reducción Decimal

El tiempo de reducción decimal, D, se define como el tiempo necesario para reducir en un 90 % la población microbiana. Cuando se representa la población microbiana en coordenadas semilogarítmicas, el valor D es el tiempo necesario a una temperatura dada para reducir en un ciclo logarítmico una población bacteriana. Basándose en esta definición, puede utilizarse la siguiente ecuación (Singh and Heldman, 2009):

$$D = \frac{t}{logN_0 - logN}$$

t: minutos a una determinada temperatura; N_0: número de células al inicio del tratamiento; *N*: Número células supervivientes al tratamiento

3.1.1.2 Valor Z o Constante de Resistencia Térmica

Otro parámetro de importancia es el valor Z, obtenido mediante la representación del logaritmo de varios valores D y la temperatura. Es el *número de grados de temperatura durante los cuales se reduce en un ciclo logarítmico la carga bacteriana inicial* (Bigelow, 1921). Los microorganismos más resistentes presentan un mayor valor de Z. Basándose en esta definición, puede utilizarse la siguiente ecuación (Singh and Heldman, 2009):

$$Z = \frac{T_1 - T_2}{logD_2 - logD_1}$$

$T_1 - T_2$: incremento de temperatura; $D_{2,1}$: valores respectivos de D

3.1.1.3 Valor de letalidad F ó Tiempo de destrucción térmica

Conocido como tiempo de destrucción térmica (TDT), se trata de un parámetro que expresa el efecto letal integrado de un tratamiento térmico expresado en minutos a una temperatura que se indica por medio de un subíndice. El valor F es específico para una población microbiana caracterizada por su valor z (MORALES-BLANCAS and TORRES, 2003).

En las esporas, Z suele tener un valor en torno a 10 ºC y al $F_{121ºC}$ determinado, utilizando este valor, se le denomina F_0, cuya expresión matemática es:

$$F_0 = D_{121°C} (\log N_0 - \log N)$$

3.2 Métodos para determinar la termorresistencia bacteriana

Los estudios de resistencia microbiana al calor son necesarios para garantizar la inocuidad en alimentos procesados. El conocimiento que proporcionan estos estudios sobre las cinéticas y mecanismos de destrucción han permitido el desarrollo de procesos seguros, que reducen el riesgo de alteración y permiten controlar los microorganismos alterantes y patógenos. Son muchos los métodos para determinar la resistencia al calor que se han utilizado (Brown and Ayres, 1982, Stumbo, 1973), cada uno de ellos con sus ventajas y desventajas. Los métodos disponibles hoy día se pueden agrupar en: métodos indirectos, métodos directos, métodos de mezcla y métodos de partícula (Brown and Ayres, 1982).

3.2.1 Termorresistómetro

El termorresistómetro es un instrumento diseñado para la determinación de la resistencia de los microorganismos al calor. Este instrumento permite la aplicación directa de un tratamiento térmico preestablecido a una muestra de alimento o a un medio sintético durante un tiempo determinado en condiciones controladas (Palop, 2007). El termorresistómetro consiste en un tanque de acero presurizado, calentado por una resistencia eléctrica y homogeneizado mediante una hélice de agitación. La temperatura del instrumento se controla mediante un autómata programable. Está dotado de un puerto para adicionar los microorganismos, por medio de una jeringa y una aguja estéril. En este instrumento se pueden realizar tratamientos isotérmicos (temperatura constante a través del tiempo) y no isotérmicos (rampas de temperatura, la temperatura aumenta de manera gradual y constante durante el tiempo deseado hasta una temperatura final) (Fernández et al., 2007).

3.3 Factores que influyen sobre la termorresistencia de los microorganismos

En cualquier tratamiento antimicrobiano puede ocurrir que algunas células sean dañadas pero no mueran debido a que algunas células sean más termorresistentes que las demás por la producción de proteínas de choque térmico ó HSP (Heat Shock Proteins) u otros mecanismos (Hassani et al., 2007, Miller et al., 2006). Aparte de esto, la resistencia de los microorganismos al calor está supeditada a una serie de factores, entre los cuales están:

Tipo de microorganismos: Las bacterias esporuladas son las formas más resistentes, llegando algunas de ellas, a sobrevivir a tratamientos de varios minutos a 120 ºC. Seguido están las bacterias vegetativas, levaduras y mohos que presentan una termorresistencia similar. La mayoría mueren tras estar unos minutos a una temperatura entre 70 y 80ºC (Garza-Velasco et al., 2007).

Temperatura: algunas investigaciones han demostrado que la termorresistencia de las esporas está influenciada por la temperatura de esporulación. Así si la esporulación tiene lugar a la temperatura óptima de crecimiento, o superior, su termorresistencia será mayor que si el crecimiento hubiera tenido lugar a temperaturas más bajas. Las formas vegetativas presentan un comportamiento similar a las esporuladas, pues, en general, cuanto más se aproxima a una temperatura óptima de crecimiento durante la fase de crecimiento, más elevada es su termorresistencia (Garza-Velasco et al., 2007, Lin and Chou, 2004).

pH del medio de tratamiento: Quizás el factor más importante que afecta la termorresistencia sea el pH. La resistencia de los microorganismos es generalmente máxima a valores de pH próximos a la neutralidad, entre 6.0 y 8.0, y decrece cuando el medio es ácido (Garza-Velasco et al., 2007). Investigaciones de (Hassani et al., 2005) y de (Hassani et al., 2007) demostraron que, a un pH ácido, la termorresistencia disminuía y, conforme aumentaba el pH, la termorresistencia también aumentaba.

Actividad del agua: La reducción en la actividad del agua en el medio de tratamiento aumenta considerablemente la termorresistencia tanto en los esporos como en las células vegetativas, lo que se refleja en la necesidad de utilizar temperaturas de tratamiento más elevadas o tiempos más prolongados (Garza-Velasco et al., 2007). (Fernández et al., 2007) realizaron un modelo en el cual el efecto de la a_w sobre la termorresistencia de *L. monocytogenes* varía dependiendo de la temperatura del tratamiento.

Composición del medio: El contenido de azúcares, la adición de conservantes, la presencia y el tipo de ácidos orgánicos y la presencia de sales, tienen un efecto importante sobre la termorresistencia de los microorganismos. El azúcar en concentraciones altas protege a las células contra la inactivación térmica pero no sólo la concentración influye, sino también el tipo de azúcar interviene significativamente en el efecto protector (Garza-Velasco et al., 2007). La sal en los alimentos juega un rol importante pues el primer efecto que tiene sobre las células es la plasmólisis. Además tiene otros efectos como deshidratación, interferencia enzimática, retiro de oxígeno y la toxicidad de los iones cloro y sodio, cuando el cloruro de sodio es ionizado (Lin and Chou, 2004).

4. JUSTIFICACIÓN

Una empresa conservera referente en el sector agroalimentario dedicada a la producción y distribución de conservas vegetales y platos preparados planteó en este proyecto la necesidad de buscar soluciones para evitar el deterioro de los alimentos derivada de la presencia de microorganismos alterantes que no son destruidos en los tratamientos térmicos de conservación (pasteurización o esterilización) y que permanecen en los alimentos durante el almacenamiento.

Muchos microorganismos alterantes, que no presentan un riesgo sanitario pero que sí que son capaces de deteriorar el producto y por tanto hacerlo inaceptable, muestran una mayor resistencia a los tratamientos térmicos que los microorganismos patógenos y/o una mayor capacidad de crecimiento en distintos ambientes, constituyendo así un importante riesgo industrial y económico.

El aplicar tratamientos térmicos muy agresivos para inactivar estos microorganismos alterantes no es una opción. Por una parte, porque se deteriora gravemente la calidad sensorial y nutricional de los productos, lo que no va en línea con lo demandado por el consumidor que espera productos alimentarios de calidad sensorial y nutricional superior y que tengan menos conservantes o estén menos procesados, y también porque es una operación costosa en términos de energía. Pero el ajuste del tratamiento térmico para no dañar la calidad sensorial del producto o mejorar la rentabilidad del proceso también entraña riesgos. El tratamiento reducido no puede garantizar la estabilidad del producto por no ser capaz de eliminar algunas esporas de bacterias que una vez expuestas a condiciones adecuadas para el crecimiento (nutrientes, temperatura), germinan, crecen y alteran el producto, lo que conduce a pérdidas económicas significativas para la industria. Además, una elevada carga inicial de microorganismos que forman esporas debido a las prácticas de manejo anteriores al tratamiento térmico, las características adhesivas de las esporas que aumentan su persistencia en las plantas industriales o la creciente variedad de productos de consumo, que aumenta la diversidad de especies alterantes han provocado que la susceptibilidad al deterioro haya aumentado en los últimos años.

Aunque es difícil cuantificar este impacto, el deterioro por microorganismos alterantes contribuye en gran medida a la enorme cantidad de alimentos que se desperdicia y a las pérdidas financieras asociadas. Y este impacto es mayor cuanto menos intenso sea el tratamiento de conservación y más perecedero es el producto. Se estima que para los platos preparados de conservación a temperatura ambiente hasta un 5 % de la producción podría verse afectada por la presencia de microorganismos alterantes. Aunque su presencia no condiciona la seguridad alimentaria de las producciones, el impacto es relevante cuando los productos se destinan a exportación en países de clima tropical, donde pueden darse durante el almacenamiento temperaturas elevadas (40-50 ºC) y las

condiciones óptimas para su proliferación. El mercado potencial de exportación queda por lo tanto limitado como consecuencia de los microorganismos alterantes.

Hasta el momento, la gran mayoría de las industrias alimentarias, establecen los tratamientos térmicos para el control de alterantes en base a su propia experiencia, teniendo en cuenta los episodios de alteración que han sufrido, y la información que se puede recoger de estudios publicados a los que la industria tiene acceso y que son limitados.

Sin embargo, hay un significativo potencial de mejora. En parte porque se siguen produciendo alteraciones de determinados productos antes de su fin de vida útil y en parte porque el tratamiento está sobreestimado, para minimizar el riesgo, con la consiguiente pérdida de calidad y rentabilidad.

Así que para optimizar los tratamientos de conservación a aplicar y por tanto, optimizar la calidad y la vida útil de los productos, se requiere tener un buen conocimiento sobre el tipo y la naturaleza de las bacterias alterantes, su contenido inicial y la interacción con la composición del alimento.

Por tanto, la industria alimentaria en general, tiene la necesidad de optimizar el proceso de elaboración de alimentos y en concreto el tratamiento térmico de conservación, para conseguir mejorar la calidad y coste de sus productos, asegurando la vida útil y evitando en la medida de lo posible episodios de alteración que tienen un grave perjuicio económico y de imagen.

5. OBJETIVOS

En la presente Tesis Fin de Máster se plantearon los siguientes objetivos:

1. Identificación de los microorganismos alterantes más relevantes en base a su incidencia y capacidad de crecer en los alimentos objeto de estudio.

2. Realización de estudios para evaluar la termorresistencia de los microorganismos alterantes seleccionados.

3. Estudio de factores que inciden en la inactivación y proliferación de los microorganismos diana (pH, temperatura…).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materia prima

Se ha llevado a cabo la caracterización microbiológica a lo largo del proceso de fabricación industrial de 2 productos modelo (ácido y no ácido): **tomate cubitado** y **sopa oriental**. La información obtenida es de gran utilidad para generar el conocimiento científico-técnico relacionado con el procesado industrial de productos pasteurizados/esterilizados y, necesaria para identificar los puntos críticos, así como para establecer las posibles alternativas para solucionarlos.

Con el objetivo de generar un conocimiento detallado y profundo que permita el desarrollo de herramientas de gestión de riesgo adecuadas, se decidió conjuntamente con la empresa realizar una caracterización microbiológica exhaustiva del proceso de fabricación industrial de los productos evaluados. Estos datos son esenciales para evaluar e interpretar el efecto de las distintas etapas del procesado industrial desde la materia prima hasta el tratamiento de conservación, distribución y almacenamiento en el crecimiento o resistencia microbiana y, poder de esta manera aislar e identificar los alterantes resistentes. En cada producto y, en función de las características intrínsecas y de las peculiaridades del proceso térmico industrial aplicado (pasteurización o esterilización) se establecieron los puntos de muestreo y los factores más relevantes a estudiar.

De esta manera, los puntos de muestreo en cada producto fueron los que se detallan a continuación:

6.1.1 Tomate cubitado

Los puntos seleccionados en el caso del tomate cubitado fueron (ver Figura 1):

(0) **Materia prima entera** en el momento de la recepción en la planta de producción. Las muestras se tomaron en el búnker de alimentación de la línea de proceso.

(1) **Producto lavado** para la eliminación de la suciedad grosera del mismo, antes de llevarlo a la etapa de pelado y troceado en el formato deseado.

(2) **Producto pelado,** a la salida de la peladora física antes del cubitado.

(3) **Producto cubitado,** en el formato deseado y una vez adicionado el jugo, justo antes de entrar al pasteurizador para el tratamiento térmico.

(4) **Producto tras la pasteurización térmica,** a la salida del pasteurizador y una vez enfriado a temperatura ambiente. En este caso (producto ácido), con el objetivo de seleccionar, aislar e identificar los microorganismos diana alterantes, se prepararon muestras de producto en las condiciones reales de la empresa. Estas muestras se prepararon modificando principalmente la variable pH del producto para conocer los límites de este parámetro en los cuales la microflora alterante era capaz de sobrevivir para un tratamiento térmico dado (tratamiento habitual utilizado por la empresa: 98 ºC – 75 min). Por ello, se trabajó con el ajuste del

pH en los siguientes valores: pH 3,8-4,0 (habitual de la empresa), pH 4,1-4,2 y pH 4,2-4,3.

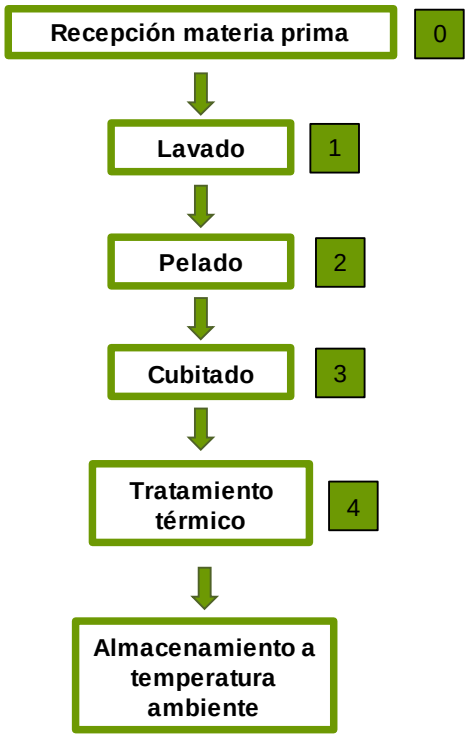

Figura 1. Diagrama del proceso de elaboración industrial de tomate cubitado

Se indican los puntos de muestreo en los cuadrados verdes.

Por tanto, en cada uno de los puntos de muestreo indicados anteriormente se llevó a cabo una caracterización microbiológica del producto mediante la realización de los siguientes análisis:

- Recuento de microorganismos mesófilos aerobios, mesófilos aerobios acidolácticos, esporas de termófilos aerobios y anaerobios y mesófilos anaerobios.
- Además, en el caso de las muestras tratadas térmicamente se realizó un estudio de estabilidad e investigación de conserva ácida el cual consiste en incubar muestras a distintas temperaturas (20, 37 y 55 ºC) durante un periodo de 7 días para comprobar la posible presencia de crecimiento microbiano y, en el caso de haberlo, poder aislar las colonias crecidas en el agar correspondiente y, a partir de ellas identificarlas mediante biología molecular (PCRq).

Por otro lado, la empresa suministró también latones que presentaron una alteración visible del producto durante el almacenamiento (hinchamiento, abombamiento, rezumado, olor desagradable, etc) sobre las cuales se realizó el recuento de los grupos microbianos descritos anteriormente y, el aislamiento e identificación de los microorganismos indicadores implicados.

Se realizó el muestreo sobre 9 lotes de producto y, en cada lote se analizaron 3 muestras, con el fin de asegurar unos resultados suficientemente representativos.

6.1.2 Sopa oriental

Los puntos seleccionados en el caso de la sopa oriental fueron (ver Figura 2):

(0) Materia prima: mix de vegetales congelados más pasta seca. El mix de vegetales contenía zanahoria, puerro, pimiento rojo y verde, cebolla, bambú, seta negra y brotes de judía mungo. Las muestras se recibieron en CNTA para su procesado.

(1) Cocción (KORUMA, tipo Disho V FrymaKoruma GmbH, Neuenburg am Rhein, Alemania) del agua más el aceite a 80 ºC durante 5 minutos en agitación. Se evalúan tiempos de retención en este punto crítico a 0,5 h y 1 h tras la cocción.

(2) Envasado en bol a 65-70 ºC. El resto de ingredientes (mix de vegetales más pasta seca sufre un descongelado previo a 90 ºC en agua caliente y agitación y se añade al bol directamente antes del envasado junto con el agua más el aceite). Se evalúan tiempos de retención en este punto crítico a 1 h y 2 h tras el envasado a temperatura ambiente.

(3) Producto tras la esterilización térmica, a la salida del autoclave y una vez enfriado a temperatura ambiente. En este caso (producto no ácido), con el objetivo de seleccionar, aislar e identificar los microorganismos diana alterantes, se prepararon muestras de producto en las condiciones reales de la empresa. Estas muestras se prepararon modificando la variable tiempo del producto en el autoclave para conocer los límites de este parámetro en los cuales la microflora alterante sea capaz de sobrevivir para un tratamiento térmico dado (tratamiento habitual utilizado por la empresa: $F_0 > 6$). Por ello, se trabajó con el ajuste del tiempo en los siguientes valores: tratamiento térmico estándar (121 ºC – 18 min) y tratamiento térmico menor (121 ºC – 12 min).

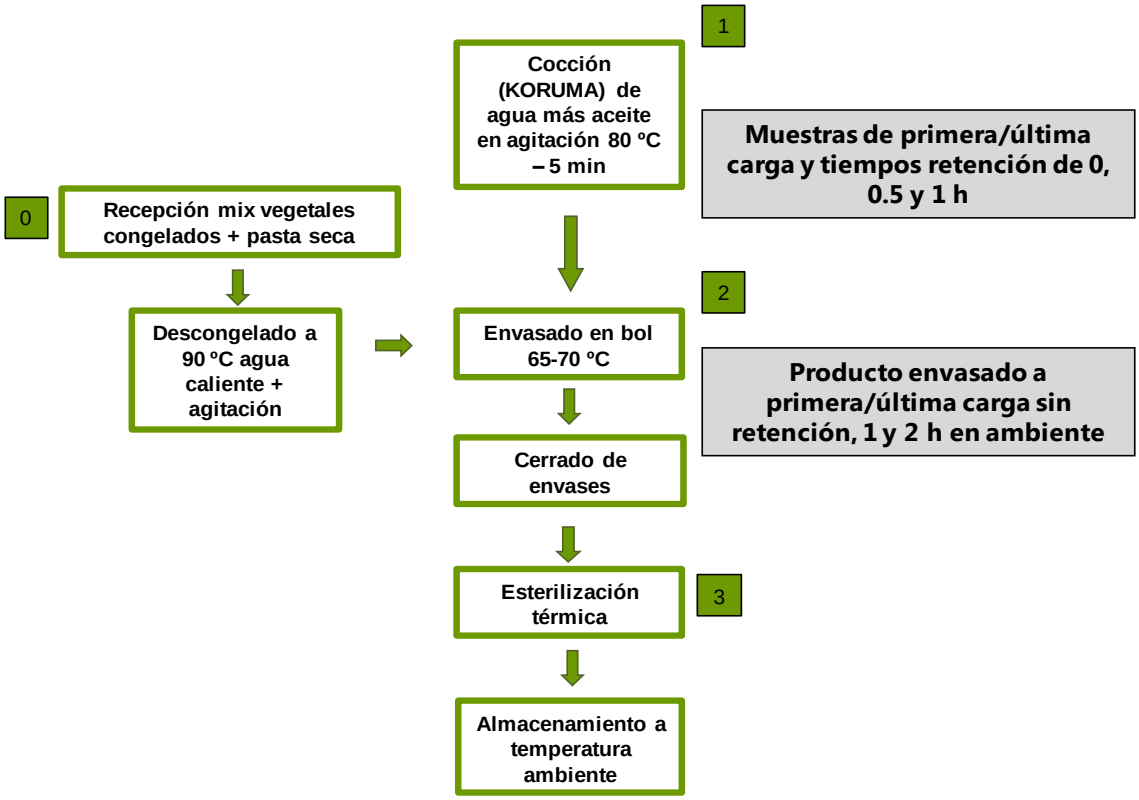

Figura 2. Diagrama de proceso de elaboración de sopa oriental

Se indican los puntos de muestreo en los cuadrados verdes.

Por tanto, en cada uno de los puntos de muestreo indicados anteriormente se llevó a cabo una caracterización microbiológica del producto mediante la realización de los siguientes análisis:

- Recuento de microorganismos mesófilos aerobios, esporas de termófilos aerobios y anaerobios, mohos y levaduras.
- Además, en el caso de las muestras tratadas térmicamente se realizó un estudio de estabilidad el cual consiste en incubar muestras a distintas temperaturas (20, 37 y 55 ºC) durante un periodo de 7 días para comprobar la posible presencia de crecimiento microbiano y, en el caso de haberlo, poder aislar las colonias crecidas en el agar correspondiente y, a partir de ellas identificarlas mediante biología molecular (PCRq).

Todos los puntos críticos examinados del proceso de elaboración (puntos críticos más tiempos de retención) se evaluaron además en una primera carga (muestras al empezar la producción) y una última carga (muestras al acabar la producción). Cada punto se analizó por triplicado.

6.2 Preparación de las muestras

Las muestras de tomate y sopa oriental analizadas fueron suministradas por una industria local asociada al proyecto. El tomate fue enviado en latones mientras que las muestras de sopa oriental fueron envasadas en bandejas de polipropileno. Tras el tratamiento térmico correspondiente recibido por cada producto, las muestras se almacenaron bajo congelación a -20 °C en CNTA hasta la realización de los análisis microbiológicos correspondientes. Las muestras se descongelaron el día anterior a la realización del análisis en cámara frigorífica a 4 °C durante 20 horas. Cada ensayo microbiológico se realizó por triplicado.

En el caso de la sopa oriental, el contenido de cada bandeja fue homogeneizado asépticamente en bolsas estériles para homogeneizador tipo Stomacher (Macs 500 AES-Chemunex, Bruz, Francia) durante 2 minutos (Figura 3) y a partir del contenido de la mezcla se prepararon las diluciones decimales necesarias en agua de peptona (Biolife) al 0,1 % (p/v) (los sólidos requieren una homogeneización en un diluyente apropiado para dispersar grumos y liberar los microorganismos de la matriz alimentaria). Con estas diluciones se realizaron las siembras en placas correspondientes para el recuento de microorganismos (el número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse al alimento). Las placas fueron incubadas dependiendo de sus condiciones. En el caso del tomate, se tomaron 10 g del alimento junto con 90 ml de agua de peptona (Biolife) al 0,1 % (p/v) (1:10) en bolsas Stomacher y tras la homogeneización se procedió como se ha explicado en el párrafo anterior.

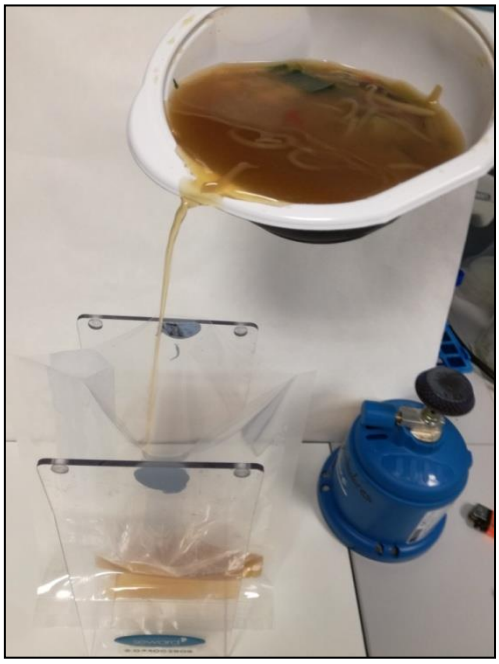

Figura 3. Izda. Preparación de la sopa oriental en bolsas Stomacher para la homogeneización de su contenido. Dcha. Contenido de la bolsa Stomacher tras la homogeneización

6.3 Análisis microbiológico

El aislamiento de microorganismos de las muestras de tomate cubitado y sopa oriental se llevó a cabo siguiendo esencialmente los métodos de ensayo aprobados por CNTA y que están basados en normas UNE-EN-ISO para la detección y recuentos en placa de cada tipo de microorganismo estudiado.

Así, se ha determinado el contenido de **microorganismos mesófilos aerobios** como indicadores de la calidad sanitaria del proceso y de las condiciones higiénicas de la materia prima y su manipulación, **mesófilos anaerobios**, **mohos y levaduras**, así como la persistencia de microorganismos **termófilos aerobios** y **anaerobios** a lo largo del proceso de producción con el objetivo de evidenciar la presencia de microflora termorresistente. Además, se ha analizado en el producto ácido el contenido en **mesófilos aerobios acidolácticos** responsables de alteración en estos productos. El control de estos microorganismos pretende buscar soluciones para evitar el deterioro de los alimentos derivada de la presencia de microorganismos alterantes que no son destruidos en los tratamientos térmicos de conservación (pasteurización o esterilización) y, que permanecen en los alimentos durante el almacenamiento. Estos datos resultan, por lo tanto, de gran interés para el desarrollo de herramientas de decisión sobre los tratamientos de conservación y su efecto sobre los microorganismos alterantes y la calidad de los productos.

6.3.1 Aerobios mesófilos

En este grupo se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno a una temperatura comprendida entre 20 °C y 45 ºC con una óptima entre 30 ºC y 40 ºC. El recuento de microorganismos aerobios mesófilos, en condiciones establecidas, estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos. Esta determinación refleja la calidad sanitaria de un alimento, las condiciones de manipulación, las condiciones higiénicas de la materia prima… Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de microflora patógena (Yousef and Carlstrom, 2006). El recuento de mesófilos nos indica las condiciones de salubridad de algunos alimentos.

Se siguió el procedimiento según la norma UNE-EN-ISO 4833-1:2013 con ligeras modificaciones. Tras la preparación de las muestras, se transfiere por medio de una pipeta estéril 1 ml de la muestra líquida (tanto de la solución madre como de las diluciones seriadas) en placas de agar triptona soja (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) enriquecido con un 0,6 % (p/v) de extracto de levadura (Biolife) (TSA-YE), previamente preparadas y se realizó un siembra en superficie. Las placas fueron incubadas en la estufa a 37 ± 2 °C durante 72 ± 3 h evitando que se agrupasen en exceso (no más de

5 placas apiladas). Las placas se mantuvieron (si procediera) en refrigeración durante 48 h después de la incubación antes de realizar el recuento.

Para el aislamiento de bacterias mesófilas acidolácticas se procedió de la misma manera a diferencia de que las placas utilizadas para su desarrollo y crecimiento fueron M.R.S. agar (Man, Rogosa y Sharpe) (Scharlau Chemie SA, Barcelona, España), medio selectivo para el desarrollo de este tipo de microorganismos.

6.3.2 Anaerobios mesófilos

Son útiles como indicadores de la existencia de condiciones favorables para la multiplicación de los organismos anaerobios productores de intoxicaciones alimentarias. En conservas indican una esterilización posiblemente insuficiente, o defecto de cierre. Los recuentos de anaerobios incluyen, por lo general no solamente las bacterias anaerobias obligadas sino también microorganismos anaerobios facultativos pertenecientes a las enterobacterias, estreptococos fecales y estafilococos.

Se llevó a cabo el método de ensayo aprobado por CNTA basado en normas internacionales para el examen microbiológico de alimentos (Splittstoesser and Vanderzant, 1992). Las muestras de 1 ml de solución madre y diluciones seriadas fueron sembradas en masa en placas de Agar Hígado (AH) (Bioser, Barcelona, España) y se incubaron en anaerobiosis en estufa a 37 ± 2 °C durante 48 ± 5 h evitando que se agrupasen en exceso (no más de 5 placas apiladas).

6.3.3 Mohos y levaduras

Los mohos y levaduras son microorganismos alterantes en la mayoría de los alimentos. El significado de la contaminación fúngica de los alimentos viene determinado por su capacidad para deteriorar los alimentos, produciendo defectos en el aspecto, modificaciones químicas, alterando el valor nutricional, variando sus características organolépticas y dificultando su conservación (Yousef and Carlstrom, 2006). Sin embargo, el recuento de mohos y levaduras se utiliza simplemente como parámetro indicador de alteración incipiente sin que pueda en absoluto considerarse relacionado con la presencia de micotoxinas, es un índice de las condiciones higiénicas de una materia prima y de las condiciones de manipulación. Su significado es similar al de aerobios mesófilos (Alonso Urmeneta, 2003).

Se siguió el procedimiento según la normas ISO 21527-1:2008 e ISO 21527-2:2008 con diversas modificaciones. Tras la preparación de las muestras, las placas DRBC (Scharlau Chemie SA, Barcelona, España) sembradas en superficie fueron incubadas en la estufa a 25 ± 1 °C durante 72 ± 3 h evitando que se agrupasen en exceso (no más de 5 placas apiladas). Las placas se mantuvieron (si procediera) en refrigeración durante 48 h después de la incubación antes de realizar el recuento.

6.3.4 Esporos termófilos aerobios y anaerobios

Las bacterias tienen muchas estrategias para sobrevivir al ambiente. Estas estrategias implican con frecuencia los cambios rápidos en la expresión de genes que alteran temporalmente el fenotipo de una célula y le permiten sobrevivir. Un ejemplo sofisticado de la respuesta al estrés es la formación de esporas, o esporulación, en el que el genoma bacteriano es conservado en un lugar seguro (la espora) hasta que mejoran las condiciones ambientales, y es entonces cuando la espora germina y vuelve al estado vegetativo rápidamente. Las endosporas se forman y nutren completamente dentro de una célula madre, la cual debe romper su membrana para liberar la espora al medio ambiente (McKenney et al., 2013). Los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina* y *Desulfotomaculum* son capaces de formar endoesporas y sobrevivir en los alimentos si los tratamientos térmicos aplicados no son los adecuados.

Se llevó a cabo el método de ensayo aprobado por CNTA basado en normas internacionales para el examen microbiológico de alimentos (Splittstoesser and Vanderzant, 1992). Para la preparación de las muestras, se recogieron 5 ml del producto homogeneizado (sopa oriental) ó de la suspensión madre (tomate) en tubos de vidrio estériles y se calentaron a baño María (Modelo IDL.AC12, Labolan, España) regulado a 98 ± 2 °C y controlado por termómetro calibrado durante 30 ± 1 minutos para la destrucción de las formas vegetativas. Posteriormente, las muestras fueron enfriadas rápidamente en hielo o bajo el grifo para eliminar el tratamiento aplicado. A continuación se depositó sobre una placa Petri estéril 1 ml de la muestra con pipeta Pasteur estéril. Se añadió a cada placa 20 o 25 ml de medio de cultivo PURagar (para esporos aerobios) (Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido) o de Agar Hígado (para esporos anaerobios) (Bioser, Barcelona, España), previamente licuado y atemperado a 47 ± 2 °C en baño termostático (Modelo IDL.AG20, Labolan, España). Seguidamente se mezcla el medio de cultivo y el inóculo en la placa de Petri sobre el lugar donde se va a solidificar, haciendo movimientos circulares con la placa, a favor y en contra de las agujas del reloj y en forma de cruz, evitando al mismo tiempo que se impregnara la tapa de la placa. Se dejó la mezcla de medio de cultivo e inóculo para que se solidificara sobre la superficie horizontal. Cuando se solidificó perfectamente el agar, se invirtieron las placas y se incubaron así en la estufa a 55 ± 2 ºC durante 48 ± 5 horas (esporos aerobios) o 72 ± 5 horas (esporos anaerobios) evitando que se agrupasen en exceso (no más de 5 placas apiladas) y que entraran en contacto con las paredes de la estufa. Una vez concluido el periodo de incubación, se examinaron las placas sobre un fondo oscuro, en busca de la presencia o ausencia de colonias de aerobios o anaerobios.

6.3.5 Recuento de microorganismos

Se siguió el procedimiento descrito en la norma ISO 7218:2007.

6.4 Técnicas moleculares

La aplicación de las siguientes técnicas moleculares permite la identificación bacteriana de esporos termófilos termorresistentes aislados en las pruebas anteriores mediante la amplificación del gen que codifica el RNAr 16S y su posterior secuenciación.

Así, para tomate cubitado se modificaron las características intrínsecas del producto (variaciones de pH) en un pH-metro de laboratorio (modelo GLP 21, Crison Instruments S.A., Barcelona, España) con el objetivo de poder aislar e identificar microflora resistente debido a la baja incidencia de este tipo de microorganismos.

6.4.1 Amplificación por PCR a partir de una suspensión bateriana

Como DNA molde para las reacciones de amplificación por PCR se utilizaron lisados bacterianos preparados de la siguiente manera: en 300 µl de agua Miliq estéril se resuspendió una porción de cultivo bacteriano crecido en placa y la suspensión se mantuvo 10 minutos a 100ºC. Los lisados se centrifugaron 10 minutos a máxima velocidad en una microcentrífuga de sobremesa para precipitar restos celulares, y el sobrenadante se transfirió a un microtubo estéril y se mantuvieron a -20 ºC para su almacenamiento a largo plazo. Para las reacciones de PCR se utilizaron 5 µl de estos lisados. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando 5 µl de DNA molde en un volumen final de 25 µl conteniendo 1X NH4 Reaction Buffer (sin MgCl2) (Bioline, UK), 1,5 mM MgCl2, 0,8 mM dNTPs (Master Mix Bioline), 0,5µM de cada cebador por reacción, 0,5 unidades de Taq polimerasa (Biotaq DNA Polymerase Mix Bioline). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) y consistieron en la desnaturalización de DNA a 94 ºC durante 10 minutos, seguidos de 30 ciclos de: 94 ºC durante 45 segundos, 57 ºC durante 30 segundos y 72 ºC durante 1,5 minutos. El proceso de amplificación se terminó con un ciclo de extensión a 72 ºC durante 7 minutos. En todas las reacciones se utilizaron lisados celulares de cepas apropiadas como control positivo y reacciones con agua en vez del lisado bacteriano, como control negativo.

6.4.2 Separación de DNA por electroforesis

Las muestras de DNA se separaron rutinariamente en geles de agarosa al 1%, sumergidos en 1X TAE (Sambrook et al., 1989) usado como tampón de electroforesis. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de a 100V durante 30 minutos respectivamente a temperatura ambiente. Una vez acabada la electroforesis, se tiñeron los geles en una solución acuosa de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) durante 10-15 min. Seguidamente los geles se analizaron después de realizarles una fotografía en el transiluminador de luz ultravioleta (ChemiDoc, BIO-RAD). Como marcador de peso

molecular se usó el “1 kb Ladder” (12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1.5, 1, 0.75, 0.5 y 0.25 kb) (Stratagene).

6.4.3 Purificación y secuenciación

Una vez verificada la correcta amplificación de las secuencias, se procedió a la purificación de los amplicones para eliminar el DNA genómico, enzimas, cebadores y dNTPs sobrantes. Para ello se utilizó un kit comercial de purificación por columna de sílice (Metabion) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los amplicones correspondientes se secuenciaron por una empresa externa especializada utilizando los cebadores 16Sf-1 y 16 Sr-515. Las secuencias resultantes se compararon con las bases de datos utilizando los algoritmos Blast (Altschul et al., 1997).

6.5 Esporulación

De forma general, los esporos de los aislados termorresistentes se obtuvieron inoculando alícuotas de 100 µl de los cultivos frescos en fase estacionaria en placas de agar TSA-YE. Los medios se suplementaron con 10 mg/l de $MnSO_4$ (Sigma Aldrich Química, Madrid, España) para sincronizar la esporulación. Las placas se incubaron en aerobiosis, durante 10-15 días, a 30-37 ºC (mesófilos) ó 55 ºC (termófilos). La evolución de las suspensiones se controló mediante microscopía de contraste de fases (50i Eclipse, Nikon Corporation, Japón) usando como referencia la refringencia de las formas esporuladas y estimando el número de esporos por contaje en cámara de Thoma (Neubauer, Brand, Alemania). Cuando se alcanzaron rendimientos de esporulación cercanos al 95 %, los esporos se recuperaron de la superficie de las placas mediante la adición de 20 ml de agua destilada estéril y perlas de vidrio, que arrastraron el crecimiento de las placas. El contenido final se filtró a través de una gasa estéril para impedir el paso de las perlas de vidrio y de restos de agar. Una vez recuperados los esporos, las suspensiones se lavaron (x4) mediante centrifugaciones sucesivas (5,000 g/15 min/5 ºC) y resuspensión con agua destilada estéril. Entre el segundo y tercer lavado las suspensiones se sometieron a una pasteurización a 80 ºC durante 15 minutos, para inactivar las células vegetativas y, a un tratamiento de ultrasonidos (modelo S 40H, Elmasonic, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Alemania) de 10 minutos/37 KHz para dispersar los posibles agregados. La presencia de agregados da lugar a la aparición de “colas” en las gráficas de supervivencia (Cerf, 1977). El pellet de la última centrifugación se mezcló con la cantidad necesaria de agua destilada estéril para alcanzar concentraciones similares a 10^8 esporos/ml.

6.6 Ensayos de inactivación por tratamiento térmico

Las determinaciones de resistencia al calor se realizaron en un termoresistómetro TR-SC (Condón et al., 1989) adaptado para la aplicación de rampas de calentamiento en condiciones controladas (Conesa et al., 2009). Como se puede observar en el esquema (Figura 4) y en la fotografía (Figura 5) este equipo consta de una cámara cilíndrica de tratamiento de acero inoxidable y 400 ml de capacidad, cerrada por la parte superior con una tapa enroscable, también de acero inoxidable. Unidos a la tapa se hallan la resistencia eléctrica (utilizada para el calentamiento del medio), el sistema de agitación, el sistema de extracción de muestras (controlado mediante una válvula solenoide), una sonda termopar, un deflector (para mejorar la turbulencia) y el sistema de presurización.

El equipo también posee un dispositivo para la inoculación del cultivo (cerrado con un septum de cromatografía), situado en la parte inferior de la cámara. Durante las determinaciones la presión y la temperatura se controlan, respectivamente, con un manoreductor y un circuito electrónico conectado a la sonda termopar sumergida en el vaso de tratamiento (sonda mod. Thermometer 639K, Crison). El mismo sistema electrónico controla la apertura de la válvula solenoide, permitiendo la recogida de muestras del interior del termoresistómetro.

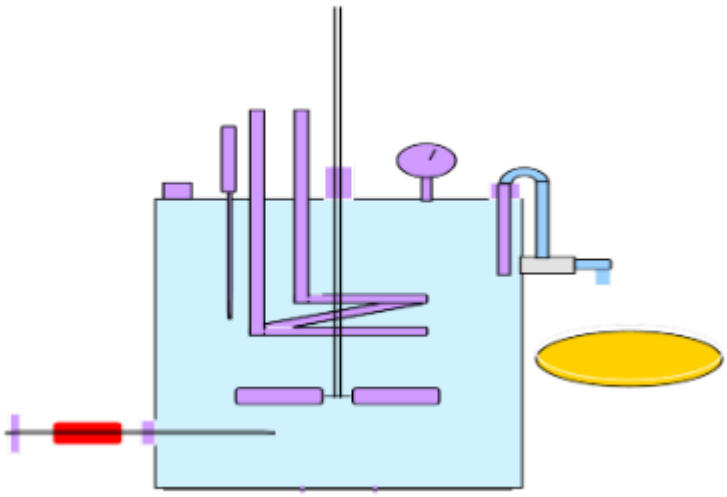

Figura 4. Esquema del termoresistómetro TR-SC

Antes y después de cada sesión de trabajo se esterilizaban (5 minutos; 130ºC) tanto el equipo como el medio de tratamiento. Una vez estabilizada la temperatura de tratamiento, se inyectaban 0,2 ml de la suspensión microbiana con una jeringuilla (CR-700-200 Hamilton Co., Reno, Nevada, E.E.U.U.) previamente desinfectada y, a intervalos predeterminados de tiempo, se extraían muestras de 0,2 ml a tubos eppendorfs estériles de 1 ml que se introdujeron rápidamente en hielo para evitar que el tratamiento térmico siguiese actuando sobre las células no dañadas. Las muestras extraídas del

termorresistómetro se sembraron en superficie en el medio de recuperación seleccionado TSA-YE. Estas placas se incubaron durante 24 h a 37 ºC en estufas de cultivo microbiológico. Tras la incubación se procedió al recuento de supervivientes.

Figura 5. Termoresistómetro utilizado para las determinaciones de resistencia de calor

También se seleccionaron cepas de los microorganismos aislados que CNTA dispone en su cepario y cuya resistencia a tratamientos térmicos y no térmicos está demostrada en otros proyectos realizados por CNTA, con el objetivo de comparar la resistencia entre estas cepas y las aisladas en el producto objeto de estudio.

Para la realización de estos ensayos se siguieron una serie de etapas previas a los estudios de resistencia que se detallan a continuación:

a) Determinación de la **cepa microbiana más resistente** (aisladas vs colección) en condiciones óptimas de crecimiento y esporulación. De esta manera se buscaba contar con el microorganismo más resistente para establecer el peor escenario posible que permitiera establecer las condiciones óptimas de tratamiento térmico.

b) Determinación de las **condiciones de esporulación de máxima resistencia (pH y temperatura)** de la cepa seleccionada anteriormente.

c) Influencia de las **etapas previas de acondicionamiento** antes del tratamiento térmico en la resistencia microbiana.

d) Estudios de **termorresistencia** en las condiciones seleccionadas anteriormente. Estos estudios se realizaron con producto suministrado por la empresa en las condiciones seleccionadas en las etapas anteriores usando el equipo de termorresistencia con el que cuenta CNTA. Se evaluaron distintas temperaturas y tiempos de tratamiento para la obtención de las gráficas de supervivencia y, a partir de las mismas los correspondientes valores D, el valor z y el valor de letalidad F_0.

6.7 Tratamiento estadístico de los datos

Con los resultados obtenidos de la caracterización microbiana se realizó un análisis estadístico (análisis de la varianza, ANOVA y comparación de medidas mediante la Prueba de Rangos Múltiples) para determinar si había o no diferencias significativas con un nivel de confianza adoptado (95 % de confianza) de una variable dependiente cuantitativa. Es decir, determinar la influencia de un factor cualitativo (puntos del proceso de elaboración de los productos) en una variable dependiente cuantitativa (recuento de microorganismos). Los resultados mostrados en las tablas contenidas en el siguiente apartado indican los datos medios de los recuentos expresados en log ufc/g ± desviación estándar más letra de significancia.

Se realizó empleando el programa estadístico Statgraphics Centurion, de la compañía Statpoint Technologies, Inc.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados técnicos más relevantes obtenidos:

7.1 Tomate cubitado

En el caso de tomate cubitado se realizó el muestreo en distintos puntos a lo largo del proceso de fabricación industrial de este producto sobre 9 lotes. En cada lote, se analizaban muestras de materia prima sin tratamiento y, muestras tratadas térmicamente donde se modificaba el pH. Además, se analizó el contenido microbiológico a lo largo de las etapas de procesado industrial previas al tratamiento térmico (lavado, pelado y cubitado) y, se analizaron muestras alteradas enviadas por la empresa.

Los resultados que se muestran a continuación se dividen teniendo en cuenta la etapa del proceso donde se han realizado:

7.1.1 Caracterización microbiológica en las etapas previas al tratamiento térmico

Las Figuras 6, 7 y 8 resumen los resultados microbiológicos obtenidos en tomate cubitado en las etapas comprendidas entre la recepción de la materia prima y el cubitado, previamente al tratamiento térmico.

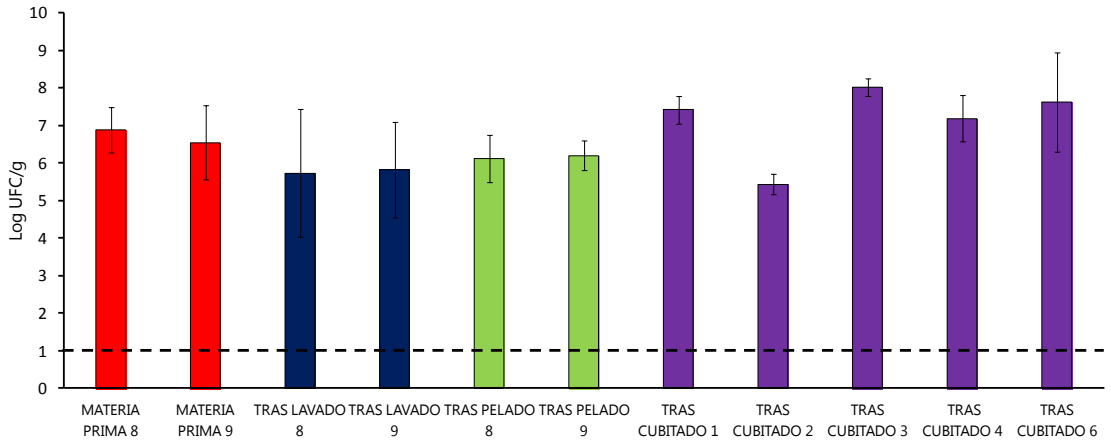

Figura 6. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios a lo largo del procesado industrial de tomate cubitado. Línea negra discontinua: límite de detección (<1 log ufc/g)

El recuento inicial en la materia prima de **aerobios mesófilos (Figura 6)** presentó valores próximos a 6-7 log ufc/g a su llegada a la fábrica. Son resultados acordes a los publicados por algunos autores señalando que los altos recuentos de microorganismos aerobios mesófilos, superiores a 10^6 ufc/g indican una fuerte contaminación de la materia prima y que el proceso de desinfección y/o que las condiciones de almacenaje (humedad

y temperatura) no eran las adecuadas para el tipo de producto (Pascual and Calderón, 2000, Beltrán et al., 2005).

Las operaciones posteriores y previas al tratamiento térmico no tuvieron un efecto significativo en la disminución de la carga microbiana de estos microorganismos (Tabla 1). Tras el lavado del tomate se produjo una disminución no significativa con respecto a la carga microbiana inicial en torno a 1 log ufc/g. Estos resultados son acordes con otros trabajos publicados que mostraron que tras el lavado de frutas, verduras y productos mínimamente procesados se produjo una reducción microbiana de 0,74-1,73 log ufc/g (Erturk and Picha, 2006), 1,14 log ufc/g (Beltrán et al., 2005) ó 0,55-1,21 log ufc/g (Sun et al., 2012) para diferentes condiciones de tratamiento con respecto a la carga microbiana inicial.

Una de las etapas críticas del proceso es el pelado físico que puede incrementar la temperatura del producto y favorecer el crecimiento microbiano (Ramos et al., 2013), pero tal y como se muestra en la figura 6, se produjo un incremento no significativo en los recuentos microbiológicos obtenidos en dicha etapa. En último caso y tras el cubitado del tomate, sí que se observaron ligeros aumentos en los recuentos, aunque éstos no fueron estadísticamente significativos, con respecto a la etapa anterior.

Tabla 1. Caracterización microbiana en cada punto del proceso de fabricación industrial del tomate cubitado

	Aerobios mesófilos	**Anaerobios mesófilos**	**Aerobios Acidolácticos**
Carga inicial materia prima	6,7 ± 0,8 ab	5,8 ± 1,0 ab	6,0 ± 0,7 b
Tras lavado	5,8 ± 1,3 b	5,2 ± 0,9 b	4,8 ± 0,6 b
Tras pelado	6,8 ± 0,5 ab	5,0 ± 0,9 b	5,7 ± 0,3 b
Tras cubitado	7,6 ± 1,4 a	7,5 ± 1,6 a	9,7 ± 2,1 a

Se muestran en la tabla las medias expresadas en log ufc/g ± desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

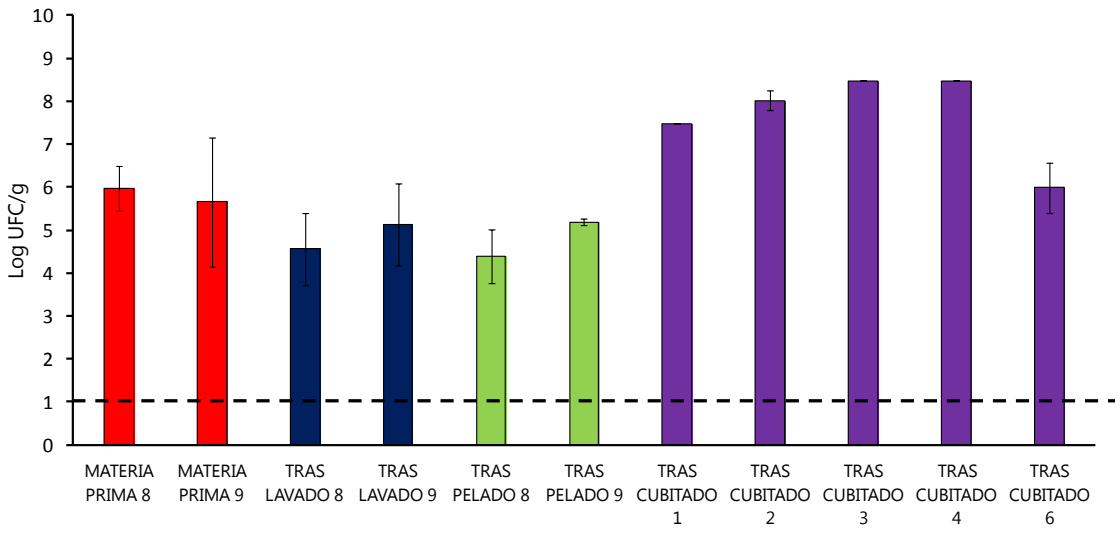

Figura 7. Recuento de microorganismos mesófilos anaerobios a lo largo del procesado industrial de tomate cubitado. Línea negra discontinua: límite de detección (<1 log ufc/g)

Los recuentos obtenidos en cuánto a **anaerobios mesófilos (Figura 7)** fueron ligeramente inferiores a los mostrados en mesófilos aerobios desde la materia prima (próximos a 5-6 log ufc/g). Altos recuentos de los anaerobios mesófilos en la materia prima como obtenemos en nuestros recuentos nos informan de que las bacterias en descomposición son capaces de fermentar y dar sabores desagradables (Pascual and Calderón, 2000, Beltrán et al., 2005).

Se produjo una reducción no significativa en torno a 1 log ufc/g durante el proceso de lavado (Tabla 1), al igual que en el trabajo publicado por (Beltrán et al., 2005) que mostraba una reducción tras el lavado de patatas de 0,7 log ufc/g en unas condiciones de tratamiento, ó de 0,6 log ufc/g para otras condiciones de tratamiento diferentes con respecto a la carga microbiana inicial.

Tras el pelado, los recuentos de anaerobios mesófilos se mantuvieron igual que tras el lavado (no hubo incremento significativo). Por último, las operaciones llevadas a cabo en el cubitado mostraron un incremento significativo en torno a 3 log ufc/g, poniendo de manifiesto que esta etapa pueda ser una fuente de contaminación en el producto.

Además, se evaluó el recuento de **mesófilos aerobios acidolácticos (Figura 8)**. Este grupo microbiano es de especial interés en este producto ya que son capaces de sobrevivir en ambientes ácidos o de baja acidez y constituyen un riesgo de alteración. En cuanto a los resultados obtenidos cabe destacar que los niveles en materia prima fueron próximos a 6 ciclos logarítmicos, observándose de nuevo un incremento significativo en los recuentos de este grupo tras la etapa de cubitado y, poniendo de manifiesto de nuevo la importancia de esta etapa en la contaminación del producto (Tabla 1).

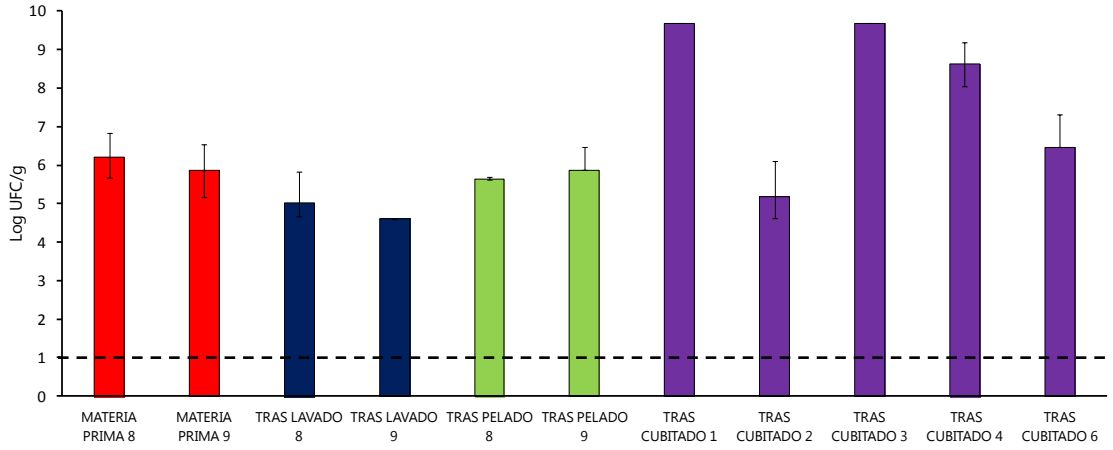

Figura 8. Recuento de microorganismos mesófilos aerobios acidolácticos a lo largo del procesado industrial de tomate cubitado. Línea negra discontinua: límite de detección (<1 log ufc/g)

Finalmente, se analizó la concentración de dos grupos microbianos de mucho interés en estos productos como son los **termófilos aerobios y anaerobios**, que son aquéllos capaces de desarrollarse a temperaturas por encima de los 45 ºC. Estos microorganismos son capaces de sobrevivir a los tratamientos térmicos habitualmente aplicados en la industria alimentaria y, en condiciones adecuadas de temperatura son capaces de crecer y alterar el producto. En cuanto a los resultados obtenidos en los termófilos aerobios, cabe destacar que los niveles en materia prima fueron inferiores a los obtenidos en el resto de grupos evaluados (3 log ufc/g) y, estos recuentos fueron similares o por debajo del límite de detección a lo largo de las distintas etapas de proceso. En el caso de los termófilos anaerobios, los recuentos estuvieron por debajo del límite de detección durante el proceso, algo que es lógico puesto que estos esporos son menos estables y más sensibles a los cambios de temperatura.

7.1.2 Aislamiento de microflora microbiana resistente tras el tratamiento térmico

Sobre los 9 lotes de producto elaborados en días distintos de producción, se realizaron estudios de estabilidad e investigación de conserva ácida. Para estos estudios, el producto se formuló al pH habitual de la empresa (3,8-4,0) y, a dos pHs superiores para favorecer la resistencia y crecimiento microbiano (pHs 4,1-4,2 y 4,2-4,3) y, en todos los casos se aplicó el mismo tratamiento térmico habitualmente utilizado por la empresa (98 ºC – 75 min). A partir de las colonias supervivientes y crecidas en placa, se procedió a aislar e identificar el/los microorganismo/s responsable/s. Además, la empresa suministró latones alterados de uno de los lotes sobre los cuales se realizaron también estos estudios.

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos en los estudios de aislamiento e identificación en los lotes evaluados. Se muestran sólo los lotes donde hubo crecimiento y se pudo aislar e identificar el microorganismo responsable. En el resto de lotes, los

envases fueron estables microbiológicamente a los distintos pHs evaluados y no se obtuvieron recuentos de los microorganismos evaluados. Tras los análisis correspondientes (PCR y secuenciación) se aisló e identificó un microorganismo en tomate cubitado: ***Alicyclobacillus acidocaldarius***.

Tabla 2. Resultados de las pruebas de aislamiento e identificación en lotes de tomate cubitado suministrados por la empresa

Lote	Tratamiento térmico	pH producto	Microorganismo identificado
Alterado	98 ºC – 75 min	pH 3,8-4,0 (habitual)	***Alicyclobacillus acidocaldarius***
6	98 ºC – 75 min	pH (1) 4,1-4,2	***Alicyclobacillus acidocaldarius***

7.1.3 Ensayos de inactivación por tratamiento térmico

Una vez realizados los muestreos y aislado e identificado el microorganismo de interés, se procedió a realizar los estudios de inactivación por tratamiento térmico en cada uno de ellos siguiendo los pasos descritos anteriormente en la metodología para estos ensayos.

De esta manera, se muestran los resultados obtenidos en tomate cubitado para el microorganismo identificado.

7.1.4 Resultados en *Alicyclobacillus acidocaldarius*

Se describen a continuación los resultados obtenidos en cada etapa evaluada del proceso:

7.1.4.1 Determinación de la cepa más resistente

Para estos estudios, se comparó la resistencia a distintos tratamientos térmicos de la cepa de *A. acidocaldarius* aislada de tomate cubitado (renombrada cepa 690) y de otras dos cepas obtenidas del cepario de CNTA (cepa 48 y cepa 695) y, cuya resistencia ya ha sido demostrada en otros proyectos por CNTA. Estos estudios se realizaron siempre utilizando tomate cubitado formulado con el pH habitual del producto. Las cepas fueron esporuladas a 55 ºC. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9.

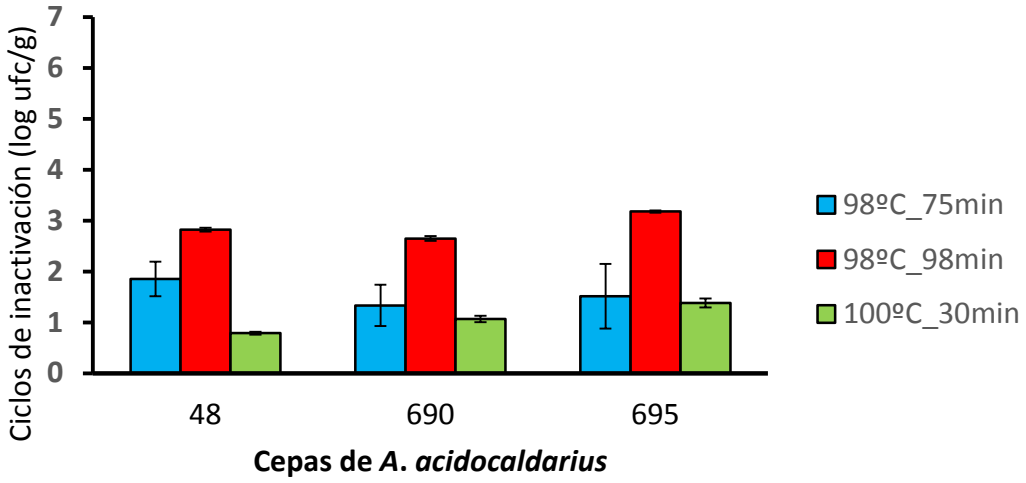

Figura 9. Ciclos de inactivación de distintas cepas de A. acidocaldarius en tomate cubitado sometido a distintos tratamientos térmicos. Cepas 48 y 695 pertenecen al cepario de CNTA. Cepa 690 aislada del tomate cubitado

Como se observa en la Figura 9 y se resume en la Tabla 3, la resistencia mostrada por las distintas cepas en los distintos tratamientos térmicos es diferente estadísticamente para algunos casos. Cuanto más elevado es el número de ciclos de inactivación (Figura 9, Tabla 2), la resistencia de la cepa al tratamiento es menor, es decir, más células ha matado.

En el tratamiento 98 ºC – 75 min todas las cepas mostraron una resistencia no significativa estadísticamente. En el tratamiento 98 ºC – 98 min, la cepa 690 mostró una mayor resistencia significativa que la cepa 695 y una resistencia similar (sin diferencias significativas) que la cepa 48. Por último, en el tratamiento 100 ºC – 30 min, la cepa 48 mostró una mayor resistencia estadísticamente significativa que la otra cepa del cepario de CNTA e igual resistencia (sin diferencias significativas) que la cepa 690 aislada de tomate.

Por tanto, las cepas 690 y 48 mostraron una mayor resistencia que la cepa 695 para los dos tratamientos planteados y así se decidió elegir la cepa 690 para continuar con los estudios posteriores teniendo en cuenta que esta cepa era la obtenida en producto de la empresa.

Tabla 3. Ciclos de inactivación de las cepas de estudio a los tratamientos térmicos

	98 °C - 75 min	98 °C - 98 min	100 °C - 30 min

Cepa 48 (CNTA)	1,9 ± 0,4 a	2,8 ± 0,2 ab	0,8 ± 0,1 b
Cepa 690 (LOTE)	1,3 ± 0,5 a	2,6 ± 0,2 b	1,1 ± 0,2 ab
Cepa 695 (CNTA)	1,5 ± 0,8 a	3,2 ± 0,2 a	1,4 ± 0,2 a

Se muestran en la tabla las medias expresadas en log ufc/g ± desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

7.1.4.2 Determinación de las condiciones de esporulación de máxima resistencia

Está ampliamente descrito en bibliografía que las condiciones de esporulación pueden tener una influencia marcada en la resistencia posterior de los microorganismos a los tratamientos de conservación. Por ejemplo, el pH de esporulación del medio puede tener un efecto en la inactivación inducida por calor. Oh and Moon, 2003 demostraron cómo esporas de *Bacillus cereus* esporuladas a pH 6,0 eran más resistentes al calor que las esporuladas a pH 8,0. Del mismo modo, la temperatura de esporulación juega un papel importante en la resistencia microbiana. Lenz and Vogel, 2015 describieron cómo la resistencia era mayor en microorganismos esporulados a temperaturas por encima de la óptima.

Por ello, se evaluó el efecto del pH (4,0 y 4,25) y de la temperatura (45 y 55 ºC) de esporulación en la resistencia de *A. acidocaldarius* a un tratamiento de 98 ºC durante 75 min en tomate cubitado.

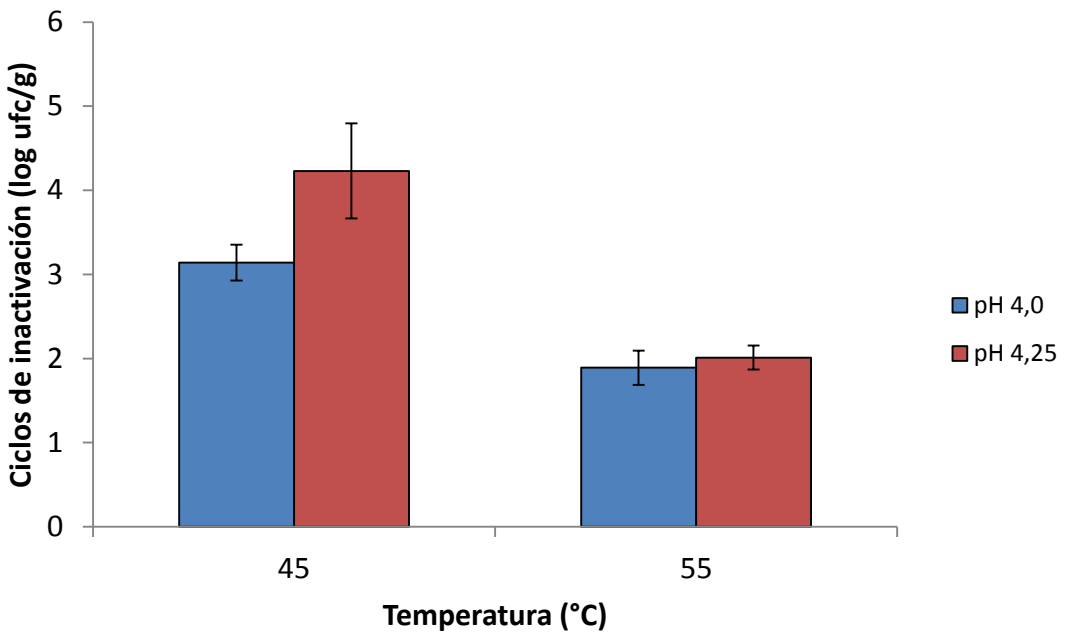

Figura 10. Influencia del pH y la temperatura de esporulación en la resistencia al calor de *A. acidocaldarius* aislada de tomate cubitado

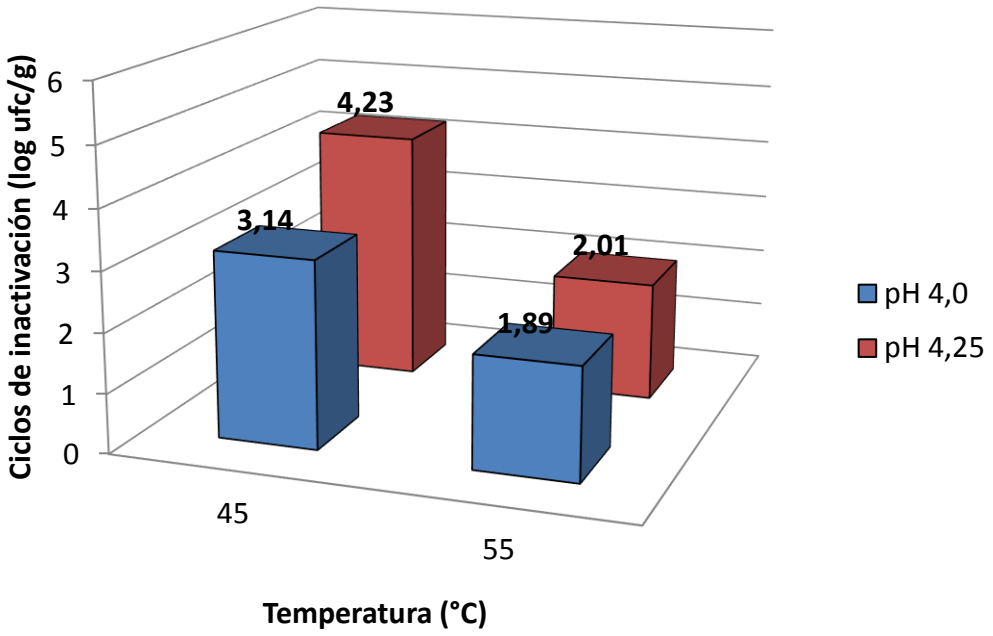

Figura 11. Influencia del pH y la temperatura de esporulación en la resistencia al calor de *A. acidocaldarius* aislada de tomate cubitado (perspectiva 3D)

Tabla 4. Condiciones de inactivación y recuentos de las cepas de estudio a las condiciones de esporulación planteadas

pH 4,0 _ 55 °C	1,9 ± 0,2 c
pH 4,0 _ 45 °C	3,1 ± 0,2 b
pH 4,25 _ 55 °C	2,0 ± 0,1 c
pH 4,25 _ 45 °C	4,2 ± 0,6 a

Se muestran en la tabla las medias expresadas en log ufc/g ± desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Como se observa en las Figura 10 y 11 y se muestra en la Tabla 4, la resistencia al tratamiento térmico fue mayor estadísticamente significativa cuando el microorganismo se esporuló a una temperatura mayor (55 ºC) e independiente del pH de estudio (ácidos en ambos casos), resultados acordes a los descritos anteriormente. De esta manera, éstas fueron las condiciones seleccionadas para la esporulación de este microorganismo en condiciones de máxima resistencia.

7.1.4.3 Influencia de las etapas previas de acondicionado antes del tratamiento térmico

A lo largo del procesado industrial de tomate cubitado, hay dos etapas donde el producto sufre unos incrementos de temperatura durante un tiempo que podrían ser adecuados para la proliferación microbiana y, por lo tanto, derivar en una mayor resistencia al tratamiento térmico. Con el objetivo de evaluar si la resistencia de este microorganismo presentaba diferencias, el tomate cubitado inoculado se trató directamente a 98 ºC durante 75 minutos, mientras que otras muestras inoculadas fueron acondicionadas previamente en dos etapas:

- Primera etapa: 45 ºC – 60 min
- Segunda etapa: 55 ºC – 30 min

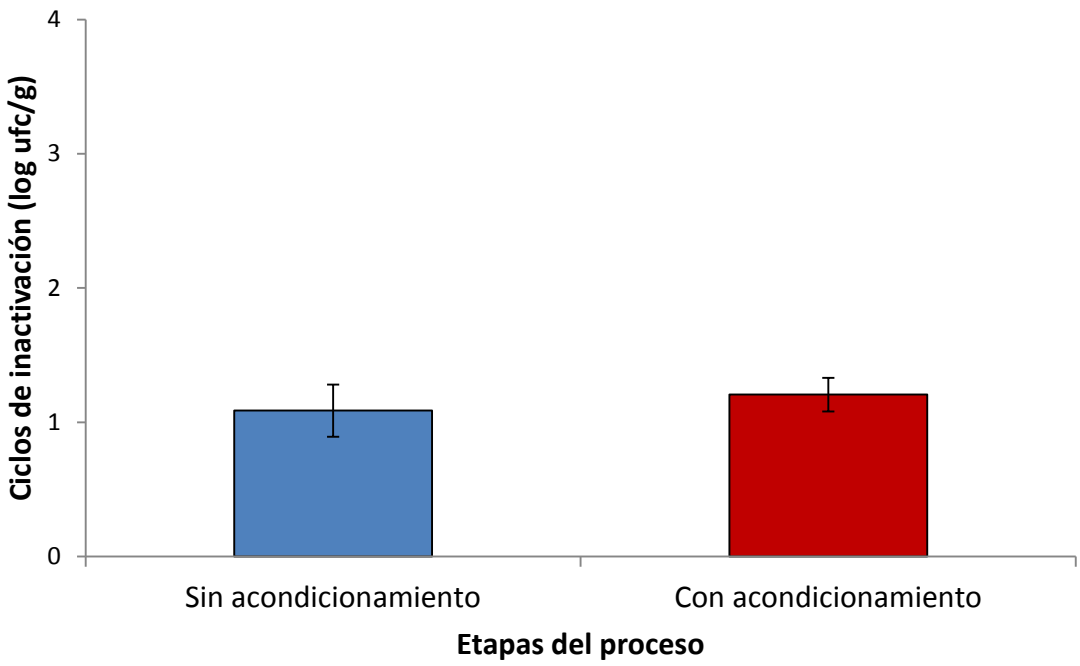

Figura 12. Ciclos de inactivación de esporos de *A. acidocaldarius* con o sin etapas de acondicionamiento tras un tratamiento térmico a 98 ºC durante 75 minutos. Se indican los valores medios ± desviación estándar

Como se puede observar en la Figura 12, el nivel de inactivación obtenido tras el tratamiento térmico de esporos acondicionados previamente o sin etapas de acondicionado fue similar estadísticamente (sin diferencias significativas), con lo que se puede concluir que la resistencia microbiana no se vio influenciada por estas etapas a lo largo del procesado industrial.

7.1.4.4 Estudios de termorresistencia en las condiciones seleccionadas

Finalmente, se llevaron a cabo estudios de inactivación por calor a distintas temperaturas (99, 102, 105 y 110 ºC) de *A. acidocaldarius* en tomate teniendo en cuenta las condiciones seleccionadas en las etapas anteriores.

Las curvas de supervivencia obtenidas a las distintas temperaturas evaluadas se muestran en la Figura 13. A partir de las gráficas de supervivencia se han establecido las cinéticas de muerte y de daño celular y calculado los parámetros de termorresistencia.

Dado que las curvas obtenidas “fueron” lineales, las gráficas de supervivencia pudieron ajustarse a la ecuación matemática clásica para la descripción de cinéticas de inactivación de primer orden:

$$log\frac{N_t}{N_0} = -\frac{t}{D}$$

donde t es el tiempo de tratamiento (minutos) y D es el tiempo de reducción decimal o tiempo necesario (minutos) para lograr una reducción logarítmica de la población microbiana. El valor D se calculó partir de la inversa de la pendiente de la recta de regresión lineal.

La Figura 12 muestra la gráfica de supervivencia de *A. acidocaldarius* tratada a 99, 102, 105 y 120 ºC en tomate cubitado tras la recuperación de los supervivientes en el medio TSA-YE. Cada punto en la figura representa la media de tres determinaciones realizadas con suspensiones diferentes en días distintos. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

En algunas ocasiones se produjeron desviaciones de la linealidad, en forma de perfiles sigmoideos y en otras, de hombros. Los perfiles sigmoideos suelen asociarse a fenómenos de adaptación microbiana al estrés durante el propio tratamiento; mientras que los hombros suelen achacarse a fenómenos de daño y recuperación celular. Según algunos autores, durante los primeros momentos del calentamiento los daños infringidos a la célula son fácilmente reparables por lo que el número de supervivientes disminuye lentamente; sin embargo, a medida que se prolonga el tratamiento se supera la capacidad de reparación celular y empieza el curso exponencial de inactivación (Gould, 1989, Mackey and Derrick, 1982). Sin embargo, en nuestras gráficas, estos perfiles no parecían estar relacionados con unas condiciones concretas de tratamiento o recuperación, ni eran especialmente marcados por lo que se decidió, para un análisis más simple de los datos, ajustarlas con el modelo cinético tradicional, asumiendo un curso de inactivación exponencial.

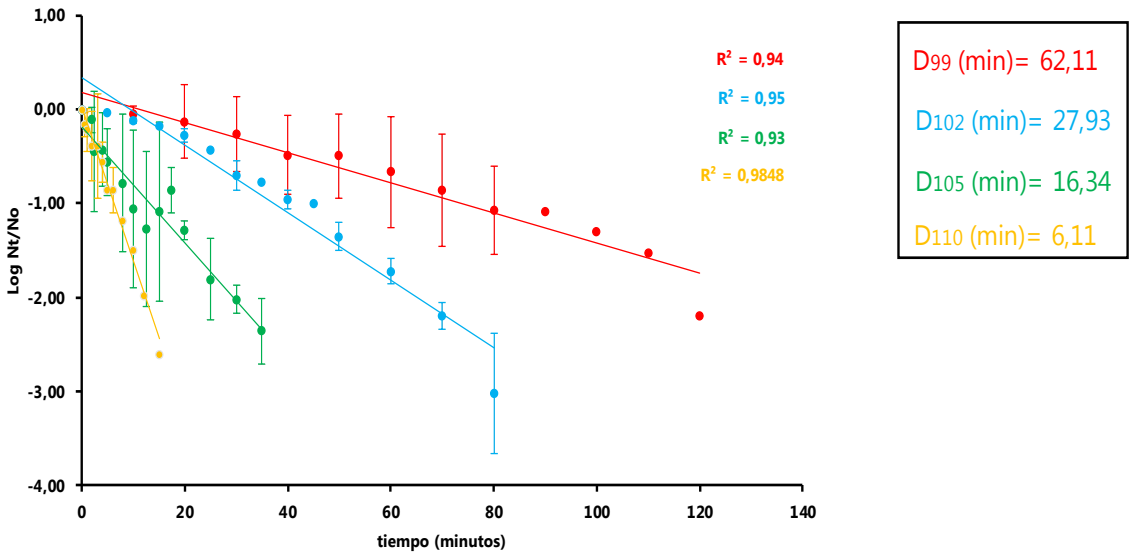

Figura 13. Gráficas de supervivencia de esporos de *A. acidocaldarius* sometidos a distintos tratamientos térmicos. Las gráficas de supervivencia se ajustaron asumiendo una cinética exponencial

A partir del ajuste de las curvas de supervivencia se obtuvieron los parámetros de resistencia del microorganismo en las diferentes condiciones experimentales. Los datos se presentan en la Tabla 5. En la tabla, además del valor D estimado para cada tratamiento se incluye el coeficiente de determinación (R^2) de las regresiones, para ilustrar la bondad de ajuste. En el peor de los casos se obtuvo un R^2 de 0,93.

Tabla 5. Tiempos de reducción decimal a distintas temperaturas de A. acidocaldarius

Tª tratamiento	valor D	R^2
99 °C	62,11	0,94
102 °C	27,93	0,95
105 °C	16,34	0,93
110 °C	6,11	0,98

Como era de esperar, los valores D obtenidos fueron menores cuanto mayor era la temperatura de tratamiento, demostrando así, la gran resistencia de este microorganismo a las temperaturas evaluadas y, poniendo de manifiesto que el tratamiento térmico aplicado por la empresa a 98 ºC es insuficiente para la total inactivación de este microorganismo.

Finalmente, a partir de los valores D obtenidos anteriormente, se construyó la correspondiente gráfica de termodestrucción (Figura 14), representando los logaritmos de los tiempos de reducción decimal frente a las temperaturas de tratamiento y, a partir de ellas, se calculó el valor z.

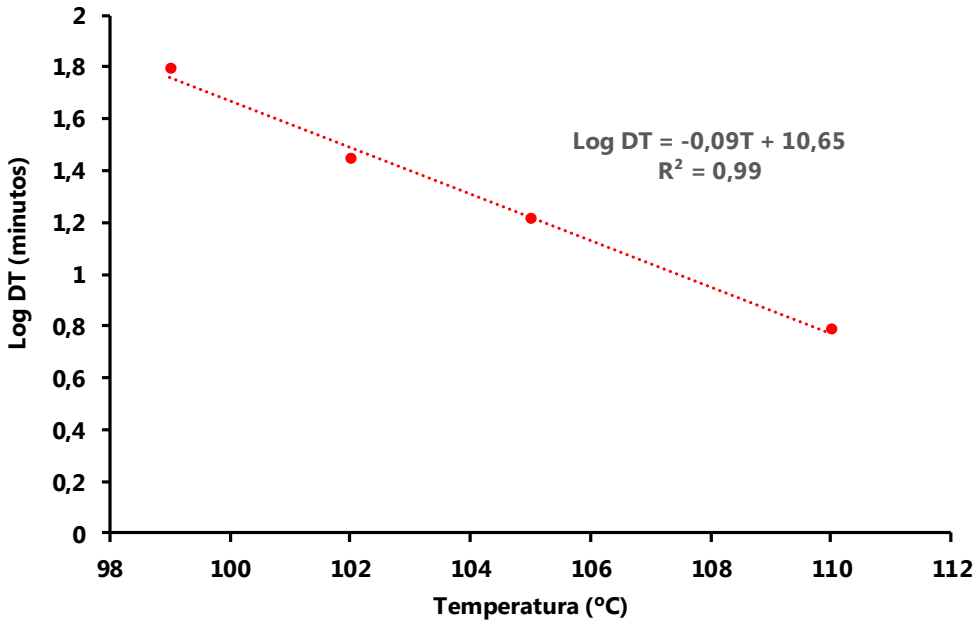

Figura 14. Gráfica de termodestrucción de esporos de *A. acidocaldarius* en tomate cubitado

El valor z de *A. acidocaldarius* resultó ser, en estas condiciones de tratamiento y recuperación de supervivientes (TSA-YE) de 6 ºC.

Conocidos los valores D y z, hallamos el valor de letalidad F_0, mediante el uso de las expresiones matemáticas de z y F_0:

$$Z = \frac{T_1 - T_2}{logD_2 - logD_1}$$

Conocidos Z, T_1, T_2 y D_2, despejamos de la fórmula $D_{121ºC}$

$$6{,}12 = \frac{121 - 111}{log6{,}11 - logD_{121}}$$

Siendo $D_{121ºC}$ = 0,14 min

Ahora podemos hallar de la siguiente fórmula el valor de letalidad F_0, siendo $(\log N_0 - \log N) = 12$

$$F_0 = D_{121°C} (\log N_0 - \log N)$$

$$F_0 = 0{,}14 \text{ x } 12 = 1{,}70 \text{ min}$$

El valor F_0 hallado es una primera aproximación para poder llegar en su momento a ajustar u optimizar el tratamiento térmico que se le da al tomate y que por tanto, no haya problemas de la aparición de este tipo de microorganismo alterante durante toda la vida útil del producto.

7.2 Sopa oriental:

En el caso de sopa oriental se realizó el muestreo en distintos puntos críticos a lo largo del proceso de elaboración de este producto. Se analizó el contenido microbiológico tanto de la materia prima inicial (mix vegetales congelados más pasta seca) como de las etapas de procesado industrial previas al tratamiento térmico (post-cocción, y post-envasado). También se analizó la influencia del tiempo de retención en esos puntos críticos (0,5 y 1 h tras la cocción y 1 y 2 h tras el envasado) sobre la carga microbiológica y la influencia del momento de la realización de los muestreos (primera y última carga).

Los resultados que se muestran a continuación se dividen teniendo en cuenta la etapa del proceso donde se han realizado:

7.2.1 Caracterización microbiológica en las etapas previas al tratamiento térmico

7.2.1.1 POST-COCCIÓN (KORUMA)

Las Figuras 15 (primera carga) y 16 (última carga) resumen los resultados microbiológicos obtenidos en sopa oriental en la etapa post-cocción, previa al envasado. La cocción se realizó a 80 ºC durante 5 minutos. Cabe destacar que en este punto crítico, los ingredientes vegetales aún no han sido añadidos. Estos se añaden con posterioridad, antes del envasado.

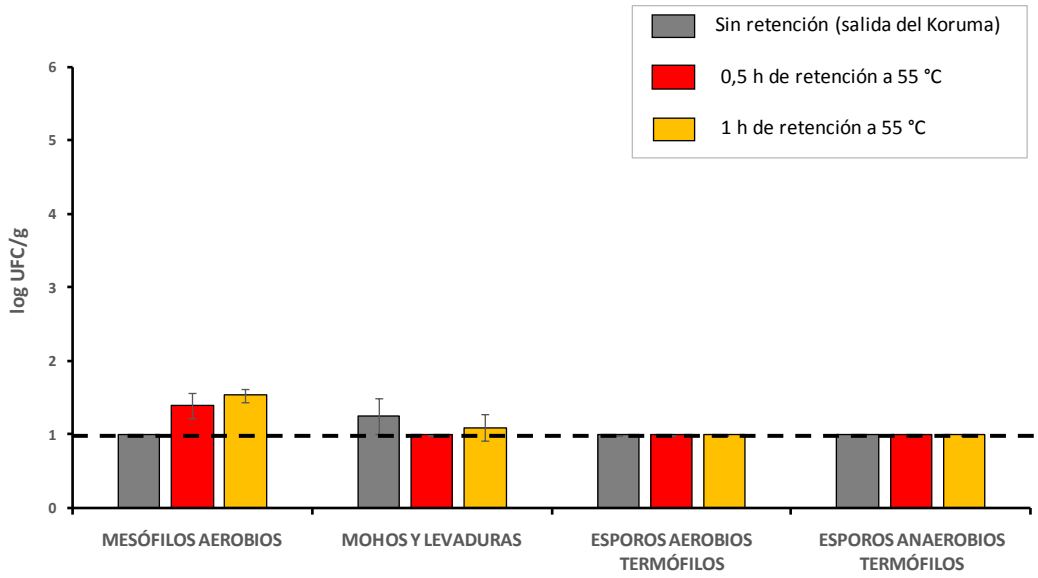

Figura 15. Recuento de microorganismos tras la cocción de sopa oriental en la primera carga de sopa oriental. Línea negra discontinua: límite de detección (<1 log ufc/g)

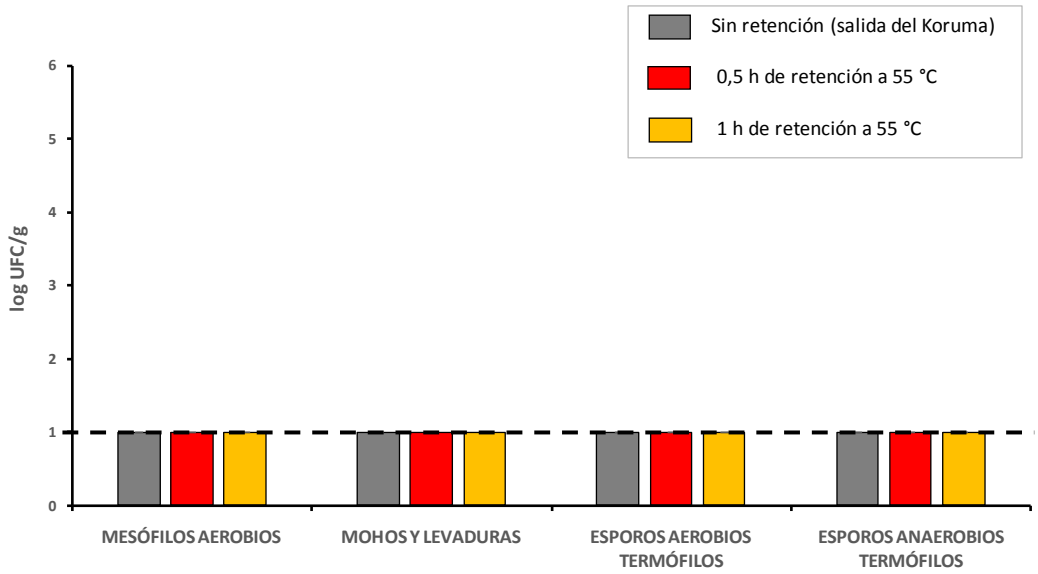

Figura 16. Recuento de microorganismos tras la cocción de sopa oriental en la última carga de sopa oriental. Línea negra discontinua: límite de detección (<1 log ufc/g)

El primer punto crítico del proceso de elaboración de sopa oriental examinado es tras la salida del mezclador (koruma) de la sopa (mezcla de agua y aceite sin sólidos, la adición del mix de vegetales es posterior). En este punto también se estudiaron diferentes tiempos de retención para las muestras (sin retención, con una retención de 0,5 h a 55 °C y con una retención de 1 hora a 55 °C).

El recuento de **aerobios mesófilos** en este punto fue de 1,0 ± 0,0 log ufc/g (Figura 15) por lo que, la temperatura y tiempo (80 °C a 5 min) alcanzados en el mezclador no han sido suficientes para inactivar los microorganismos aerobios mesófilos presentes en la misma. Posteriormente, las condiciones de retención estudiadas para este punto crítico (30 y 60 minutos a 55 °C) son "aptas" para permitir el desarrollo de la microflora mesófila presente en las muestras, debido al incremento significativo en ambos puntos de retención de 0,4 log ufc/g y 0,5 ufc/g respectivamente con respecto al punto sin retención (Tabla 6). A mayor tiempo de retención, mayor crecimiento de los microorganismos aerobios mesófilos, aunque en una tasa de crecimiento baja, probablemente debido a que las condiciones de la retención (termofilia a 55 °C) no son las óptimas para su multiplicación.

El recuento de **mohos y levaduras** en este punto fue de 1,3 ± 0,2 log ufc/g (Figura 15) por lo que, la temperatura y tiempo (80 °C a 5 min) alcanzados en el mezclador tampoco han sido suficientes para destruir a mohos y levaduras presentes en la misma. Posteriormente, las condiciones de retención estudiadas para este punto crítico (30 y 60 minutos a 55 °C) no aumentaron el recuento de este tipo de microorganismos en las muestras estudiadas (incluso descenso significativo en el recuento tras 30 minutos de retención con respecto al punto sin retención). Parece que el factor tiempo (1 hora máxima

de retención) no es determinante para el desarrollo de este tipo de microorganismos (Tabla 6).

El recuento de **esporos termófilos tanto aerobios como anaerobios** en este punto fue de 0 log ufc/g (Figura 15). No hubo proliferación microbiana ni para las muestras sin retención (80 °C a 5 min) ni para las muestras con retención (30 y 60 minutos a 55 °C) (en la Figura 15 los recuentos para estos microorganismos llegan hasta 1 log representando el límite de detección para recuentos < 1 log ufc/g) (Tabla 6).

Con respecto a la última carga (Figura 16), los recuentos de todos los microorganismos estudiados, **aerobios mesófilos, mohos y levaduras y esporos termófilos aerobios y anaerobios** fueron de 0 log ufc/g, no hubo crecimiento alguno. También las retenciones producidas en el proceso no mostraron crecimiento de flora microbiana (Tabla 6). De estos resultados se "concluiría" que la temperatura y tiempo (80 °C/ 5 min) alcanzados en el coccionador Koruma han sido suficientes para inactivar a los microorganismos presentes en la misma y que están por debajo del límite de detección de la técnica analítica utilizada (<1 log ufc/g). No hubo diferencias significativas entre cargas para ninguno de los microorganismos estudiados entre los puntos de retención estudiados, excepto para el recuento de aerobios mesófilos que mostró un descenso significativo para las retenciones a 30 y 60 minutos en torno a medio logaritmo.

Tabla 6. Recuentos microbianos en cada punto del proceso de elaboración de sopa oriental y en cada carga

	aerobios mesófilos		mohos y levaduras		esporos termófilos aerobios		esporos termófilos anaerobios	
	Primera carga	**Última carga**	**Primera carga**	**Última carga**	**Primera carga**	**Última carga**	**Primera carga**	**Última carga**
CARGA INICIAL MATERIA PRIMA	5,3 ± 0,2 a	-	2,5 ± 0,2 a	-	2,1 ± 0,0 a	-	2,0 ± 0,2 a	-
Salida del koruma sin retención	1,0 ± 0,0 f	1,0 ± 0,0 f	1,3 ± 0,2 d	1,0 ± 0,0 def	1,0 ± 0,0 c	1,0 ± 0,0 c	1,0 ± 0,0 e	1,0 ± 0,0 e
30 min de retención a 55 ºC	1,4 ± 0,2 e	1,0 ± 0,0 f	1,0 ± 0,0 ef	1,0 ± 0,0 ef	1,0 ± 0,0 c	1,0 ± 0,0 c	1,0 ± 0,0 e	1,0 ± 0,0 e
60 min de retención a 55 ºC	1,5 ± 0,1 e	1,0 ± 0,0 f	1,1 ± 0,2 de	1,0 ± 0,0 def	1,0 ± 0,0 c	1,0 ± 0,0 c	1,0 ± 0,0 e	1,0 ± 0,0 e
Envasado sin retención	2,7 ± 0,1 d	2,7 ± 0,1 d	1,9 ± 0,0 c	1,0 ± 0,3 def	1,7 ± 0,1 b	1,7 ± 0,2 b	1,7 ± 0,1 bc	1,6 ± 0,2 c
Envasado con retención 1 hora	2,8 ± 0,1 cd	2,8 ± 0,1 d	2,1 ± 0,1 b	1,2 ± 0,1 de	1,8 ± 0,1 b	1,8 ± 0,3 b	1,8 ± 0,1 ab	1,3 ± 0,3 d
Envasado con retención 2 horas	3,2 ± 0,1 b	3,0 ± 0,1 c	2,1 ± 0,2 bc	0,8 ± 0,1 f	1,6 ± 0,2 b	1,7 ± 0,2 b	1,8 ± 0,0 abc	1,7 ± 0,1 bc

Se muestran en la tabla las medias expresadas en log ufc/g ± desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($p<0,05$).

7.2.1.2 POST-ENVASADO

Las Figuras 17 (primera carga) y 18 (última carga) resumen los resultados microbiológicos obtenidos en sopa oriental en la etapa post-envasado, previa al tratamiento térmico. El envasado se realizó a 65-70 ºC. Cabe destacar que en este punto crítico, los ingredientes vegetales ya han sido añadidos y por eso también se ha examinado la carga microbiana de la materia prima inicial.

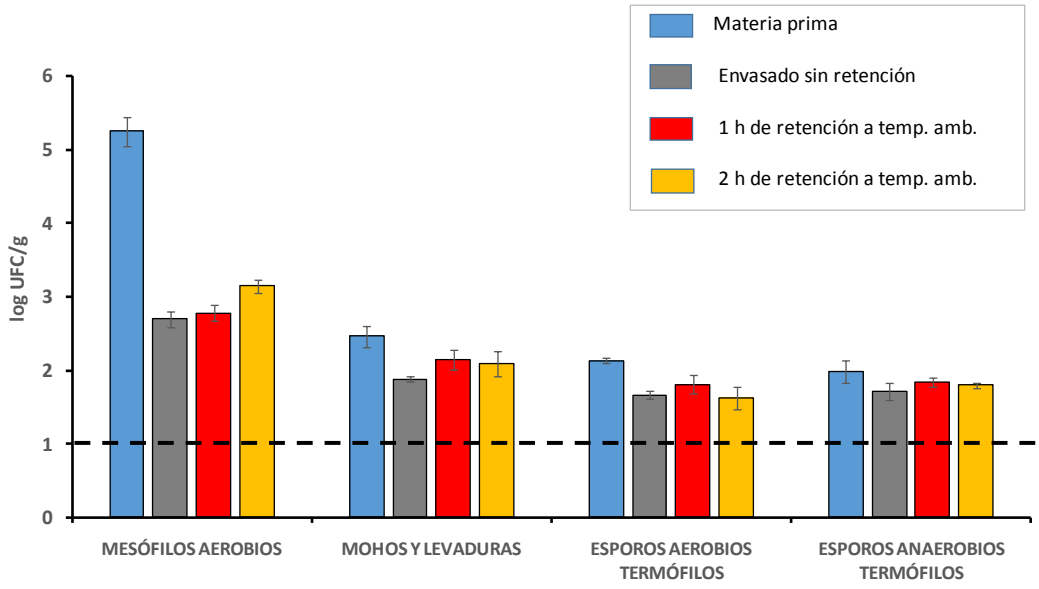

Figura 17. Recuento de microorganismos tras el envasado de sopa oriental en la primera carga de sopa oriental. Línea negra discontinua: límite de detección (<1 log ufc/g)

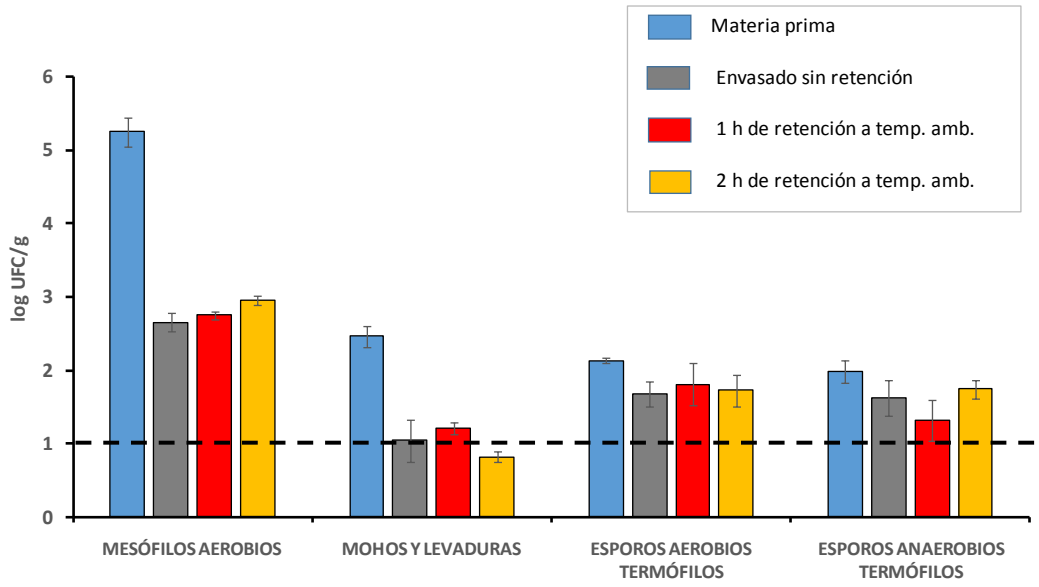

Figura 18. Recuento de microorganismos tras el envasado de sopa oriental en la última carga de sopa oriental. Línea negra discontinua: límite de detección (<1 log ufc/g)

Otro punto crítico examinado del proceso de elaboración de la sopa fue tras el envasado de la misma (el producto se encuentra a 65-70 ºC), en donde previamente se han incorporado los ingredientes (mix vegetales y pasta) a la sopa líquida. En este punto también se estudiaron diferentes tiempos de retención para las muestras (sin retención, con una retención de 1 hora a temperatura ambiente y con una retención de 2 horas a temperatura ambiente).

El recuento de **aerobios mesófilos** tras el envasado a 65-70 °C y sin retención en la primera carga fue de 2,7 ± 0,1 log ufc/g (Figura 17). El tratamiento térmico realizado durante este proceso (65-70 °C) permitió la disminución de la microflora mesófila aerobia en más de 3 log UFC/gramo (ya que 1 log ufc/g del total (2,7 log ufc/g) lo aporta la sopa líquida sin ingredientes vegetales) (Tabla 6).

El primer tiempo de retención analizado (1 hora) no aumentó significativamente el recuento de aerobios mesófilos con respecto al tiempo sin retención. Por el contrario, el tiempo de retención post-envasado tras 2 horas analizado durante el proceso de elaboración del producto es un factor relevante para el posterior crecimiento microbiano, ya que los microorganismos aerobios mesófilos se encuentran a temperaturas óptimas (ambiente) para su crecimiento durante la retención de las muestras debido al incremento significativo en el recuento en torno a 0,5 log ufc/g con respecto al punto sin retención y con respecto también al tiempo de retención tras 1 hora (Tabla 6).

El recuento de **mohos y levaduras** tras el envasado a 65-70 °C y sin retención en la primera carga fue de 1,9 ± 0,0 log ufc/g. El tratamiento térmico realizado durante este proceso (65-70 °C) permitió el descenso significativo de mohos y levaduras en poco más de 0,5 log ufc/g. Los tiempos de retención post-envasado analizados durante el proceso de elaboración del producto permitieron un ascenso significativo en el recuento tras 1 hora de retención (incremento 0,2 log ufc/g) pero no tras 2 horas de retención (Tabla 6).

El recuento de **esporos termófilos aerobios y anaerobios** tras el envasado a 65-70 °C y sin retención en la primera carga fue de 1,7 ± 0,1 log ufc/g para ambos microorganismos. El tratamiento térmico realizado durante este proceso (65-70 °C) permitió la disminución significativa de esporos termófilos aerobios en poco más de 0,4 log ufc/g. Los tiempos de retención post-envasado analizados durante el proceso de elaboración del producto muestran el poco desarrollo y multiplicación de los esporos (incrementos no significativos) (Tabla 6).

Con respecto a la última carga (Figura 18), el recuento de **mesófilos aerobios** fue bastante similar al de la primera carga en ese punto crítico 2 (tras el envasado) y en los 3 tiempos de retención estudiados (sin retención, 1 hora y 2 horas) y los resultados fueron similares a los de la primera carga. Tras 2 horas de retención hubo un incremento significativo en el recuento de estos microorganismos, pero no tras 1 hora con respecto al envasado sin retención (Tabla 6).

El recuento de **mohos y levaduras** post-envasado fue de 1,0 ± 0,3 log ufc/g, carga que se redujo significativamente en más de 1 log con respecto a la microflora microbiana de la materia prima inicial y en casi 1 log con respecto al recuento de mohos y levaduras de la primera carga. Respecto a los tiempos de retención post-envasado, el recuento de mohos y levaduras descendió significativamente a las 2 horas de retención con respecto al envasado sin retención. Los recuentos realizados en la última carga fueron significativamente menores que los recuentos de la primera carga (Tabla 6).

El recuento de **esporos termófilos aerobios** analizados en este punto crítico (post-envasado) fueron similares (no hubo diferencias significativas) a los recuentos realizados en la primera carga. No hay diferencias entre cargas en los recuentos de este tipo de microorganismos (Tabla 6).

El recuento de **esporos termófilos anaerobios** analizados en este punto crítico (post-envasado) fueron ligeramente similares a los recuentos realizados en la primera carga. No hubo diferencias significativas ni entre cargas ni entre puntos críticos analizados dentro la última carga en los recuentos de este tipo de microorganismos excepto en el punto tras 1 hora de retención post-envasado que se produjo un descenso significativo en el recuento de los esporos con respecto al envasado sin retención y que tras la siguiente hora de retención (2 horas) aumentó significativamente a los recuentos producidos en la primera carga (Tabla 6).

8. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas fueron:

- **Para el tomate cubitado**:

1. Los niveles de mesófilos aerobios fueron elevados (10^6-10^7ufc/g) y recuentos entre 10^5-10^6 de mesófilos anaerobios y acidolácticos en la materia prima, mientras que los recuentos de esporos termófilos aerobios y anaerobios fueron muy bajos (incluso por debajo del límite de detección).

2. Es necesario tener en cuenta la influencia de las diferentes fases del proceso de elaboración por su impacto en la calidad microbiológica del producto final.

   2.1. Las operaciones previas al tratamiento térmico no han sido una fuente de contaminación del producto, excepto la etapa de cubitado donde se produjo un incremento significativo en los recuentos de anaerobios mesófilos y mesófilos acidolácticos.

3. Las muestras almacenadas a distintas temperaturas durante 7 días para forzar su alteración, permitieron el aislamiento e identificación del microorganismo identificado como *Alicyclobacillus acidocaldarius*

4. Los estudios de termorresistencia con *A. acidocaldarius* mostraron:

   4.1. Alta resistencia al calor de los esporos de este microorganismo (cepa 690). Estadísticamente mostró la misma resistencia que una de las cepas del cepario de CNTA (cepa 48) para las condiciones postuladas.

   4.2. Las condiciones de esporulación de máxima resistencia al tratamiento térmico fueron a pH 4,0-4,25 y temperatura 55 ºC, poniendo de manifiesto que la resistencia fue mayor cuanto más alta fue la temperatura de esporulación de este microorganismo.

   4.3. No se observó influencia en la resistencia al calor de los esporos de *A. acidocaldarius* de las etapas de acondicionado del tomate cubitado (calentamientos a 45 y 55 ºC durante tiempos entre 30-60 min), lo que pone de manifiesto que esos periodos de retención no favorecen ni la germinación ni la esporulación de este microorganismo.

   4.4. Finalmente, se evaluó la resistencia a distintos tratamientos térmicos de esporos de *A. acidocaldarius* producidos en las condiciones seleccionadas anteriormente. Las curvas de supervivencia obtenidas pusieron de manifiesto la gran resistencia de este microorganismo al calor obteniéndose valores D entre 6-66 min a temperaturas entre 99 y 110 ºC. El valor z fue de 6 ºC y F_0 de 1,17 min. Esto nos permite la definición y ajuste de los tratamientos térmicos, puesto que este microorganismo es capaz de sobrevivir a los tratamientos de esterilización actuales que utiliza la empresa, evitando así un riesgo para la alteración del producto.

- **Para la sopa oriental**:

5. Los aerobios mesófilos fueron el grupo mayoritario de microorganismos presentes en las muestras analizadas (ya que incluyen varios grupos de microorganismos) seguido de mohos y levaduras y de esporos termófilos

6. Dependiendo del tipo de microorganismos, los tiempos de retención que se dan en los dos puntos críticos evaluados (post-cocción 30 y 60 min a 55 ºC y post-envasado tras 1 y 2 horas) y de las cargas puede influir o no en el incremento de los recuentos de tales microorganismos.

   6.1. Para aerobios mesófilos: se incrementó significativamente el número de microorganismos tras el segundo tiempo de retención (post-cocción 60 min 55 ºC y post-envasado tras 2 h) estudiado frente a los tiempos sin retención de cada punto crítico en la primera carga. En la segunda carga solo ocurre en el envasado tras 2 h de retención.

   6.2. Para mohos y levaduras: entre algunos tiempos de retención analizados dentro de cada punto crítico, se observaron diferencias significativas en los recuentos (de 0,2 log ufc/g).

   6.3. Para esporos termófilos aerobios y anaerobios: en general hubo un incremento significativo entre ambos puntos críticos del proceso pero no entre tiempos de retención y cargas.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abril Requena, J. (2004) 'Tratamientos térmicos de alimentos en autoclave', *Universidad Pública de Navarra*, pp. 1-10.

Alonso Urmeneta, B. (2003) 'Manual práctico de microbiología. Editorial Masson'. 2ed, *Barcelona, España.*

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997) 'Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs', *Nucleic acids research*, 25(17), pp. 3389-3402.

Beltrán, D., Selma, M. V., Tudela, J. A. and Gil, M. I. (2005) 'Effect of different sanitizers on microbial and sensory quality of fresh-cut potato strips stored under modified atmosphere or vacuum packaging', *Postharvest Biology and Technology*, 37(1), pp. 37-46.

Bigelow, W. (1921) 'The logarithmic nature of thermal death time curves', *The Journal of Infectious Diseases*, pp. 528-536.

Brown, K. and Ayres, C. (1982) 'Thermobacteriology of UHT processed foods', *Developments in food microbiology*. 1, ed. R. Davies, Applied Science Publishers, London.

Cerf, O. (1977) 'A review tailing of survival curves of bacterial spores', *Journal of Applied Bacteriology*, 42(1), pp. 1-19.

Condón, S., Lopez, P., Oria, R. and Sala, F. (1989) 'Thermal death determination: design and evaluation of a thermoresistometer', *Journal of Food Science*, 54(2), pp. 451-457.

Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P., Esnoz, A. and Palop, A. (2009) 'Nonisothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia', *Journal of applied microbiology*, 107(2), pp. 506-513.

Doyle, M. E., Mazzotta, A. S., Wang, T., Wiseman, D. W. and Scott, V. N. (2001) 'Heat resistance of Listeria monocytogenes', *Journal of Food Protection*, 64(3), pp. 410-429.

Elez-Martinez, P. and Martin-Belloso, O. (2007) 'Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup', *Food Chemistry*, 102(1), pp. 201-209.

Erturk, E. and Picha, D. H. (2006) 'Microbiological quality of fresh-cut sweet potatoes', *International journal of food science & technology*, 41(4), pp. 366-374.

Fernández, A., Lopez, M., Bernardo, A., Condón, S. and Raso, J. (2007) 'Modelling thermal inactivation of Listeria monocytogenes in sucrose solutions of various water activities', *Food Microbiology*, 24(4), pp. 372-379.

Garre, A., Fernández, P. S., Lindqvist, R. and Egea, J. A. (2017) 'Bioinactivation: Software for modelling dynamic microbial inactivation', *Food Research International*, 93, pp. 66-74.

Garza-Velasco, R., Silva-Monzuazo, T. and Hernández-Gómez, L. (2007) 'La listeriosis humana y el ciclo infectivo asociado a su agente etiológico'. Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM. *Online <http://depa.fquim.unam. mx/bacteriologia/pdfs/ART% CDC-Listeria. pdf>*.

Gironés-Vilaplana, A., Mena, P., Moreno, D. A. and García-Viguera, C. (2014) 'Evaluation of sensorial, phytochemical and biological properties of new isotonic beverages enriched with lemon and berries during shelf life', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6), pp. 1090-1100.

Gould, G. (1989) 'Heat-induced injury and inactivation', G. W. Gould (editor), *Mechanisms of action of food preservation procedures*, Elsevier, New York. pp. 11-42.

Hassani, M., Manas, P., Pagán, R. and Condón, S. (2007) 'Effect of a previous heat shock on the thermal resistance of Listeria monocytogenes and Pseudomonas aeruginosa at different pHs', *International journal of food microbiology,* 116(2), pp. 228-238.

Hassani, M., Álvarez, I., Raso, J., Condón, S. and Pagán, R. (2005) 'Comparing predicting models for heat inactivation of Listeria monocytogenes and Pseudomonas aeruginosa at different pH', *International journal of food microbiology,* 100(1-3), pp. 213-222.

ISO 21527-1:2008. International Standarization Organization. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of yeast and moulds. Part 1. Colony count technique in products with water activity greather than 0.95.

ISO 21527-2:2008. International Standarization Organization. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of yeast and moulds. Part 2. Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0.95

Lenz, C. A. and Vogel, R. F. (2015) 'Differential effects of sporulation temperature on the high pressure resistance of Clostridium botulinum type E spores and the interconnection with sporulation medium cation contents', *Food microbiology,* 46, pp. 434-442.

Lin, Y.-D. and Chou, C.-C. (2004) 'Effect of heat shock on thermal tolerance and susceptibility of Listeria monocytogenes to other environmental stresses', *Food Microbiology,* 21(5), pp. 605-610.

Mackey, B. and Derrick, C. M. (1982) 'The effect of sublethal injury by heating, freezing, drying and gamma-radiation on the duration of the lag phase of Salmonella typhimurium', *Journal of Applied Bacteriology,* 53(2), pp. 243-251.

McKenney, P. T., Driks, A. and Eichenberger, P. (2013) 'The Bacillus subtilis endospore: assembly and functions of the multilayered coat', *Nature Reviews Microbiology,* 11(1), pp. 33.

McMeekin, T., Mellefont, L. and Ross, T. (2007) 'Predictive microbiology: past, present and future', *Modelling microorganisms in food,* 1, pp. 7-11.

Miller, F. A., Brandão, T. R., Teixeira, P. and Silva, C. L. (2006) 'Recovery of heat-injured Listeria innocua', *International journal of food microbiology,* 112(3), pp. 261-265.

MORALES-BLANCAS, E. and TORRES, J. (2003) 'Determination of thermal resistance parameters', *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering. Marcel Dekker. New York, USA. pp*, pp. 1038-1043.

Oh, S. and Moon, M.-J. (2003) 'Inactivation of Bacillus cereus spores by high hydrostatic pressure at different temperatures', *Journal of food protection,* 66(4), pp. 599-603.

Palop, A. (2007) 'Cuaderno de prácticas ingeniería de la esterilización, asepsia e higiene', *Ed. Alfredo Palop. Universidad politécnica de Cartagena-etsia Cartagena. Cartagena, España*.

Pascual, M. and Calderón, V. (2000) 'Microbiología alimentaria', *Díaz de Santos, Madrid, España*.

Ramos, B., Miller, F., Brandão, T. R., Teixeira, P. and Silva, C. L. (2013) 'Fresh fruits and vegetables—an overview on applied methodologies to improve its quality and safety', *Innovative Food Science & Emerging Technologies,* 20, pp. 1-15.

Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) 'Molecular cloning: a laboratory manual, Ed 2nd', *New York: Cold Spring Harbor Laboratory*.

Singh, R. P. and Heldman, D. R. C. (2009) '*Introducción a la ingeniería de los alimentos.* Editorial Acribia'. *Zaragoza, España.*

Splittstoesser, D. F. and Vanderzant, C. (1992) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods,* 3rd ed., American Public Health Association. Washington, D.C.

Stumbo, C. (1973) 'Thermobacteriology in Food Processing Academic Press', *Inc., Orlando, FL*.

Sun, S. H., Kim, S. J., Kwak, S. J. and Yoon, K. S. (2012) 'Efficacy of sodium hypochlorite and acidified sodium chlorite in preventing browning and microbial growth on fresh-cut produce', *Preventive nutrition and food science,* 17(3), pp. 210.

Van Zuijlen, A., Periago, P. M., Amézquita, A., Palop, A., Brul, S. and Fernández, P. S. (2010) 'Characterization of Bacillus sporothermodurans IC4 spores; putative indicator microorganism for optimisation of thermal processes in food sterilisation', *Food research international,* 43(7), pp. 1895-1901.

Yousef, A. and Carlstrom, C. (2006) 'Microbiología de los alimentos: Manual de Laboratorio. Editorial Acribia', Zaragoza, España.

UNE-EN ISO 4833-1:2013. Asociación Española de Normalización y Certificación. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 1: Recuento de colonias a 30 º C mediante la técnica de siembra en profundidad.

UNE-EN ISO 7218:2007. Asociación Española de Normalización y Certificación. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales para el examen microbiológico.