



MAY 2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN



**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO TÉRMICO SOBRE EL CRECIMIENTO
DE LOS MICROORGANISMOS MESOFILOS AEROBIOS DEL HUEVO
LÍQUIDO PASTEURIZADO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA VIDA ÚTIL
MEDIANTE EL MODELO DE ARRHENIUS”**

EDGAR ZARATE SARAPURA

Callao, 2019

PERÚ

DEDICATORIA

- A mi esposa e hijos por su incondicional apoyo a mi labor en la investigación.
- A mis maestros que me dieron la oportunidad de otorgarme sus sabias enseñanzas y aplicarlas en la investigación.
- A mis alumnos que día a día nos encontramos en el laboratorio a discutir logros en la investigación.



AGRADECIMIENTOS

- A la Blga. Nancy Solier, Laboratorista de CODITEC quien aportó su experiencia en los ensayos para determinar la calidad microbiológica de los ovoproductos
- A la Bch Ing. Qca. Sandra Altamirano Berrocal por su colaboración y dedicación en la aplicación de las herramientas multimedia de Microbiología predictiva.
- A la Universidad Nacional del Callao, quien a través del aporte del FEDU se pudo lograr los objetivos planteados en esta investigación, financiando la adquisición de materiales y equipos básicos de laboratorio.

K

INDICE

	Página
Índice	1
Índice de tablas	3
Índice de figuras	5
Resumen	6
Introducción	8
I. Planteamiento del problema	10
1.1. Descripción de la realidad problemática	10
1.2. Formulación del problema	13
Problema General	13
Problemas Específicos	14
1.3. Objetivos	14
Objetivo General	14
Objetivos Específicos	14
1.4. Limitantes de la Investigación	15
II. Marco teórico	16
2.1. Antecedentes Internacionales y nacionales	16
2.2. Bases teóricas	25
2.3. Conceptual	27
2.4. Definición de términos básico	27
III. Hipótesis y variables	31
3.1 Hipótesis	31
3.1.1 Hipótesis General	31
3.1.2 Hipótesis Específicas	31
3.2 Definición conceptual de variables	33
3.2.1 Operacionalización de variables	33
IV. Diseño Metodológico	33
4.1 Tipo y diseño de investigación	33
4.2. Método de investigación	34
4.3. Población y muestra	35
4.4. Lugar de estudio y periodo desarrollado	36
4.5.. Técnicas e Instrumentos para la recolección de datos	36

4,6	Análisis y procesamiento de datos	39
V.	Resultados	42
5.1	Resultados descriptivos	42
5.2	Resultados inferenciales	43
VI.	Discusión de los resultados	56
	Conclusiones	70
	Recomendaciones	71
	Referencias bibliográficas	72
	Anexos	80
	Matriz de consistencia	81
	Base de datos	82



INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1	45
Parámetros del crecimiento de bacterias mesófilas aeróbicas en huevo líquido pasteurizado de lotes industriales conservado a 4 °C.	
Tabla 2	46
Descripción de la velocidad del cambio del pH, sólidos totales (%) y velocidad de crecimiento de Mesófilos aerobios en huevo líquido pasteurizado y conservado a 4 °C por 14 días	
Tabla 3	49
Incremento de la población de bacterias mesófilas aerobias en huevo líquido pasteurizado conservado a -10 °C, 0 °C Y 10 °C	
Tabla 4	51
Fase de latencia o adaptación (λ) y Velocidad de crecimiento (μ_{max}) de Microorganismos mesófilos aerobios en Huevo líquido pasterizado conservado a -10 °C, 0 °C y 10 °C	
Tabla 5	52
Parámetros del crecimiento cinético de Microorganismos Mesófilos Aerobios en huevo líquido pasteurizado almacenado a las temperaturas de -10 °C, 0 °C, 10 °C	
Tabla 6	53
Estado fisiológico de los Microorganismos Patógenos Aerobios presentes en el huevo pasteurizado y almacenado a -10 °C, 0 °C y 10 °C	
Tabla 7	54
Vida útil: Velocidades de crecimiento de mesófilos aerobios en huevo líquido pasteurizado a temperaturas de abuso de 15 °C, 25 °C y 35°C.	
Tabla 8	55
Constantes del Modelo de Arrhenius	
Tabla 9	56
Valores de la Energía de Activación (E_a) y Velocidad de Crecimiento ($\ln \mu$) de mesófilos	

aerobios presentes en el huevo líquido
pasteurizado y almacenado a 4°C

Tabla 10 Vida Útil del huevo líquido pasteurizado
conservado a 4°C con referencia al agente
microbios mesófilos aerobios

56



INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Presencia de bacterias mesófilas aerobias en Lotes de huevo líquido pasteurizado y enfriado 4 °C, cultivadas por 24 y 48 hrs	43
Figura 2 Crecimiento de Microorganismos Mesófilos Aerobios (Log UFC/g) presentes en muestras de lotes industriales de huevo líquido pasteurizado y almacenado a 4° durante 21 días	44
Figura 3 . Variación del pH y Sólidos totales (%) durante el crecimiento (Log UFC/mL) de mesófilos aerobios en huevo líquido pasteurizado conservado a 4 °C	47
Figura 4 Crecimiento de Bacterias Aerobias Mesófilas (Log UFC/mL) en huevo líquido pasteurizado conservado a temperaturas -10 °C, 0 °Cy 10 °C, según Modelo Barangy & Roberts	49
Figura 5 Fase de latencia (λ) de Microorganismos Mesófilos Aerobios en huevo líquido pasteurizado conservado a -10 °C, 0 °C, 10 °C.	51
Figura 6 Relación de la Velocidad de crecimiento (μ_{\max} Ln UFC/mL) de MMA y las temperatura de abuso de 15 °C (288 °K), 25 °C (298 °K) y 35 °C (308 °K)	54

12

RESUMEN

Antecedentes: La estimación de la vida útil del huevo líquido pasteurizado con choque térmico 4 °C es importante como factor de conservación y de abastecimiento. Comprender el efecto de bajas temperaturas y el tiempo de almacenamiento sobre sus características microbiológicas, permiten mejorar las actividades de la conservación. **Objetivo:** Se determinó el efecto de térmico del frío sobre los parámetros cinéticos del crecimiento de microorganismos mesófilos aerobios (MMA) presentes en HLP y estimar la vida útil mediante el modelo de Arrhenius. **Métodos:** El crecimiento de MMA a -10, 0 y 10 °C, expresadas en UFC/mL se ajustaron con el modelo de Barangy & Roberts obteniendo sus parámetros cinéticos: velocidades de crecimiento (μ_{max}), tiempo de la fase de latencia (λ) y los valores del estado fisiológico (h_0). El tiempo de vida útil se calculó utilizando la velocidad de crecimiento a temperaturas de abuso de 15, 25 y 35 °C y el modelo secundario de Arrhenius. **Resultados:** El modelamiento del crecimiento de MMA presentes en el HLP reporta velocidades de crecimiento 0.012, 0.023 y 0.038 Log UFC/mL/h, tiempo fase Lag o latencia (λ) de 42, 23 y 16 horas, para -10, 0 y 10 °C, respectivamente. Ambos parámetros son dependientes del estado fisiológico (h_0) cuyos valores son: 0.31, 0.3 y 0.25, respectivamente. El tiempo de la vida útil del HLP conservado a 4 °C, según el modelo de Arrhenius es de 18.35 días, tiempo en el cual el alimento no representa un riesgo para la salud. **Conclusiones:** Los resultados de este estudio indican que el uso de bajas temperaturas para la conservación del huevo líquido pasteurizado no asegura la inhibición o eliminación de células de microorganismos mesófilos aerobios sobrevivientes a la temperatura de pasteurización, los cuales pueden adaptarse e incrementar su población por la posesión de velocidades de crecimiento (μ_{max}) y estado fisiológico (h_0) apropiados dentro de un tiempo de adaptación ó Fase Lag (λ). El estado de estrés de MMA a bajas temperaturas acondiciona eventos regulatorios de tipo genético y metabólico que les permite disminuir el tiempo de vida útil.

Palabras Claves: Conservación alimentos, huevo líquido pasteurizado, microorganismos mesófilos aerobios, microbiología predictiva.

ABSTRACT

Background: The estimation of the useful life of the pasteurized liquid egg (LPE) with thermal shock 4 ° C is important as a conservation and supply factor. Understanding the effect of low temperatures and storage time on their microbiological characteristics, allow to improve conservation activities. **Objective:** The thermal effect of the cold on the kinetic parameters of the growth of aerobic mesophilic microorganisms (MMA) present in HLP was determined and the useful life estimated by the Arrhenius model. **Methods:** The growth of MMA at -10, 0 and 10 ° C, expressed in CFU / mL, was adjusted with the Barangy & Roberts model, obtaining its kinetic parameters: growth rates (μ_{max}), time of the latency phase (λ) and the values of the physiological state (h_0). The shelf life was calculated using the growth rate at abuse temperatures of 15, 25 and 35 ° C and the Arrhenius secondary model. **Results:** Modeling the growth of MMA present in the LPE reports growth rates 0.012, 0.023 and 0.038 Log CFU / mL / h, Lag phase time or latency (λ) of 42, 23 and 16 hours, for -10, 0 and 10 ° C, respectively. Both parameters are dependent on the physiological state (h_0) whose values are: 0.31, 0.3 and 0.25, respectively. The shelf life of the HLP conserved at 4 ° C, according to the Arrhenius model, is 18.35 days, at which time the food does not represent a risk to health. **Conclusions:** The results of this study indicate that the use of low temperatures for the preservation of the pasteurized liquid egg does not ensure the inhibition or elimination of surviving aerobic mesophilic microorganism cells at the pasteurization temperature, which can adapt and increase their population by possession of appropriate growth rates (μ_{max}) and physiological state (h_0) within an adaptation time or Lag Phase (λ). The stress state of MMA at low temperatures conditions regulatory events of genetic and metabolic type that allows them to reduce the useful life time.

Key Words: Food preservation, pasteurized liquid egg, aerobic mesophilic microorganisms, predictive microbiology.



INTRODUCCIÓN

Los productos derivados del huevo y su comercialización se ha incrementado significativamente debido a que la industria alimentaria requiere materia prima para elaborar alimentos de corto periodo de vida útil pero de gran calidad e inócuo y además que el manejo de los residuos del huevo no constituyan un impacto al ambiente.

El huevo y sus productos crudo se catacterizan por trasladar, de alguna forma bacterias patógenas y está involucrado en la transmisión de enfermedades por lo tanto tecnológicamente se debe aplicar temperaturas de pasteurización que garanticen las propiedades tecnológicas para su uso.

La normatividad peruana sobre inocuidad establece que los productos como el huevo líquido en sus presentaciones como pasteurizado y conservado en condiciones de refrigerado y congelado debe mostrar ausencia de microorganismos patógenos, sin embargo no considera la actividad de los microorganismos alterantes que puedan realizar deterioro en la estructura, cambios químicos o denaturalización de la calidad sensorial del alimento durante el periodo de conservación.

El proceso de pasteurización aplicado al huevo líquido está perfilado para eliminar la presencia de *Salmonella* sps. y otros patógenos si lo hubiese, garantizando las condiciones de inocuidad; Sin embargo, quedan microorganismos mesófilos termotolerantes que pueden realizan actividad metabólica durante el proceso de conservación aplicando tecnologías de frío.

La conservación del huevo líquido en frío no está reportada científicamente en abundancia que contribuya a caracterizada en términos de parámetros de cinéticos o valores constantes que permitan obtener el tiempo de vida útil en condiciones de estrés bacteriana dentro de entornos de bajas temperaturas dentro de un periodo de tiempo.



Obtener valores de las relaciones entre los factores intrínsecos e extrínsecos del huevo líquido pasteurizado conservado en frío se hace necesario para contribuir con los criterios de inocuidad y esta exigencia se puede cumplir utilizando las herramientas de la Microbiología Predictiva, la cual es una ciencia cada vez más utilizada y practicada en investigaciones importantes para la conservación de los alimentos brindándonos el uso de modelos matemáticos primarios de Gompertz y Barangy & Roberts, y el secundarios de Arrhenius; con los cuales se obtendrán los parámetros cinéticos que servirán para obtener el tiempo de vida útil en función de la temperatura.

El objetivo de la investigación es determinar el efecto térmico sobre el crecimiento de microorganismos mesófilos aerobios del huevo líquido pasteurizado para la estimación de la vida útil mediante el modelo de Arrhenius.



I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

El huevo es uno de los alimentos que últimamente ha sido industrializado para convertirse en materia prima de productos de gran demanda aprovechando sus propiedades físico químico y organoléptico. Sin embargo, los ovoproductos deben cumplir con las exigencias microbiológicas de no ser portador de bacterias patógenos como es el caso de *Salmonella*, entre la más importante.

Huevo líquido entero, clara y yema se utilizan en la elaboración de muchos alimentos para otorgar textura, sabor, color y otras características que los hacen apetecibles para todas las edades de los consumidores, de tal forma que si no es convenientemente pasteurizado puede ser considerado como un alimento transmisor de enfermedades.

Los huevos recién puestos son estériles interiormente, circunstancialmente pueden producirse contaminaciones por *Salmonella enteritidis* durante el proceso de formación en el oviducto. Sin embargo, la contaminación exterior acaecida en el momento de la puesta y favorecida por los sistemas de recogida, manipulación y transporte, hace que el proceso de elaboración del ovoproducto sea un factor crítico para asegurar la inocuidad de los productos elaborados. Además, la composición misma del huevo, hace que este sea un medio muy favorable para el desarrollo de cualquier microorganismo que pudiera llegar a él, o sea procedente del mismo.

La problemática nacional de la industria avícola, a nivel de producción primaria de huevos, es no tener debidamente implementado los programas de limpieza y desinfección de los ambientes destinado al almacenamiento de los envases y materiales de recolección, surgiendo de ésta forma una contaminación cruzada sobre el huevo crudo que repercute en el tiempo de la vida útil de los



ovoproductos. Actualmente no se ésta considerando al Huevo líquido como un agregado de valor a la producción primaria.

El proceso de elaboración del huevo líquido puede incorporar peligros bacterianos en sus diferentes etapas, es así que en la selección de los huevos no siempre se elimina todos aquellos huevos no aptos para su procesado, su extrema suciedad, hallarse rajados o rotos, etc. Los huevos con grietas, una vez en la máquina cascadora, no producen una abertura limpia y suelen caer trozos de cáscara en el canal de producto líquido, aumentando la contaminación microbiana y los restos de cascarilla que darán problemas en los filtros, etc.

Otro problema que se presenta es lo relacionado a la limpieza del huevo antes de ingresar al cascado. Esta etapa es obligatorio y consiste en la aplicación de agua a presión sobre los huevos, a una cierta temperatura y con la ayuda de detergentes y desinfectantes y proseguir con un eficiente enjuagado utilizando agua a una temperatura entre 43° y 49°C para que el contenido del huevo tienda a expansionarse en vez de contraerse, impidiendo que penetre la suciedad de la cáscara. Al no cumplirse cabalmente esta técnica de lavado el agua se convierte en un magnífico medio de contaminación que favorece la penetración de microorganismos a través de los poros de la cáscara.

El siguiente paso es el cascado, considerado como una operación muy delicada que requiere un seguimiento personal permanente para el ajuste de los automatismos. Es imprescindible que exista supervisor en cada máquina para separar cualquier resto de cáscara que haya podido ir a parar a los canales de recogida del líquido. Este paso es el que menos se cumple permitiendo una elevada contaminación con gérmenes alterantes o patógenos.

El huevo líquido debe pasar por el proceso de pasteurización, que es obligatorio de acuerdo a las normas técnicas de inocuidad en todos los países,



tiene como objetivo la destrucción de distintas cepas de *Salmonella*. Se ha utilizado como cepa referencial al tratamiento térmico frecuentemente a *Salmonella senftenberg*, que se caracteriza por ser una de las más termoresistentes de este género y permite establecer las combinaciones de temperatura y tiempo. En nuestro país se fija como mínimo 65 °C/2.5 min ó 60°C /3,5 min para huevo entero y yema; pero estos parámetros tienen como elemento de verificación del efecto térmico al aislamiento del grupo de las *Enterobacteriaceae*, que de hallarse en el análisis microbiológico estaría indicando probabilidad de presencia de *Salmonella* y en consecuencia es una no conformidad y no cumpliría con los lineamientos de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y el sistema de Análisis de Peligros y Puntos críticos de Control (HACCP).

Al término del proceso de elaboración el huevo líquido pasteurizado pasa por un enfriamiento a una temperatura de 0°C a 4°C e inmediatamente envasado y almacenado en cámaras de frío a dichas temperaturas. En estas circunstancias la sobrevivencia bacteriana, termorresistente o termotolerante y con capacidad para formar esporas, tiene a disponibilidad un sustrato muy nutritivo que favorece su crecimiento y desarrollo alterando las condiciones físico-químicas, microbiológicas y organolépticas del producto.

La Norma Peruana de Calidad Sanitaria e Inocuidad, considera como un criterio microbiológico la numeración de los grupos bacterianos mesófilos aerobios, los cuales son los sobrevivientes al efecto térmico de la pasteurización, quienes realizarán generalmente su metabolismo en relación a la temperatura de sus entorno que coincide con la de conservación del huevo líquido.

Las temperaturas de conservación del huevo líquido no garantizan controlar el desarrollo de actividades metabólicas de los microorganismos indicadores de alteración que pertenecen a los grupos psicrófilicos y psicótrofos, como es el caso de los microorganismos asociados con la vida útil y alteración del

producto tales como microorganismos aerobios mesófilos esporulados, Mohos y Levaduras, Lactobacillus, microorganismos lipolíticos.

En nuestro medio no están establecidas las características del crecimiento microbiano a temperaturas de refrigeración, desconociéndose sus parámetros correspondientes la velocidad del crecimiento (μ_{max}), tiempo generacional (T_g), fase de latencia (λ) y tiempo de la fase logarítmica. Estos parámetros permitirán, finalmente el cálculo del tiempo de vida útil.

En síntesis el problema de huevo líquido pasteurizado es por las consecuencias de una deficiente aplicación térmica durante el pasteurizado que conduce a la probable presencia de salmonella o elevada carga de microorganismos alterantes. Este primer factor favorecerá a que su alteración empieza desde el momento que finaliza el proceso de pasteurización debido a que debe permanecer en estado de reposo por periodo de 6 o 24 horas antes de ingresar a las cámaras de conservación a bajas temperaturas 4°C.

En dicho periodo las bacterias termotolerantes mesofílicas o psicrotrofas y psicrófilas procederán a su crecimiento una vez que disminuya la temperatura de pasteurización llegando a valores poblacionales muy altos que afectarán la calidad del producto. Las condiciones de bajas temperaturas pudiesen estar conservando a un producto que ya está alterado y afectando el tiempo de vida útil del huevo líquido pasteurizado y consecuentemente la producción de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) que son producidas por la ingestión del producto con agentes tóxicos o microbiológicos.

1.2. Formulación del problema

- Problema general

¿De qué manera influye la temperatura de conservación en frío sobre la cinética del crecimiento de los microorganismos mesófilos aerobios y de la vida útil del huevo líquido pasteurizado?

- Problemas específicos

- ¿Cuáles son los los parámetros cinéticos del crecimiento de los microorganismos mesófilos aerobios en el huevo líquido pasteurizado conservado a temperaturas -10°C , 0°C y 10°C mediante el modelo primario Barangy y Roberts.
- Cómo es el estado fisiológico de los microorganismos mesófilos aerobios presente en el huevo líquido pasteurizado conservado a -10°C , 0°C y 10°C .
- Cuáles son las características de la cinética de adaptación de los microorganismos mesófilos aerobios presente en el huevo líquido pasteurizado sometido a temperaturas de -10°C , 0°C y 10°C .
- De qué forma el modelo secundario de Arrhenius permitirá determinar el tiempo de vida útil del huevo líquido pasteurizado y conservado a 4°C .

1.3. Objetivos

- Objetivo General

Determinar el efecto térmico de -10°C , 0°C y 10°C , sobre el crecimiento de microorganismos mesófilos aerobios del huevo líquido pasteurizado para la estimación de la vida útil mediante el modelo de Arrhenius.

- Objetivos específicos

- Determinar los parámetros cinéticos del crecimiento del grupo de microorganismos mesófilos aerobios a temperaturas dinámicas de -10°C , 0°C y 10°C mediante el modelo primario Barangy y Roberts.
- Determinar el estado fisiológico de los microorganismos mesófilos aerobios presente en el huevo líquido pasteurizado congelado.



- Caracterizar la cinética de adaptación (Fase Lag) de los microorganismos mesófilos aerobios presente en el huevo líquido pasteurizado congelado.
- Determinar la velocidad de crecimiento de los microorganismos mesófilos aerobios a temperaturas de abuso de 15 °C, 25 °C y 35 °C para obtener el tiempo de vida útil del huevo líquido pasteurizado utilizando el modelo secundario de Arrhenius.

1.4. Limitaciones de la investigación.

El proyecto finalizó aceptando las hipótesis planteadas; sin embargo los resultados son válidos en la medida que los resultados de los procesos de pasteurización experimental comparados con los resultados de un pasteurizador de leche ajustado técnicamente para elaborar huevo líquido dieron resultados semejantes sin diferencia estadísticamente significativa.

La inferencia estadística de la vida útil del huevo líquido dependió de las variables población microbiana en función del tiempo, de tal forma que el factor equipo de pasteurización permitió asociar temperatura en función del tiempo. Ésta situación limitó a realizar el experimento con la variable temperatura/tiempo que son constantes y la variable poblacional de los mesófilos aerobios, y a partir de esa relación obtener una variable dinámica poblacional y temperaturas de almacenamiento para emplear un modelo matemático secundario.

La falta de datos o de datos confiables probablemente es un aspecto que puede limitar el alcance del análisis de los resultados y puede ser un obstáculo significativo para encontrar una tendencia, generalización o relación significativa. Ésta falta de datos a nivel de la industria nacional de ovoproductos es escasa o limitada al uso de las variables experimentales o no son confiable debido a que la determinación de sus límites críticos de su sistema HACCP no es confiable.

El acceso a las plantas de procesamiento de elaboración de huevo líquido tubo muchas limitaciones debido a que la operatividad de los pasteurizadores no pueden ser modificados en sus parámetros operativos. No están predispuestas a estudios de investigación y sólo se dedican a actividades de producción.

Existió dificultades por el tiempo disponible para investigar el problema y medir el cambio o la estabilidad en el tiempo para la recolección de datos a causa de la fecha de vencimiento de presentación de informes parciales para el cumplimiento de asignación de proyectos, dejando muchas veces de tener la continuidad del evento a observar y la recolección de datos en forma completa.

La falta de estudios previos de investigación sobre el tema y uso de las herramientas de la microbiología predictivas, que describe el fenómeno en función de la obtención de parámetros cinéticos determinados por el uso de modelos primarios como el de Barangy & Roberts y el modelo secundario de Arrhenius.

Estas limitaciones nos permitieron tener la oportunidad para identificar nuevas brechas en la literatura y consecuentemente generar nuevas investigaciones.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes Internacionales

Las industrias de ovoproductos nacen por la demanda de otras industrias cuya materia prima para la elaboración de sus productos es el huevo, el cual tiene una vida útil corta, y puede ser contaminado por bacterias como *Salmonella* principalmente. Los huevos son importantes por las propiedades nutritivas y funcionales que éstos aportan a los productos a los que se adicionan. Además se suma el aumento de consumo de platos preparados y/o precocinados en los que se incluye el huevo (entero, yema, clara), como ingrediente.



La elaboración de ovoproductos requiere una serie de procesos tecnológicos que van desde los tratamientos de la materia prima (pretratamientos) a la elaboración de los distintos tipos de ovoproductos los cuales tienen como condición mostrar en todo momento principios de inocuidad. Todos los ovoproductos se deben pasteurizar e inmediatamente refrigerar a temperatura de 4 °C y para conservarlo más tiempo se recurre a temperaturas menores de -18 °C.

El peligro biológico es considerado el principal elemento de la pérdida de su vida útil del huevo líquido pasteurizado desde cuando es materia prima, que es el huevo, Loaiza et al. (1) "detectaron bacterias contaminantes en los huevos comerciales y algunas de ellas potencialmente patógenas para los humanos, especialmente para niños, ancianos, inmuno comprometidos como *Bacillus sp* 23.5%, *Enterobacter sp.* 18.3% (*aerogenes, agglomerans, cloacae, gergoviae, sakazakii, taylorae, vulneris*), *Pseudomonas* 26.21%, *Aeromonas sp*, 1.12%, *E. coli* 7.1%, y *S. aureus* 2.4%".

La microbiota inicial del huevo líquido consta de una mezcla variada de bacterias Gram positivas y Gram negativas que provienen de diferente origen. Zárate, 2009 (59). Unos vienen a partir de la cáscara, que con frecuencia está contaminada con materia fecal, otros de huevos contaminados, así como también del material y superficies utilizadas en el tratamiento (como equipo, utensilios para romper los huevos, tuberías, bombas, filtros, batidoras, y tanques de recepción) y de los manipuladores de alimentos. Evidencias científicas demostraron el cumplimiento de las actividades para realizar la limpieza del huevo considerando que es un depósito de bacterias alterantes. Kuda et ál. (2) "valoraron la importancia de un apropiado lavado y sanitizado en las superficies y utensilios que contienen restos, ya sea de yema, clara, o ambas, durante la producción de los ovoproducto"; así mismo, McNeill et al. (3) Kubota et ál. (4), consideraron "relevante de que los microorganismo presentes en la cáscara de huevos que además de ser patógenos, se adhieren y forman biopelículas causando la transmisión del patógeno al alimento"

El tratar de llevar un producto con mínima posibilidad de trasladar un microorganismo patógeno o con poblaciones bacterianas mínimas hace que la limpieza y desinfección haga uso de desinfectantes que muchas veces no son eficaces por el tipo de microorganismo que forma la biopelícula, como se demuestra con los estudios de Takahashi *et ál.* (5), mencionan que “las biopelículas formadas por *Pseudomonas aeruginosa* tienen resistencia contra los desinfectantes”; así como también “para *Listeria monocytogenes* (6) y *Staphylococcus aureus* (7)”.

Los ovoproductos a medida que se trasladan por el proceso de su elaboración deben garantizar la exclusión de todo tipo de patógeno y es así que uno de los tratamientos que garantiza la eliminación de éste tipo de microorganismo es la pasteurización, de tal forma que *Salmonella* es el patógeno objetivo para el cual fueron diseñados los tratamientos de pasteurización de los huevos. Afortunadamente, el grupo de *Salmonella* no es especialmente termorresistente. Sin embargo, en los ovoproductos, rodeadas de proteínas y grasas, su termorresistencia aumenta. Forsythe (8), indica que “los tiempos y las temperaturas que destruyen a este patógeno coinciden o están próximos a las temperaturas que afectan de modo perjudicial a las propiedades físicas y funcionales de los ovoproductos. Las temperaturas de pasteurización recomendadas para los huevos líquidos que no se les añadieron aditivos alimentarios varían de 55.6 a 69°C, y los tiempos de exposición varían de 10 a 15 minutos. Las temperaturas más bajas y los tiempos más cortos aumentan el riesgo de supervivencia de *Salmonella*, mientras que las temperaturas más altas y los tiempos más prolongados aumentan el daño a las propiedades funcionales del huevo”.

Shafi *et al.* (9) reportaron que “en los huevos líquidos, la pasteurización reduce el recuento de mesófilos aerobios en 100 a 1,000 veces, generalmente hasta 100 UFC/g. Los microorganismos sobrevivientes son en su mayor parte *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y unos pocos bacilos Gram negativos”. Payne *et al.* (10), averiguaron que “los microorganismos más importantes

después del calentamiento a 65°C durante 3 minutos eran *Microbacterium lacticum* y *Bacillus* spp. Ninguno de los aislamientos fue capaz de crecer a 5°C, pero varios fueron capaces de crecer con rapidez relativa a 10 y a 15°C”.

Kline et al. (11) demostró que “en los intervalos de temperaturas de 54.4°C a 56.7°C, una elevación de 2°C de la temperatura aumenta el daño 2.5-3 veces de las proteínas del huevo líquido, mientras que el porcentaje de destrucción de *Salmonella* solo aumenta 2 veces. La cinética de la pérdida de calidad frente a la destrucción de *Salmonella* junto con la formación de material coagulado en las placas del pasteurizador a temperaturas más elevadas, hace improbable que la clara de huevo inalterada fuera pasteurizada a temperaturas superiores a 60°C”.

La velocidad del crecimiento de *Salmonella*, en los ovoproductos, es rápido originando grandes poblaciones debido a las bondades que le ofrece el alimento. Las poblaciones del patógeno se incrementarán cuando el proceso de elaboración transcurre dentro de un manejo en donde la temperatura es dinámica, representan un serio peligro para el consumidor. Bradshaw et al. (12); Clay et al. (13), demostraron que “el huevo líquido pasteurizado almacenado a 10, 15, 20 y 25°C incrementaron en 5 ciclos logarítmicos el crecimiento de *Salmonella* en huevo entero, albumen y yema con azúcar. Otros autores han reportado el crecimiento en 2-5 ciclos logarítmicos de otros serotipos de *Salmonella* a temperaturas de 10 y 15°C respectivamente. Este mismo incremento se observó a temperaturas de 30, 37 y 42°C en huevo entero y yema con azúcar”.

Luego del tratamiento térmico de pasteurización el ovoproducto sufre un choque térmico de 4 °C, que si bien disminuye la población microbiana quedan aún microorganismos sobrevivientes. Si los parámetros de pasteurización no están debidamente aplicados y controlados es probable que células alterantes o patógenas puedan mantenerse viables durante el proceso de conservación a 4 °C. McMeekin et al. (14), reportaron que “las cinéticas de crecimiento e

f

inactivación de Salmonella entérica serotipo Typhimurium DT104 en distintas temperaturas de almacenamiento para huevo entero, albumen, yema con azúcar al 10% y yema con sal al 10%, demostraron una lenta inactivación de S. entérica var. Typhimurium conservados a 4°C logrando una reducción menor a 0.6 ciclos logarítmicos e indican que la contaminación en productos refrigerados y congelados posiblemente se deba a una contaminación postpasteurización”.

La termoresistencia de las bacterias está influido por el pH, por lo tanto las bacterias son resistentes cerca de su pH óptimo de crecimiento y menos resistentes a medida que este pH se desvía de ese óptimo. “Un huevo de gallina recién puesto tiene un pH comprendido entre 7.8 - 8.2. A medida que el huevo envejece, el pH se eleva hasta 9.1-9.6. Se ha indicado que ajustando el pH de la clara de huevo desde su nivel normal próximo a 9 a un valor comprendido en la escala 6.5- 6.7, aumenta al mismo tiempo la estabilidad de la clara de huevo y de Salmonella al calor, pero la estabilidad de Salmonella aumenta menos que la de la clara de huevo” (15).

El deterioro del huevo líquido comúnmente es debido a contaminaciones post-pasteurización teniendo en cuenta a las bacterias no formadoras de esporas psicotolerantes que se originan por calentamiento inadecuado o post-pasteurización. “Los microorganismos predominantes que sobreviven a la pasteurización son bacterias Gram-positivas, tales como Streptococcus, Enterococci y esporas de Bacillus (16). Sin embargo, las especies de Bacillus son las principales bacterias involucrada en eventos de deterioro del huevo entero líquido pasteurizado. Las esporas de Bacillus están presentes en niveles bajos en los productos de huevo pasteurizados, resisten la etapa de pasteurización. Dentro de éste género “B. cereus, es capaz de multiplicarse en el huevo entero líquido provocando eventos enzimáticos de deterioro. Estas bacterias son difíciles de eliminar debido a su resistencia al calor y sus fuertes capacidades de adherencia, que les permiten formar biofilms en

superficies industriales. Finalmente, algunas cepas psicrotróficas pueden crecer a temperaturas alrededor de 4 a 6 °C (17).

Nacional

Las referencias bibliográficas existentes mayoritariamente están enfocadas al proceso de elaboración del huevo líquido, priorizando mantener las propiedades de la matriz del huevo (clara y yema) y de ésta forma cumplir con los criterios de inocuidad aplicando temperaturas de pasteurización y choque térmico 4 °C al producto.

Durante las operaciones para la obtención del huevo líquido pasteurizado, el principal foco de contaminación se produce durante el cascado, Muñoz (18) "determinó que en la etapa del cascado del huevo los niveles altos de contaminación que se producen disminuyen las propiedades de formación de espuma. El proceso de pasteurización tuvo la finalidad de disminuir la carga microbiana y a la vez incrementar las propiedades funcionales".

Otros tipos de huevos como las de codornices también buscan su conservación utilizando diversos tratamientos como las conservas. "Se evaluó el efecto de sales y conservantes orgánicos en conserva de dicho huevo, durante su almacenamiento. Las mejores puntuaciones de las características sensoriales fueron las de 2% de sales con 0,25% de ácido cítrico y de 3% de sales con 0,25% de ácido málico. Esta alternativa de conservación incrementa en 8 meses la vida útil del producto con características sensoriales y microbiológicas apropiadas para la comercialización" (19).

En un estudio realizado por Kobashikawa (20), "concluyó que los ovoproductos exportados fueron utilizados por su capacidad de formación de espuma, propiedades de gelificación, emulsificación, coagulación, poder ligante, capacidad de retención de agua, color, entre otros. Sin embargo, se observó que existen muchas aplicaciones que aún no han sido exploradas y

A

por lo tanto, existe un gran reto para aprovechar todas las propiedades tecnofuncionales de cada fracción del huevo”.

La comprensión de los parámetros que rigen el crecimiento de los microorganismos alterantes y patógenos en los alimentos puede ser útil para determinar su supervivencia, crecimiento y comportamiento en los alimentos y en el control de su proliferación. Los factores responsables del crecimiento microbiano pueden ser estudiados efectivamente con la ayuda de modelos predictivos (21,22).

La microbiología predictiva utiliza una combinación de matemática, estadística y microbiología para predecir cuantitativamente el comportamiento de las poblaciones microbianas, resultando adecuados para la caracterización de representantes típicos de las poblaciones microbianas (23). Se han propuesto una serie de funciones matemáticas para describir las curvas sigmoides y se han utilizado para modelar el crecimiento en lotes de cultivos microbianos (14).

Las aproximaciones modernas de la Microbiología Predictiva de Alimentos han tratado de entender y establecer un vínculo entre el crecimiento de microorganismos y los factores que regulan el crecimiento tales como la temperatura, pH, actividad de agua, potencial redox, etc. La gran mayoría de los modelos secundarios son modelos de tipo cinético (24,26), de los cuales el más comúnmente usado ha sido el modelo de Arrhenius.

El uso de modelos predictivos para predecir el comportamiento de microorganismos frente a factores intrínsecos y extrínsecos ha sido más estudiada en el caso de los patógenos, sin embargo, son más reducidas las investigaciones que han desarrollado modelos predictivos referentes al comportamiento de microorganismo alterantes en alimentos (27) entre estos estudios encontramos el realizado por Rodríguez et al. (28); en el que evaluó el comportamiento del crecimiento de alterantes como *Leuconostoc mesenteroides*.

Diversas técnicas de predicción utilizando modelos matemáticos se aplican en la medida del crecimiento bacteriano y su correlación con factores extrínsecos. Zwietering et al. (29), "compararon varias funciones sigmoideas (logística, Gompertz, Richards, Schnute y Stannard) para describir una curva de crecimiento bacteriana. En los casos probados, la ecuación modificada de Gompertz fue estadísticamente suficiente para describir los datos de crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y fue fácil de usar".

El crecimiento de los microorganismos en los alimentos se ve afectado tanto por factores intrínsecos como por factores extrínsecos como la temperatura, el pH, el nitrito de sodio, el cloruro de sodio, la actividad del agua, los antimicrobianos y las condiciones de envasado en atmósfera modificada (30).

Fu et. al (26) utilizó ecuaciones de Arrhenius y de raíz cuadrada para modelar el crecimiento de *Pseudomonas fragi*. Los modelos permitieron observar un efecto negativo significativo en la tasa de crecimiento de *P. fragi*., mientras que el efecto histórico fue positivo en la fase de retraso, en ciertas condiciones no isotérmicas.

Actualmente el uso de la microbiología predictiva es útil para realizar estudios de crecimiento en situaciones no convencionales utilizadas para la conservación de los alimentos. Tradicionalmente se estima que la conservación a bajas temperaturas es una garantía para el control de los microorganismos, sin embargo, las investigaciones en estas condiciones de temperatura demuestran crecimientos significativos.

Ohkochi et al. (31) "examinó la cinética de crecimiento de *Listeria monocytogenes* y flora natural en huevo líquido pasteurizado producido comercialmente a 4.1 a 19.4 °C, Los datos cinéticos experimentales se ajustaron al modelo de Baranyi y se estimaron los parámetros de crecimiento, tales como la tasa de crecimiento específico máximo (μ_{max}), la densidad de población máxima (N_{max}) y el tiempo de retraso (λ). Como resultado de la

estimación de estos parámetros, encontramos que *L. monocytogenes* puede crecer sin problemas por debajo de 12.2 °C. Estos resultados sugieren que el modelo desarrollado aquí puede usarse para estimar la cinética y el rango de crecimiento de *L. monocytogenes* en huevos líquidos pasteurizados bajo temperatura refrigerada”.

Singh (32) desarrolló y validó un modelo dinámico para el crecimiento de *Salmonella* spp. en el huevo entero líquido bajo temperatura variable. Los datos de crecimiento a cada temperatura se ajustaron al modelo primario de Baranyi para estimar las tasas máximas de crecimiento correspondientes. Las tasas máximas de crecimiento obtenidas se representaron gráficamente en función de la temperatura y se modelaron usando el modelo Ratkowsky modificado. El modelo dinámico desarrollado fue validado para dos perfiles sinusoidales de temperatura, 5-15°C y 10-40°C y puede usarse para predecir el crecimiento de *Salmonella* spp. en huevo entero líquido bajo condiciones variables de la temperatura.

Los modelos secundarios se utilizan para modelar el impacto de las condiciones ambientales, como Temperatura, pH, actividad del agua y factores responsables del crecimiento de bacterias sobre los valores de los parámetros de un modelo primario. Tasa máxima de crecimiento específico μ_{max} y el tiempo de latencia (λ) son dos parámetros más importantes en el modelado de bacterias (30).

Dentro de los modelos secundarios destacamos el modelo de Arrhenius. Esta ecuación es una expresión matemática que se utiliza para comprobar la dependencia de la constante de velocidad (o cinética) de un crecimiento microbiano con respecto a la temperatura a la que se lleva a cabo dicho crecimiento. La ecuación de Arrhenius fue originalmente usada para describir cómo la velocidad de una reacción química podía variar en función de la temperatura (33). Esta ecuación aporta el cálculo de la energía de activación (E_a) dada en KJoule/mol y el factor pre exponencial A que es una constante.

Al calcular la energía de activación, se logra determinar la sensibilidad que cada microorganismo presenta frente a los cambios térmicos.

Huang et al. (34), desarrolló un modelo matemático para evaluar el efecto de la temperatura y la tasa de crecimiento microbiano combinando Arrhenius y la de Eyring-Polanyi, el cual fue validado usando una colección de 23 curvas de temperatura-crecimiento incluyendo *Pseudomonas* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, y *Escherichia coli*. El modelo se compara favorablemente con el Ratkowsky y la ecuación de Eyring. Sugiere que el modelo puede ser utilizado para describir la relación inherente entre Temperatura y tasas de crecimiento microbiano.

Los parámetros experimentales y ambientales de un modelo pueden aplicarse para un producto en especial. De estos, la temperatura es normalmente considerada como el factor más importante en las reacciones de deterioro de los alimentos, especialmente, para la alteración microbiana donde la velocidad de crecimiento específico y la fase de latencia son altamente dependientes de la temperatura (35).

2.2 Bases teóricas

Modelo primario de Baranyi y Roberts

El modelo propuesto por Baranyi y Roberts (1994), descrito en la ecuación (2), es uno de los más extendidos para el modelado del crecimiento microbiano en la actualidad. Este modelo describe el crecimiento como una cinética de primer orden de ratio $\mu(t)$, que varía en función de las condiciones ambientales y según la fase en que se encuentre la población. Durante la fase exponencial este coeficiente es igual a μ_{max} , mientras que durante las fases de adaptación y estacionaria se reduce por medio de los coeficientes $\alpha(t)$ y $\gamma(t)$, ambos comprendidos entre cero y uno.



En este modelo se describe la fase de adaptación asumiendo que existe una sustancia ficticia P(t) que hace de cuello de botella. El crecimiento de esta sustancia sigue una cinética de Michaelis-Menten, lo que se ve reflejado en el parámetro $\alpha(t)$ tal y como define la ecuación (1).

Modelo de Barangy y Roberts

$$y(t) = y_{max} + \text{Ln} \left[\frac{-1 + \exp(\mu_{max} \cdot \lambda) + \exp(\mu_{max} \cdot t)}{-1 + \exp(\mu_{max} \cdot t) + \exp(\mu_{max} \cdot \lambda + y_{max} - y_0)} \right] \quad (1)$$

Modelo secundario de Arrhenius

La ecuación de Arrhenius fue derivada empíricamente basada en consideraciones termodinámicas (Labuza et. al. (37) "describe la velocidad con que una reacción cambia cuando se emplean diferentes temperaturas conocidas (38). La forma más simple de esta ecuación es:

$$K = A e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad \text{o} \quad \text{Ln}k = \text{Ln}A - \frac{E_a}{RT} \quad (2)$$

Donde, k es la velocidad de reacción; A {(ufc/ml, g o cm²)/tiempo} es un factor pre-exponencial –parámetro a ser determinado (intercepto de "y" en una gráfica de Ln k vs 1/T) –, R es la constante de los gases (8.314 J mol⁻¹ K⁻¹), T es la temperatura absoluta (K), y Ea es denominada como la energía de activación de la reacción límite de velocidad-crecimiento (38).

"Si en la ecuación anterior los valores de k son calculados a diferentes temperaturas y si el lnk es graficado contra 1/T, puede obtenerse una línea recta en la cual la pendiente (m) es igual $-E_a/R$ " (24, 37, 39).

Cuando "el modelo de Arrhenius es empleado para evaluar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento microbiano, entonces k se transforma en la

velocidad de crecimiento específico" (38, 35), y la ecuación de Arrhenius puede escribirse como:

$$\mu = Ae^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (3)$$

2.3. Conceptual

La información obtenida de esta investigación apoya la idea de que la conservación del huevo líquido pasteurizado conservados a bajas temperaturas pueden alterarse por la presencia de microorganismos mesófilos aerobios sobrevivientes al proceso de altas temperaturas y choque térmico frío. Desafortunadamente existe el constructo teórico que indica que a menor temperatura de conservación del ovoproducto mayor es el control de los microorganismos alterantes y aún se sigue usando sin haber sido adecuadamente definido operacionalmente en base a parámetros que son realizados por mecanismos y herramientas multimedia de la microbiología predictiva. Dado este vacío, en este estudio se propone considerar la velocidad de crecimiento, tiempo a adaptaciones a situaciones de estrés y estados fisiológicos de los microorganismos mesófilos para caracterizar su crecimiento y poder establecer los criterios para estimar la vida útil.

2.4 definición de términos básicos funcionales a la investigación del problema

Microbiología predictiva en alimentos (MPA)

Se puede definir como el conocimiento detallado de las respuestas de crecimiento de los microorganismos presentes en los alimentos frente a los factores medioambientales que les afectan. Si la ecología microbiana de una operación de procesado o un producto alimentario son conocidos durante la distribución o almacenamiento, la supervivencia y/o crecimiento de un microorganismo de interés puede ser estimado, en base a una relación matemática entre la velocidad de crecimiento microbiana y las condiciones medio ambientales. Esto significa que se puede estimar la calidad y seguridad alimentaria monitorizando las condiciones de almacenamiento (temperatura, atmósfera gaseosa, etc.), o las propiedades intrínsecas del alimento (a_w , valor

18

de pH, etc.) y posteriormente, aplicando una base de modelos predictivos (40). La microbiología predictiva se basa en la premisa de que las respuestas de las poblaciones de microorganismos a los factores ambientales son reproducibles y de este modo es posible, desde observaciones realizadas, predecir las respuestas de esos microorganismos en otras condiciones similares (23).

Estado fisiológico (h_0)

Es la cantidad inicial de trabajo a realizar para adaptarse a las nuevas condiciones de crecimiento. Si hay algún trabajo que hacer, este trabajo se lleva a cabo progresivamente a una cierta velocidad, y cuando el trabajo se completa, la población entra en la fase de crecimiento exponencial. En cualquier momento, las fluctuaciones en el entorno pueden modificar la velocidad a la que se realiza el trabajo, pero también pueden aumentar la carga de trabajo. Por lo tanto, el sistema debe reiniciarse con un nuevo valor para comenzar un nuevo período de latencia. $h(t)$ cuantifica la cantidad de trabajo que queda por hacer en el tiempo t , durante la adaptación, donde $h(0) = h_0$ es el valor inicial para cualquier tiempo cero elegido arbitrariamente. La relación entre la cantidad de una sustancia crítica (q) y la preparación teórica para crecer (α) con la cantidad de trabajo a realizar durante la fase de retraso (h) es:

$$h(t) = -\ln[\alpha(t)] = -\ln\left[\frac{q(t)}{1 + q(t)}\right] \quad (4)$$

La fase de latencia.

Es el resultado de una serie de procesos que tienen lugar cuando la célula se adapta a las nuevas condiciones. Si las células no están preparadas para crecer o la adaptación es lenta, la fase de latencia será duradera. "Es el tiempo de ajuste por el cual las células bacterianas se modifican por si mismas para sacar ventaja del nuevo ambiente e iniciar el crecimiento exponencial" (41).



“Las células se adaptan a su nuevo entorno induciendo o reprimiendo la síntesis y actividad de determinadas enzimas, iniciando la replicación de su material genético, y en el caso de las esporas, diferenciándose en células vegetativas” (42). Se considera tres fases que tienen una correspondencia directa con las fases definidas inicial, transición y exponencial que quedan expresadas de la siguiente manera:

1. Fase inicial ($F_{I(N)}$), $t \leq t_1$

$$N = N_0 \quad (5)$$

2. Fase de Transición ($F_{T(N)}$), $t_1 \leq t \leq t_2$

$$N = N_0 \cdot e^{a/2 \cdot (t-t_1)^2} \quad (6)$$

3. Fase Exponencial (F_{EXP}), $t \geq t_2$

$$N = N_0 \cdot e^{a/2 \cdot (t-t_1)^2} \cdot e^{\mu_{EXP} \cdot (t-t_2)} \quad (7)$$

donde, t_1 es el momento en el que tiene lugar la primera división y cuando, por lo tanto, la cultura entra en la llamada fase de transición, y t_2 es el comienzo de la fase exponencial.

Tiempo de generación

El tiempo de generación es el tiempo necesario para que se duplique una población bacteriana. Según Stanier y col (43) lo define como “el tiempo requerido para que todos los componentes del cultivo aumenten en un factor de 2. Durante este periodo de generación el número de células y la masa celular se duplica”. Muchas bacterias tienen tiempos de generación de 1-3

horas, conociéndose pocos microorganismos que crezcan muy rápidamente dividiéndose en menos de 10 minutos. Otras tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días en condiciones más o menos cercanas a las óptimas. "El tiempo de generación es útil como indicador del estado fisiológico de una población celular, y es usado con frecuencia para comprobar el efecto negativo o positivo de un determinado tratamiento sobre un cultivo bacteriano". (44).

Velocidad de crecimiento

El crecimiento se define como un incremento del número de células microbianas o de la masa microbiana en una población. En consecuencia, "la velocidad de crecimiento es el cambio en número de células o de la masa celular por unidad de tiempo" (45). "Un cultivo microbiano creciendo en equilibrio imita una reacción autocatalítica de primer orden, es decir, la velocidad del aumento de bacterias en un tiempo dado es proporcional al número o masa de bacterias presentes durante ese tiempo" (43). La tasa del crecimiento exponencial (velocidad) de un microorganismo influyen dos conjuntos de factores: las condiciones ambientales (temperatura, pH, composición del medio), y las características genéticas del microorganismo (44).

Tasa máxima de crecimiento (μ_{max})

Es la velocidad máxima de crecimiento microbiano por unidad de tiempo. Es un parámetro tan constante como lo es el tiempo de generación y depende exclusivamente del microorganismo y de las condiciones del medio de crecimiento. El valor μ_{max} puede calcularse gráficamente, a partir del ángulo formado por la tangente y el eje de las abscisas en la recta imaginaria que coincide con la porción recta de la curva de crecimiento y matemáticamente puede calcularse de la siguiente manera:

$$\mu_{max} = (\ln X - \ln X_0) / (TX - Lag) \quad (8)$$

dónde: $\ln X_0$ es la concentración microbiana inicial, $\ln X$ es la concentración microbiana en un momento determinado del crecimiento exponencial y T_x el tiempo transcurrido desde la inoculación hasta el momento del recuento que da X y, Lag , fase de latencia.

Coeficiente de determinación (R^2)

El R^2 da una idea del ajuste total conseguido, midiendo la fracción de la variación, alrededor de la media, que es explicada por el modelo, es decir mide la proporción de la variabilidad total de la variable dependiente respecto a su media que es explicada por el modelo de regresión. El valor más cercano a 1 significa una mejor predicción obtenida por ese modelo (46).

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1. Formulación de la hipótesis

- Hipótesis general:

La determinación del efecto térmico sobre la cinética del crecimiento de los microorganismos mesófilos aerobios en el huevo líquido pasteurizado permitirá estimar el tiempo de vida útil mediante el modelo de Arrhenius.

- Hipótesis específicas

1. Los parámetros cinéticos del crecimiento de los microorganismos mesófilos aerobios obtenidos mediante el modelo primario Barangy y Roberts. se modifican por efecto de temperaturas de $-10\text{ }^\circ\text{C}$, $0\text{ }^\circ\text{C}$ y $10\text{ }^\circ\text{C}$.

2. El estado fisiológico de los microorganismos mesófilos aerobios presente en el huevo líquido pasteurizado es dependiente de la temperatura.
3. La cinética de adaptación (Fase Lag) de los microorganismos mesófilos aerobios presente en el huevo líquido pasteurizado es función de la temperatura.
4. El tiempo de vida útil del huevo líquido pasteurizado determinado por el modelo de Arrhenius está relacionado a la velocidad del crecimiento de los microorganismos mesófilos aerobios.

3.2. Definición conceptual de variables:

Variable Independiente:

Efecto térmico: es la condición experimental que se manipulará y causará cambios en la cinética del crecimiento de los microorganismos mesófilos aerobios del huevo líquido pasteurizado

Variable Dependiente:

La estimación de la vida útil: es la variable que depende de los valores de los parámetros cinéticos del crecimiento de los microorganismos mesófilos aerobios presentes en el huevo líquido pasteurizado, como respuesta al efecto de la temperatura para ser modelado con la ecuación de Arrhenius



3.2.1. Operacionalización de variables:

VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADORES	INDICES	METODO	TECNICA
Dependiente Vida útil	Conservación	Tiempo del crecimiento o microbiano	Velocidad de crecimiento o microbiano	Abuso de temperaturas	Cálculo Energía activación (Ea) Modelamiento Arrhenius
Independiente Efecto térmico -10 °C, 0 °C, 10 °C	Factor de crecimiento	Resistencia, inhibición o muerte celular Log UFC/mL	μ_{max} = Log UFC/g/h λ = Horas Tg= Horas	Numeración de Mesófilos aerobios en medios de cultivo	Cultivo en placa Siembra por inmersión Numeración en Placa Modelo de Barangy y Roberts

IV. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1. Tipo y diseño de la investigación

La investigación realizada es de tipo experimental y su diseño se caracteriza por establecer 3 grupos experimentales que recibieron tratamientos de temperaturas -10 °C, 0 °C y 10 °C.

El diseño experimental se esquematiza de la siguiente manera:

Grupo experimental	Tratamiento	Medición de la variación
Ge 1	X ₁	O ₁ , O ₂ O ₃ ...O _n
Ge 2	X ₂	O ₁ , O ₂ O ₃ ... O _n .
Ge 3	X ₃	O ₁ , O ₂ O ₃ ... O _n

4.2. Método de Investigación.

Se utilizó el método de investigación empírica que dirigió la investigación a utilizar una serie de procedimientos experimentales prácticos con el objeto de revelar el comportamiento de microorganismos aerobios mesófilos que sobreviven a los procesos de la pasteurización en el huevo líquido cuyas características fundamentales y sus relaciones esenciales de puedan modificar y que pueda ser accesibles a la observación sensorial.

La investigación empírica permitió hacer investigación referente a su problemática, tomando experiencias de otros investigadores, para poder realizar el análisis previo de la problemática y de ésta forma verificar y comprobar los conceptos o criterios teóricos y sus relaciones de causalidad, apoyándose en la observación y la experimentación.

Parte de la investigación utilizó el método de la modelación que opera en forma práctica o teórica con un objeto, no en forma directa, sino utilizando cierto sistema intermedio, auxiliar, natural o artificial. En éste método se crean abstracciones con el objetivo de explicar la realidad. Los modelos utilizados analizaron el número, cantidad o extensión del crecimiento de los microorganismos mesófilos aerobios en el huevo líquido pasteurizado almacenado a bajas temperaturas, que permitió a la comprensión del funcionamiento del ovoproducto y se resuelve a través de los números, es decir las matemáticas.

Los métodos empleados se valieron de la relación de los factores intrínseca y extrínseca del huevo líquido pasteurizado que determinan su estructura y su dinámica. De ésta forma la investigación experimentó la dinámica de crecimiento de bacterias presentes en el huevo líquido pasteurizado a temperaturas de refrigeración y congelación y por cada una de ellas, se obtuvo parámetros cinéticos del crecimiento: Velocidad de crecimiento (μ_{max}), Tiempo de latencia (λ) y Tiempo generacional (T_g) utilizando el modelo Barangy y Roberts.

Para la estimación del tiempo de vida útil se elaboraron curvas de crecimiento a temperaturas de abuso de 15, 25 y 35 °C que permitieron determinar la velocidad de crecimiento (μ_{max}) para la obtención de la energía de activación (E_a) y determinar el tiempo de vida útil según el modelo secundario de Arrhenius.

4.3. Población y Muestra

Población

La población está representada por 6 litros de huevo líquido pasteurizado que sirvieron de sustrato para los fines experimentales del presente estudio.

Muestra

Para efectos de la investigación la muestra a obtenerse fue del mismo tamaño de la población en donde todo el volumen de huevo líquido pasteurizado obtenido tuvo posibilidad de ser ensayada manteniendo poblaciones microbianas convenientemente distribuidas que permiten hacer generalizaciones a partir de los resultados de la muestra con respecto a la población microbiana.



4.4. Lugar de estudio y periodo desarrollado

Laboratorio de Ciencias. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional del Callao. Periodo 2017-2019

4.5. Técnicas e instrumentos para la recolección de la información

4.5.1. Análisis microbiológico del huevo líquido pasteurizado con choque térmico de 4 °C y almacenado a 4 °C.

Muestras de 1 litro de huevo pasteurizado con choque térmico a 4 °C, almacenado a la misma temperatura, se tomaron de cada lote de producción durante 12 meses, para determinar el número de UFC/mL de Mesófilos aéreos, enterobacterias y bacterias ácido lácticas.

Para los análisis respectivos en las muestras del producto se siguieron las técnicas de Recuento en placa de aerobios mesófilos, enterobacterias y bacterias ácido lácticas (48).

4.5.2. Acondicionamiento del huevo líquido pasteurizado obtenido industrialmente.

Se dispuso de 6 litros de huevo líquido pasteurizado, proveniente de una industria de ovoproductos, los cuales fueron repartidos, en condiciones de esterilidad, en 3 matraces de vidrio estériles colocando 2 litros en cada uno.

Cada frasco con 2 litros de huevo líquido pasteurizado se almacenaron a temperaturas experimentales de -10 °C, 0 °C y 10°C, respectivamente; utilizando un congelador vertical GFL 6483, graduación 0 – 20 °C y cámara refrigeradora, EC4-10GD graduación 0 - 15 °C, 10 p³, Marca: So-Low.

4.5.3. Determinación de los parámetros cinéticos del crecimiento del grupo de microorganismos mesófilos aerobios a temperaturas: $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando el modelo primario Barangy y Roberts.

Se establecieron 3 grupos experimentales con las siguientes características:

Grupo experimental 1 (GE1) contiene 2 L huevo líquido pasteurizado y almacenado a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Grupo experimental 2 (GE2) contiene 2 L huevo líquido pasteurizado y almacenado a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Grupo experimental 3 (GE3) contiene 2 L huevo líquido pasteurizado y almacenado a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5.4. Obtención de las curvas de crecimiento.

Para cada grupo experimental, se dispuso de un matraz estéril de 3 L con tapa rosca en el cual se dispensó 2 L de huevo líquido pasteurizado, recién elaborado. Inmediatamente se retiró tres volúmenes (T_0) de 1 mL cada una luego, en forma separada, se depositaron en una placa estéril agregándole de inmediato 12 -15 mL de agar Plate Count (Merck). Se dejó en incubación en aerobiosis a temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 24 a 72 horas continuando con su respectiva numeración de colonias y cuantificación expresando el resultado en UFC/mL.

Transcurrido un periodo de 2 días se tomaron tres muestras de 1mL y se procede de la misma forma que el volumen T_0 . Se continúa tomando muestras cada 2 días hasta completar 12 iteraciones que cubrió un periodo de 24 días.

Los valores del crecimiento expresados en UFC/g fueron convertidos a Log UFC/mL y relacionados con el función del tiempo correspondiente para elaborar las curvas de crecimiento con la finalidad de lograr el ajuste de los datos con el modelo matemático de Barangy & Roberts contenido en el Programa DMfit COMBASE v.2017.

El ajuste de los datos experimentales para la obtención de la curva de crecimiento se realizó con del modelo de Barangy & Roberts que permitió obtener la fase de adaptación o fase Lag (λ), la tasa máxima de crecimiento exponencial (μ_m) y el tiempo de generación (T_g), como descriptores microbiológicos y de ésta manera poder ser utilizados en la predicción de la población existente, en un tiempo determinado, en el huevo líquido pasteurizado.

4.5.5. Caracterización de la cinética de adaptación (Fase Lag) de los microorganismos mesófilos aerobios presente en el huevo líquido pasteurizado conservado a -10, 0 y 10 °C.

El tiempo de latencia o fase de adaptación o fase Lag (λ) se obtuvo del ajuste de las curvas de crecimiento a -10, 0 y 10 °C utilizando el modelo matemático de Barangy & Roberts contenido en el Programa DMfit COMBASE v.2017.

4.5.6. Determinación del Estado fisiológico de los microorganismos mesófilos aerobios presentes en el huevo líquido pasteurizado conservado a -10, 0 y 10 °C.

Conociendo el periodo de tiempo necesario para cubrir la fase de latencia o adaptación y la velocidad del crecimiento se determinó el estado fisiológico de los microorganismos mesófilos aerobios presentes en el huevo líquido pasteurizado, frente a las condiciones de temperaturas de -10, 0 y 10 °C.

El estado fisiológico se estimó con la ecuación: $h_0 = 10^{(-\text{lag}(\lambda) * \mu_{\max})}$

4.5.7. Determinación del tiempo de vida útil del huevo líquido pasteurizado en función a los microorganismos mesófilos aerobios utilizando el modelo de Arrhenius

Se implementaron tres ensayos de crecimiento de los mesófilos aerobios presentes en el huevo líquido pasteurizado a temperaturas de abuso de 15,

25 y 35 °C con la finalidad de obtener la velocidad de crecimiento (μ) para cada temperatura.

Se graficó el $\text{Ln}\mu$ de cada temperatura y se relacionó con la inversa de cada temperatura absoluta ($1/T$).

Cuando se graficó de esta forma, la pendiente de la recta (m) que se obtiene es igual a: $-E_a/R$ (y que por tanto $E_a = -m \cdot R$, que en todos los casos será positiva); y el intercepto en el eje "y" cuando $X=0$ es el factor pre-exponencial en logaritmo ($\text{Ln}A$).

Una vez obtenidos los parámetros se procedió a calcular la velocidad de crecimiento (μ) a 4°C (277°K) reemplazando las constantes en la ecuación de Arrhenius.

Finalmente, se procedió a estimar la vida útil a 4°C, utilizando el valor límite permisible "m y M" exigido dentro de los Criterios microbiológicos por DIGESA. Considerar que por cada día se incrementa $X \text{ Ln ufc/ml}$ (recordemos que μ se obtiene del Ln ufc/ml vs tiempo (días), entonces el tiempo en se alcanzará el valor m ó M será el tiempo de vida útil

4.6. Análisis y procesamiento de datos.

- Calidad microbiológica del huevo líquido pasteurizado con choque térmico de 4 °C y almacenado a 4 °C.

Se obtuvieron 12 muestras de huevo líquido pasteurizado elaborado industrialmente a los cuales se les dio un tratamiento de Estadística descriptiva para obtener el promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación (%), que es una medida estadística que permite dar información sobre la dispersión relativa de las Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL) de los microorganismos mesófilos aerobios, presentes

en cada muestra mensual de huevo líquido pasteurizado. El cálculo de su valor proviene de la división de la desviación estándar entre el valor promedio del conjunto; y se expresa en porcentaje.

Se comparó el número de UFC/mL a las 24 y 48 horas en cada muestra analizada aplicando la distribución t (de Student) que determinó la diferencia entre dos varianzas muestrales de dos poblaciones pequeñas.

- Crecimiento de microorganismos mesófilos aerobios en huevo líquido pasteurizado conservado a 4 °C.

El Modelo de Barangy & Roberts, contenido en el programa ComBase, ajusta los datos experimentales reportando los parámetros de crecimiento y el estadístico coeficiente de correlación (R^2) que indica que estadísticamente los valores experimentales de UFC/mL bacteriano y Tiempo a temperatura constante de 4 °C, tienen alto nivel de confianza.

- Determinación de los parámetros cinéticos, del crecimiento de microorganismos mesófilos aerobios a temperaturas de -10 °C, 0 °C y 10°C, mediante el modelo primario Barangy & Roberts,

El Modelo de Barangy & Roberts, contenido en el programa ComBase, ajusta los datos experimentales reportando los parámetros de crecimiento y el estadístico coeficiente de correlación (R^2) que indica que estadísticamente los valores experimentales de UFC/mL bacteriano y Tiempo a temperaturas de -10 °C, 0 °C y 10 °C, tienen alto nivel de confianza.

- Caracterización de la cinética de adaptación de los microorganismos mesófilos aerobios presente en el huevo líquido pasteurizado conservado a -10, 0 y 10 °C.

AL

El ajuste de los datos experimentales por el modelo de Barangy & Roberts, presenta el tiempo de adaptación o latencia (λ) así como el correspondiente estadístico coeficiente de correlación (R^2) que indica que estadísticamente los valores experimentales de UFC/mL bacteriano y Tiempo a temperaturas de $-10\text{ }^\circ\text{C}$, $0\text{ }^\circ\text{C}$ y $10\text{ }^\circ\text{C}$, presentan típicos periodos de adaptación con alto nivel de confianza.

Las velocidades de crecimiento (μ_{\max}), que corresponden a las temperaturas de $-10\text{ }^\circ\text{C}$, $0\text{ }^\circ\text{C}$ y $10\text{ }^\circ\text{C}$, fueron comparadas mediante el Análisis de Varianza con un nivel de confianza $\alpha= 0.05$. Pone a prueba la hipótesis de que las medias de dos o más poblaciones son iguales. Se evaluó la importancia del factor temperatura al comparar las medias de la variable velocidad de crecimiento, en los diferentes niveles de temperaturas.

- La determinación del estado fisiológico (h_0) de los microorganismos mesófilos aerobios presente en el huevo líquido pasteurizado conservado a -10 , 0 y $10\text{ }^\circ\text{C}$, fue calculado a partir de la siguiente fórmula: $h_0 = 10^{(-\text{lag}(\lambda) * \mu_{\max})}$. Sus resultados fueron comparado mediante el Análisis de Varianza con un nivel de confianza $\alpha= 0.05$.

- Determinación del tiempo de vida útil del huevo líquido pasteurizado en función a los microorganismos mesófilos aerobios utilizando el modelo de Arrhenius

Se determinó la relación de las velocidades de crecimiento (μ Ln UFC/mL) y temperaturas de abuso de $15\text{ }^\circ\text{C}$, $25\text{ }^\circ\text{C}$ y $35\text{ }^\circ\text{C}$, expresadas en $1/^\circ\text{K}$ con la finalidad de obtener las energías de activación (E_a) y el factor pre-exponencial (A) que son las constantes del modelo de Arrhenius. El coeficiente de determinación (R^2) determinó que estadísticamente la relación μ (Ln UFC/mL) y $1/^\circ\text{K}$ tiene un elevado grado de confianza.

A partir de estos valores se calculó las constantes del modelo de Arrhenius que permitió la estimación del tiempo de vida útil de huevo líquido pasteurizado.

V. RESULTADOS

5.1. Resultados descriptivos

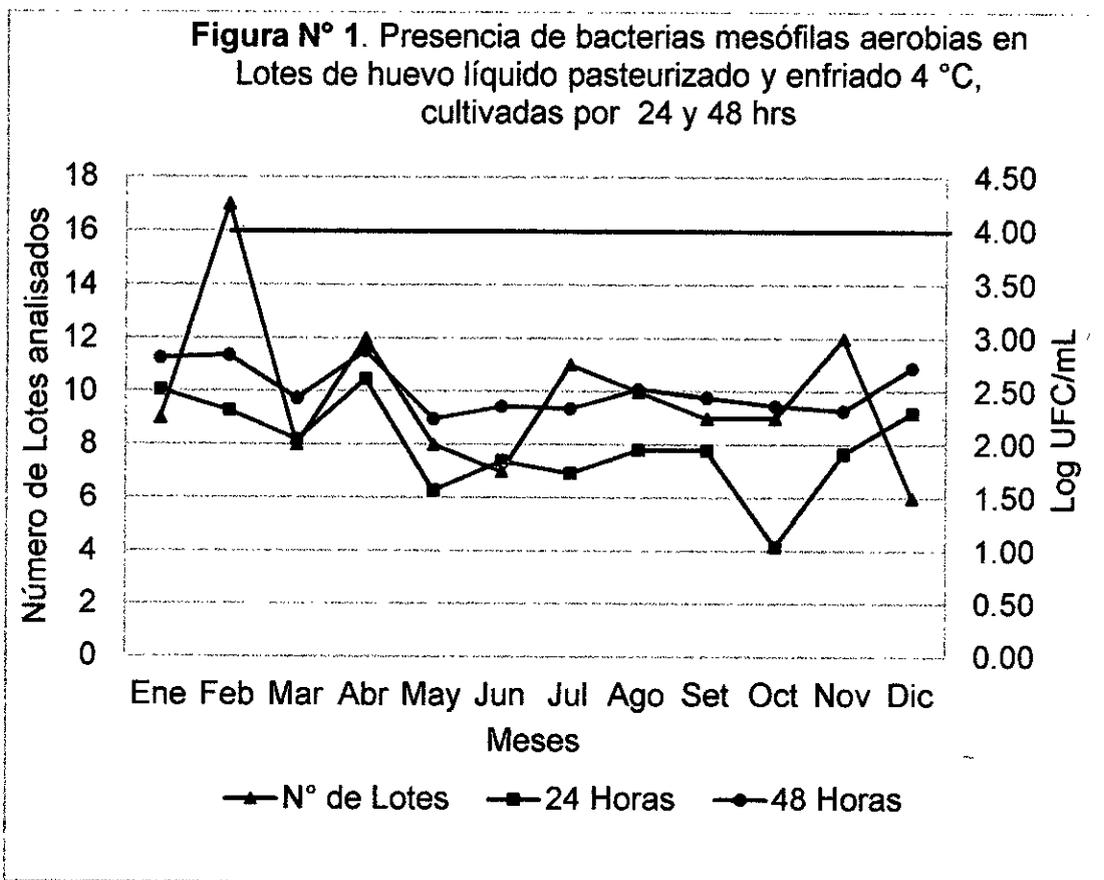
5.1.1. Calidad microbiológica del huevo líquido pasteurizado con choque térmico 4 °C

El huevo líquido pasteurizado con choque térmico 4 °C, normalmente continúa conservado a 4 °C y es comercializado en envases de 20 litros. Las condiciones establecidas por la normatividad vigente para su elaboración se cumplen basados en las buenas prácticas de manufactura y aplicación del sistema de Análisis de peligros y puntos críticos de control. Pocas son las oportunidades de reclamos por el consumidor por recibir productos que presentan alteraciones físicas, en primer lugar, y microbiológicas en segundo lugar, sobre todo por las manifestaciones en cambios de olor, color y textura.,

En la figura N° 1, se muestran los resultados de los ensayos microbiológicos que determinaron el número de los microorganismos mesófilos aerobios (MMA) presentes en el huevo líquido pasteurizado con choque térmico a 4 °C, durante la producción del año 2017, periodo en el cual se analizaron 120 muestras que corresponden a un número igual de lotes. Se observó que la lectura del cultivo para la numeración de colonias a las 24 horas alcanzan un promedio de 112 ± 2.35 UFC/mL, con un coeficiente de variación de 2.10 %; mientras que las lecturas de las mismas a las 48 horas logran un promedio de 585 ± 6.67 y un coeficiente de variación de 1.14 %UFC/mL. Este cambio, insensible, demostró que el indicador microbiológico se incrementa en función del tiempo, tanto en número como en géneros bacterianos.

Este comportamiento cultural indica que existen grupos bacterianos, en las muestras, que tienen una adaptación al medio de cultivo en forma tardía. Por otro lado, todos los resultados de los ensayos de cultivo aplicados a las muestra de todos los lotes analizados mostraron un carga de 10^2 UFC/mL de mesófilos aerobios; siendo el valor límite permisible $<10^4$ UFC/mL (R.M.007-2008 DIGESA).

Comparativamente se demuestra que existe una diferencia estadísticamente significativa. ($p < 0.05$) entre el número de mesófilos aerobios presentes en el cultivo por 24 y a las 48 horas; siendo el tiempo, el factor de la diferencia.



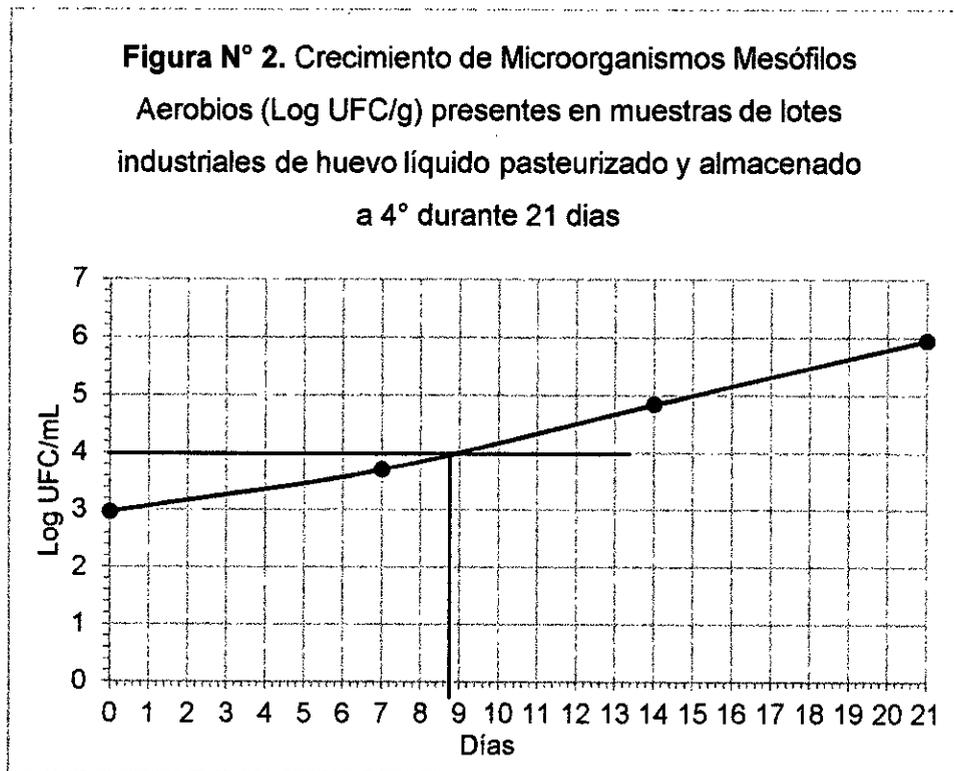
Fuente: Elaboración propia

5.2. Resultados inferenciales.

Crecimiento de microorganismos mesófilos aerobios en huevo líquido pasteurizado conservado a 4 °C.

Handwritten signature

La figura N° 2, muestra el crecimiento de los MMA (log UFC/mL) en huevo líquido que sobrevivieron al efecto de la temperatura de pasteurización y choque térmico a 4°C, para luego continuar su almacenamiento a la misma temperatura. La curva expresa un aparente crecimiento de tipo lineal; sin embargo, al ser sometido al modelo primario de Barangy & Robert se visualiza una fase de latencia o adaptación, seguida de una fase logarítmica, sin diferenciación clara de la fase anterior, cuyo final no se alcanza al término de los 21 días de conservación a 4 °C. Si se grafica la relación Log UFC/mL y días, considerando que el límite máximo permisible de MMA es $<10^4$, significa que aproximadamente el día 9.00 la población de mesófilos aerobios habrían llegado al límite permisible y es probable que el producto ingresó a una etapa de alteración o deterioro de sus cualidades físico-químico y microbiológico.



Fuente: Elaboración propia

Con la finalidad de caracterizar el crecimiento de MA, en la Tabla N°2, se muestran sus parámetros, demostrándose que posee una fase de adecuación o latencia con una duración de 2.498 ± 0.293 días, seguida de una fase logarítmica que se desarrolla a una velocidad (μ_{max}) de 0.11 ± 0.002 Log

D

UFC/mL/h que indica un desarrollo lento pero favorable que les permite lograr un incremento poblacional final de $4.11 \text{ Log UFC/mL} \pm 0.165$. Bajo estas condiciones de crecimiento, el tiempo en el cual se establece la velocidad absoluta de crecimiento es a las 10.86 ± 0.301 días, que es aproximadamente coincidente con el tiempo en el cual se inicia el deterioro del producto, según se observa en la Figura N° 2.

El coeficiente de correlación (R^2) = 0.987 para este crecimiento, indica que estadísticamente que los valores experimentales tienen alto nivel de confianza, de tal forma que los valores de la variable población es dependiente de la variable tiempo, cuando la conservación es a temperatura constante de 4 °C. La ecuación del crecimiento para las condiciones experimentadas queda expresada como: $y=2.82+4.11*\exp(-\exp(-0.11*(x-10.86)))$

Tabla N° 1. Parámetros del crecimiento de bacterias mesófilas aeróbicas en huevo líquido pasteurizado de lotes industriales conservado a 4 °C.	
Población inicial (UFC/mL)	2.82
Velocidad de crecimiento (Log UFC/m/h)	0.11
Incremento de la población	4.11
Tiempo máximo velocidad absoluta	10.86
Fase latencia (h)	2.85
Coeficiente correlación	0.987

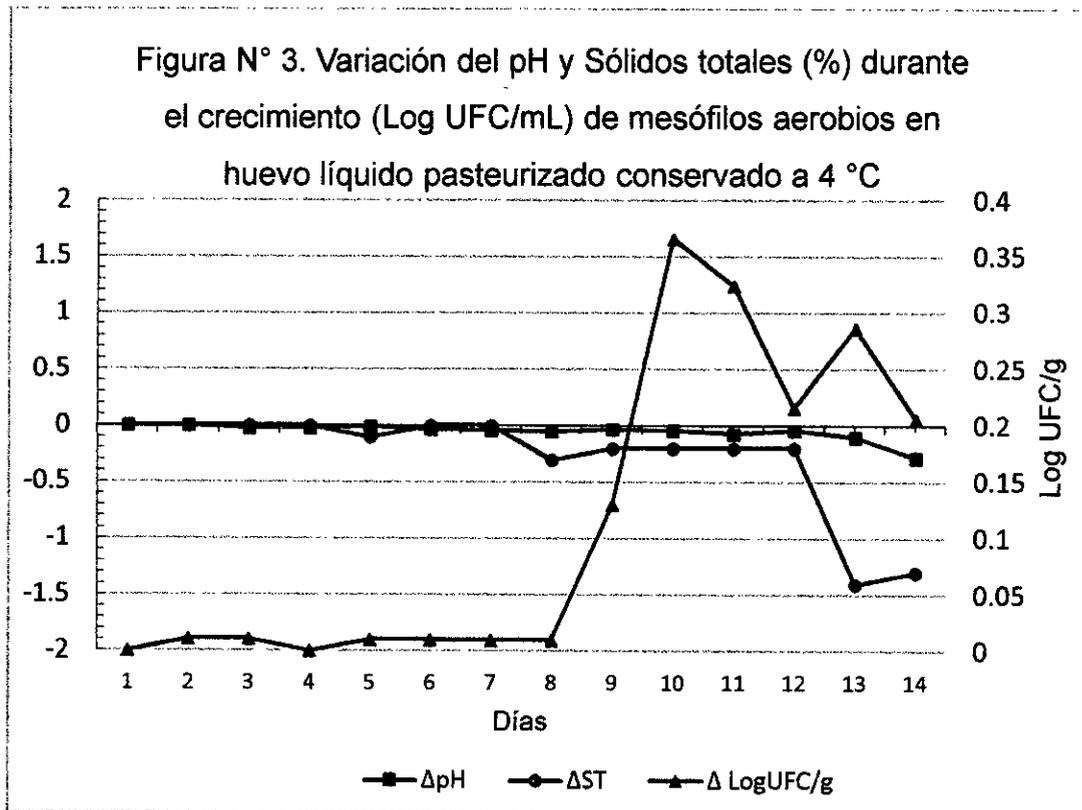
Fuente: Elaboración propia

Como consecuencia de las observaciones anteriormente mostradas, se hace necesario establecer en qué medida el crecimiento de los microorganismos MMA durante 14 días afectaron los parámetros de calidad del huevo líquido pasteurizado y conservado a 4 °C tales como los sólidos totales (%) y pH. La tabla N° 3, presenta a los tres eventos de cambio en función del tiempo de 14

días. El pH tuvo una variación promedio de -0.056/día y los sólidos totales - 0.321/día; es decir, el pH del huevo líquido se desplaza al lado ácido o acidificando y los sólidos totales se vienen hidrolizando perdiendo humedad al estar en un ambiente frío y seco. Estos cambios se traducen en una alteración del huevo líquido pasteurizado conservado a 4 °C desde el primer momento y que aproximadamente el 8vo día el cambio es más rápido coincidiendo con el incremento en la velocidad de crecimiento de MA. El coeficiente de variación (%) indica que la pérdida de los valores iniciales, tanto para el pH y sólidos totales es -1.283/día y -1.592/día, respectivamente, por efecto de un cambio en la velocidad de crecimiento de MA a razón de 1.141 Log UFC/mL/día. (Figura N° 3).

Tabla N° 2. Descripción de la velocidad del cambio del pH, sólidos totales (%) y velocidad de crecimiento de Mesófilos aerobios en huevo líquido pasteurizado y conservado a 4 °C por 14 días			
Valores y Estadísticos	Δ pH	Δ Sólidos Totales	Δ Log UFC/g
Valor Inicial (t_0)	7.56	26.00	2.00
Valor Final	6.83	22.00	3.59
Media	-0.056	-0.321	0.12
Desviación estándar	0.072	0.477	0.14
Coefficiente Variación (%)	-1.283	-1.592	1.14

Fuente; Elaboración propia



Fuente: Elaboración propia

Determinación de los parámetros cinéticos, mediante el modelo primario Barangy & Roberts, del crecimiento de microorganismos mesófilos aerobios a temperaturas de -10 °C, 0 °C y 10°C

Las normas peruanas de inocuidad recomiendan restringir el crecimiento microbiano en los ovoproductos mediante estrategias para minimizar las posibilidades de oportunidad de contaminación y de ésta forma poder evitar causar brotes de enfermedades en los consumidores. Por lo tanto se requiere de una rápida refrigeración del huevo líquido a una temperatura de 4°C. Sin embargo, la tecnología de refrigeración de huevo líquido comercial actual no puede bajar instantáneamente las temperaturas internas a 4 °C; además, que esta temperatura está destinada para controlar bacterias sobrevivientes a los efectos de pasteurización, pero su eficiencia estará en parte influenciada por el potencial de los contaminantes para sobrevivir y multiplicarse antes de que se alcancen las temperaturas que inhiben el crecimiento o adaptarse a esa

✍

temperatura para proseguir multiplicándose lentamente a través del tiempo de conservación.

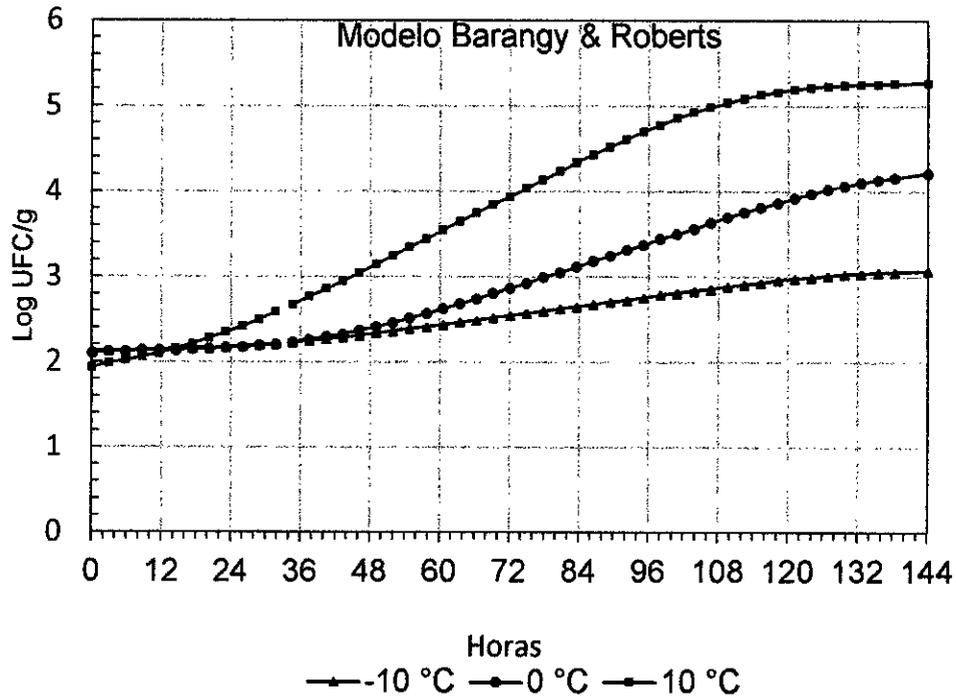
Teniendo como base las manifestaciones de los microorganismos mesófilos aerobios (MA) de poder sobrevivir los efectos térmicos de pasteurización y poder crecer a temperaturas de refrigeración se implementaron ensayos para obtener los parámetros cinéticos a temperaturas de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante un periodo de 144 horas.

En la figura N° 4 se observa que el crecimiento de los MMA en huevo líquido pasteurizado y sometido a las temperatura de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ son de tipo sigmoideo, evidenciando que existe dentro de esas curva las tres fases del crecimiento típico de los diferentes grupos bacterianos que pueden existir como sobrevivientes del proceso de pasteurización, haciéndose posible esta visualización mediante el ajuste de los datos experimentales con el modelo de Barangy & Roberts.

La tabla N° 4, contiene los datos que corresponde a la variación poblacional que se produce cuando se estima el crecimiento a bajas temperaturas, observándose que éste se incrementa en $0,985\text{ Log UFC/mL}$, $1,984\text{ Log UFC/mL}$ y $3,337\text{ Log UFC/mL}$, durante un periodo de tiempo de 144 días, para las temperaturas de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. En todos los tratamientos experimentales las concentraciones poblacionales obtenidas se encuentran dentro de la norma de inocuidad que considera como límites permisible poblaciones de $<4,00\text{ Log UFC}$. El ajuste de los datos experimentales de Log UFC/mL cada 12 horas fue realizado mediante el uso del modelo de Barangy & Roberts, contenido en el programa predictivo Combase, mostrando una curva de crecimiento con un coeficiente de determinación (R^2) $0,992 \pm 0,036$, $0,998 \pm 0,033$, $0,995 \pm 0,0967$, respectivamente, para cada una de la temperaturas ensayadas; interpretándose que la proporción de variación de la variable crecimiento es explicada por la variable tiempo y de ésta manera determinar que la calidad del modelo es el adecuado para explicar el evento.

18

FIGURA N° 4. Crecimiento de Bacterias Aerobias Mesófilas (Log UFC/mL) en huevo líquido pasteurizado conservado a temperaturas -10 °C, 0 °C y 10 °C, según



Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 3. Incremento de la población de bacterias mesófilas aerobias en huevo líquido pasteurizado conservado a -10 °C, 0 °C Y 10 °C

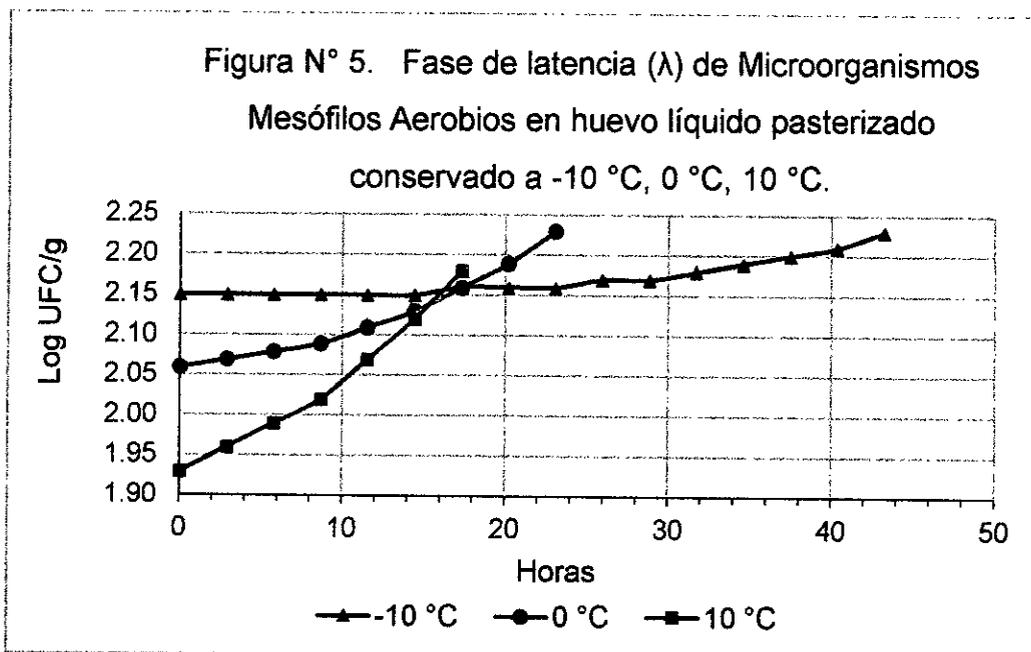
Poblaciones	-10 °C	0 °C	10 °C
Población Inicial UFC/g (N_0)	2.15 ± 0.017	2.0803 ± 0.048	1.931 ± 0.059
Población Final UFC/g (N_t)	3.135 ± 0.029	4.0652 ± 0.039	5.268 ± 0.048
Variación de la Población UFC/g (ΔN)	0.985 ± 0.012	1.9849 ± 0.017	3.337 ± 0.011
Coefficiente de determinación (R^2)	0.992 ± 0.036	0.998 ± 0.033	0.995 ± 0.067

Fuente: Elaboración propia

Handwritten signature

Caracterización de la cinética de adaptación de los microorganismos mesófilos aerobios presente en el huevo líquido pasteurizado conservado a -10, 0 y 10 °C.

La Tabla N° 5 muestra los datos que evidencian el crecimiento de las MMA a bajas temperaturas de conservación a -10 °C, 0 °C y 10 °C, requieren de una descripción a través de sus parámetros de crecimiento cinético. El crecimiento a temperaturas de -10 °C aparentemente pareciera una manifestación de sobrevivencia sin actividad de incremento poblacional o actividad enzimática, que puede ser expresado matemáticamente en forma lineal; sin embargo el seguimiento del incremento poblacional cada 12 horas permitió observar que existe una fase de latencia con una duración de 42.42 ± 3.26 horas; en tanto que, el crecimiento a 0°C y 10 °C, los parámetros se manifiestan representando una típica curva sigmoidea, caracterizándose por presentar una etapa de latencia o adaptación de 22.78 y 15.74 horas, respectivamente. La fase de Latencia está relacionado a la velocidad de crecimiento para cada temperatura experimentada, y es conocido que cuanto menor es la temperatura mayor es la inactivación de la carga microbiana presente en los alimentos. Existe escasa literatura que explique el comportamiento fisiológico de los MMA y si las hay es referido dentro del concepto de contaminación cruzada o BPM o HACCP. Se observó que la velocidad de crecimiento es de poca dimensión que solo pudo ser puesto de manifiesto mediante el uso del Modelo de Barangy & Roberts mostrando valores de 0.012 Log UFC/mL/h, 0.023 Log UFC/mL/h y 0.038 Log UFC/mL/h para las temperaturas de -10 °C, 0 °C y 10 °C, respectivamente.



Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 4. Fase de latencia o adaptación (λ) y Velocidad de crecimiento (μ_{max}) de Microorganismos mesófilos aerobios en Huevo líquido pasteurizado conservado a -10 °C, 0 °C y 10 °C

Fase de crecimiento	Temperatura		
	-10 °C	0 °C	10 °C
Fase lag (λ) o adaptación (h)	42.419 ± 3.257	22.783 ± 3.906	15.96 ± 3.006
Velocidad crecimiento (μ_{max}) Log UFC/mL/h	0.012 ± 0.0006	0.023 ± 0.0006	0.038 ± 0.0013

Fuente: Elaboración propia

La velocidad de crecimiento (μ_{max}) de los MMA en huevo líquido pasteurizado y conservado a temperaturas de -10 °C, 0 °C, 10 °C fue 0.012, 0.023, 0.038 Log UFC/mL/h y la máxima tasa de crecimiento se alcanza a 98.42, 74.68 y 53.44 horas (Tabla N° 6). En estos periodos de tiempo, la actividad metabólica es diferente para cada temperatura y por lo tanto el crecimiento es lento. Bajo estas condiciones el tiempo generacional o duplicación es de 36.94, 14.74 y

10.56 en forma correspondiente para cada temperatura. El modelo de Barangy & Roberts establece un coeficiente de determinación (R^2) igual a 0.999 ± 0.036 .

La comparación de la velocidad de crecimiento (μ_{max}), que corresponden a las temperaturas de $-10\text{ }^\circ\text{C}$, $0\text{ }^\circ\text{C}$ y $10\text{ }^\circ\text{C}$ se observa que entre ellas existe diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$); siendo las temperaturas las causa de la diferencia.

Tabla N° 5. Parámetros del crecimiento cinético de Microorganismos Mesófilos Aerobios en huevo líquido pasteurizado almacenado a las temperaturas de $-10\text{ }^\circ\text{C}$, $0\text{ }^\circ\text{C}$, $10\text{ }^\circ\text{C}$			
Parámetros de crecimiento	Temperaturas		
	$-10\text{ }^\circ\text{C}$	$-10\text{ }^\circ\text{C}$	$10\text{ }^\circ\text{C}$
Tiempo generacional (Tg) h	36.94 ± 0.12	14.74 ± 0.21	10.56 ± 0.28
M= Tiempo de Tasa crecimiento mayor magnitud (h)	98.42 ± 0.124	74.68 ± 0.221	53.44 ± 0.032
Coeficiente determinación (R^2)	0.999 ± 0.036	0.998 ± 0.033	0.997 ± 0.067

Fuente: Elaboración propia.

Determinación del Estado fisiológico de los microorganismos mesófilos aerobios presente en el huevo líquido pasteurizado conservado a -10 , 0 y $10\text{ }^\circ\text{C}$.

El valor del estado fisiológico es poco utilizado en los modelamientos de microorganismos alterantes y patógenos en los alimentos. Es definido como un número adimensional entre 0 y 1 ; si el estado fisiológico es $= 0$, entonces no hay crecimiento y la fase Lag es infinito; si estado fisiológico es $= 1$, no hay fase Lag o adaptación y el crecimiento comenzará inmediatamente. Las

curvas de crecimiento ajustadas por el modelo de Barangy & Roberts demostraron la presencia de la fase de latencia en las tres condiciones de temperaturas ensayadas, -10 °C, 0 °C y 10 °C, que están relacionadas con la velocidad del crecimiento. La Tabla N° 7 muestra los valores adimensionales del estado fisiológico (h_0) de las MMA que crecieron en huevo líquido pasteurizado son 0.309 Log UFC/mL, 0.299 Log UFC/mL y 0.247 Log UFC/mL, respectivamente.

Tabla N° 6. Estado fisiológico de los Microorganismos Patógenos Aerobios presentes en el huevo pasteurizado y almacenado a -10 °C, 0 °C y 10 °C			
Parámetros crecimiento	Temperaturas		
	-10 °C	0 °C	10 °C
Fase lag (λ) h	42.42	22.78	15.96
Estado Fisiológico (h_0)	0.310	0.299	0.247

Fuente: elaboración propia.

Determinación del tiempo de vida útil del huevo líquido pasteurizado en función a los microorganismos mesófilos aerobios utilizando el modelo de Arrhenius

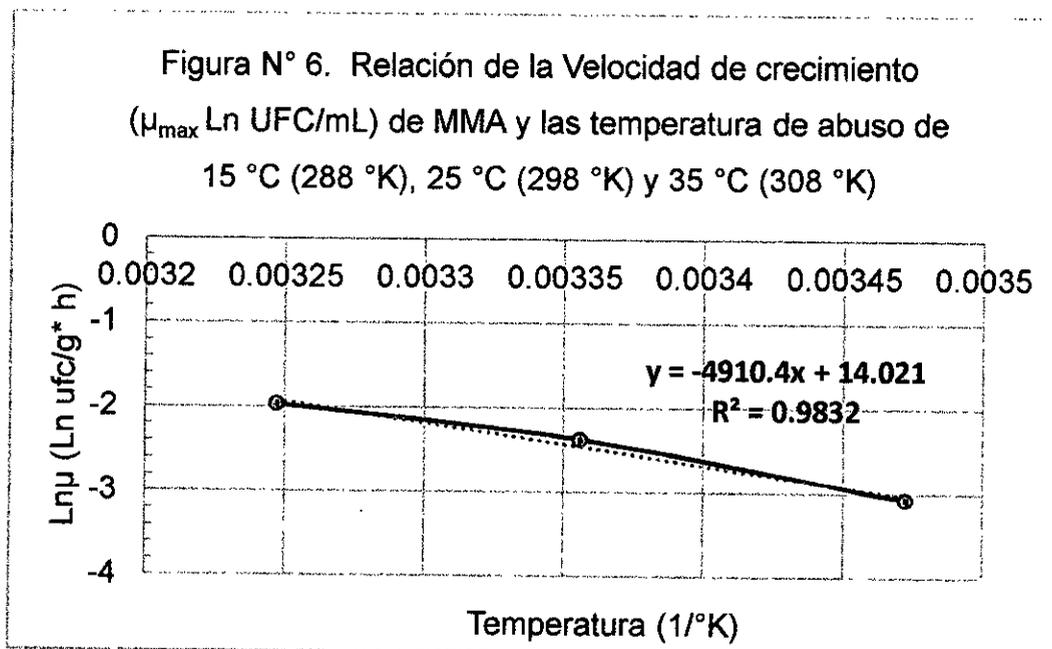
La tabla N° 7 contiene la velocidad de crecimiento (μ_{max}) proveniente del crecimiento de las MMA sobre el huevo líquido pasteurizado sometido a temperaturas de abuso de 15 °C, 25 °C y 35 °C, a las cuales les corresponde las velocidades de crecimiento (μ_{max}) de 0.00465 Ln UFC/m, 0.0932 Ln UFC/m, 0.1402 Ln UFC/m, respectivamente. Dicho parámetro está relacionado a la inversa de su respectiva temperatura expresada en °K con la finalidad utilizarlo en el modelo de Arrhenius.

Tabla N° 7. Vida útil: Velocidades de crecimiento de mesófilos aerobios en huevo líquido pasteurizado a temperaturas de abuso de 15 °C, 25 °C y 35°C.

°C (°K)	1/°K	μ (n=3)	Ln μ
15 (288K)	0.0035	0.0465	-3.069
25 (298K)	0.0034	0.0932	-2.373
35 (308K)	0.0033	0.1402	-1.964

Fuente: elaboración propia

La Figura N° 6, muestra la relación de las velocidades de crecimiento (μ Ln UFC/mL) y temperaturas de abuso de 15 °C, 25 °C y 35 °C, expresadas en 1/°K con la finalidad de obtener las energías de activación (Ea) y el factor pre-exponencial (A) que son las constantes del modelo de Arrhenius. El resultado de ésta relación es la ecuación no lineal siguiente: $y = -4910.4x + 14.021$, El coeficiente de determinación (R^2) = 0.9832 determina que estadísticamente la relación μ (Ln UFC/mL) y 1/°K tiene un elevado grado de confianza.



Fuente: Elaboración propia

F

Tabla N° 8. La gráfica mostrada en forma no lineal interpreta que la pendiente de la recta (m) es igual a $-4910.4 \text{ Ln UFC}^\circ\text{K/g}^*\text{h}$ y el intercepto en el eje "y" cuando $X=0$ es el factor pre-exponencial A, con valor de $14.021 \text{ Ln UFC/g}^*\text{h}$.

Tabla N° 8. Constantes del Modelo de Arrhenius	
R=	8.314472 KJ/Kg°K
m=	- 4910.4 Ln UFC°K/g*h
LnA=	14.021 Ln UFC/g*h

Fuente Elaboración propia

En la tabla N° 9, se encuentran los valores de la energía de activación (Ea), que fue deducido del valor de la pendiente $m = -Ea/R$; cuyo valor es de $40827.38 \text{ Ln UFC}^*\text{KJ/g}^*\text{Kg}$

Tabla N° 9. Valores de la Energía de Activación (Ea) y Velocidad de Crecimiento (Ln μ) de mesófilos aerobios presentes en el huevo líquido pasteurizado y almacenado a 4°C	
Operadores del modelo de Arrhenius	Valores
Ea= $-(m \cdot R)$	40827.38 Ln UFC*KJ/g*Kg
Ln μ= $\text{Ln } A - (Ea/RT)$	0.0246 Ln ufc/g*h

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 10, se registra el valor límite permisible equivalente a 5×10^4 ufc/mL (Ln= 10.82 Ln ufc/g), Velocidad de crecimiento a 4°C = 0.025 Log

UFC/mL. La vida útil del huevo líquido conservado a una temperatura de 4 °C es 18.35 días.

Tabla N° 10. Vida Útil del huevo líquido pasteurizado conservado a 4°C con referencia al agente microbios mesófilos aerobios	
Valor límite permisible (m) =	50000 Ufc/g
Ln Valor límite permisible (m)	10.82 Ln ufc/g
Velocidad de crecimiento a 4°C	0.025 Ln ufc/g*h
Vida Útil huevo líquido pasteurizado conservado a 4°C con Límite "m"	18.35 días
Vida Útil huevo líquido pasteurizado conservado a 4°C con Límite "M"	22.25 días

Fuente: Elaboración propia

Se consideró que por cada día se incrementa $xLn\ ufc/ml$ y así mismo recordar que μ se obtiene de la relación $Ln\ ufc/ml$ en función del tiempo (días); por lo tanto, el tiempo en alcanzar el valor límite permisible "m" se consideró como el tiempo de vida útil; del mismo modo se evaluó el tiempo de vida útil en función del límite máximo de "M".

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1. Contrastación de los resultados con otros estudios similares

Se consideró que la contaminación del huevo líquido pasteurizado se debía a los diferentes pasos que sigue durante su elaboración y que la presencia y número de mesófilos aerobios era el principal factor de su alteración durante el almacenamiento a 4 °C.

Es necesario considerar que la numeración de microorganismos aerobios mesófilos (MMA), en condiciones establecidas, estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos. Refleja la calidad sanitaria de los productos analizados, indicando además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración.

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 flora patógena. Ahora bien, salvo en alimentos obtenidos por fermentación, no son recomendables recuentos elevados.

La numeración de microorganismos aerobios mesófilos es el indicador más común para indicar la calidad sanitaria de los alimentos. Niveles altos en su numeración en alimentos que se deben mantener estables a menudo indican uso de materias primas contaminadas, aplicación de tratamientos no satisfactorios desde el punto de vista sanitario, o contaminación cruzada ocasionada en su proceso. En los productos perecederos pueden indicar también condiciones inadecuadas de tiempo/temperatura durante su almacenamiento. A temperatura corporal o cercana a ella, pueden crecer e incrementar su número, que significa que el sustrato que lo contiene le brinda las condiciones favorables, así como también a la multiplicación de los microorganismos patógenos de origen humano o animal, esta condición se produce cuando los tratamientos térmicos son insuficientes o de un almacenamiento inapropiado para controlarlos.

La calidad microbiana del huevo líquido pasteurizado, en esta investigación, se caracteriza por contener una carga microbiana de tipo bacteriana en exclusiva, con ausencias de mohos y levaduras. Esta observación permitió interpretar los resultados de la enumeración de los microorganismos mesófilos aerobios (MMA) como los únicos sobrevivientes a la aplicación de la temperatura de pasteurización a temperaturas de 64.5 – 65.2 °C por 120 -150

segundos, seguido de un choque térmico de 4 °C e de un inmediato almacenamiento a 4 °C. Los ensayos microbiológicos reportaron que la numeración de MMA se encontraban dentro de los límites permisibles exigidos por la norma y que las muestras de los lotes analizados indicaban que éstos no son diferentes en relación a la cantidad de microorganismos mesófilos aerobios (MMA) encontrados. La significancia de este hallazgo disminuye el efecto de la contaminación cruzada por los equipos y que el efecto térmico de pasteurización redujo la carga inicial proveniente del huevo fresco incluyendo a los patógenos, quedando post pasteurización bacterias sobrevivientes, termotolerantes, sicrótrofas o sicrófilos; que podrán crecer en el tiempo de almacenamiento en frío si las condiciones intrínsecas e intrínsecas del alimento lo permiten.

Basado en los resultados evidenciados y atendiendo a la discusión de los mismos, existe suficiente evidencia para sostener que los mesófilos aerobios sobreviven a los efectos de la temperatura de pasteurización en una cantidad que se encuentra por debajo de la exigencia permisible de la norma nacional; sin embargo, pueden ser la causa de su deterioro cuando su almacenamiento se produce a 4 °C.

Después del proceso de pasteurización el huevo líquido pasteurizado ha perdido las condiciones que posee en estado crudo que evitan el crecimiento de microorganismos como el $pH > 7$, la actividad de la lisozima, la ovotransferrina, proteínas de unión a vitaminas y otras; de tal forma que después del proceso de pasteurización se hace más lábil y propenso a que cualquier tipo de microorganismo que sobreviva tendrá muchas facilidades para su crecimiento, siendo el enfriamiento o congelación los únicos elementos de control de su crecimiento. La temperatura de pasteurización utilizada, para todos los lotes de producidos en el periodo de estudio, fue de 65 °C.



Resultados similares de sobrevivencia encontró Payne et al. (50), indicando que “las muestras de mezcla de huevos tomadas de una estación de envasado de huevos contenían un promedio de 7.3×10^4 Ufc/ml (4.86 Log UFC/mL) que sobrevivieron a la pasteurización de laboratorio a 65°C durante 3 min”. Cuando se trata de ver la efectividad de la pasteurización sobre la calidad microbiológica del huevo líquido, encontramos que su efecto es alto contra las bacterias patógenas y relativo cuando se trata de las bacterias alterantes, como lo demuestra Techer et al. (17), que concluyó afirmando que “la pasteurización se encontró globalmente eficiente en contaminantes mesofílicos (1.7 ± 1.6 y 0.8 ± 0.9 log CFU / mL en muestras crudas y pasteurizadas, respectivamente), incluso para el control de Salmonella. Sin embargo, todavía se detectaron enterococos grampositivos en las muestras pasteurizadas”.

La variedad de bacterias sobrevivientes al efecto de la temperatura de pasteurización se hace evidente cuando la lectura de los cultivos de MMA cuya lectura se realiza a las 24 horas las poblaciones bacterianas, en promedio, 2.05 log UFC/ml fueron bajas y luego a las 48 horas la lectura fue de 2.78 log UFC/mL. Entre el periodo de 24 horas las manifestaciones culturales de los MMA es diferente debido a que el huevo líquido pasteurizado (HLP) es poco probable la competencia entre especies y algunas especies con menos efecto de estrés comienzan a multiplicarse, mientras que otras se adaptan al medio de cultivo después de 24 horas de incubación, por lo tanto la habilitación metabólica y enzimática es diferente y hasta cierto punto sinérgico.

Se establece que los microorganismos tienen recursos metabólicos para resistir las temperaturas de refrigeración y congelación y vuelven a recuperar sus condiciones fisiológicas que le permiten su multiplicación modificando o alterando el sustrato. Polo et al. (51), “comprobaron que las tasas de supervivencia de las bacterias ácido lácticas son altas y correspondió a

Lactobacillus paracasei congelado a -196°C , mientras que el más bajo a *Lactobacillus brevis* congelado a -80°C ".

Al intentar establecer las características microbiológicas del HLP se deben hacerlo de acuerdo a los criterios microbiológicos de la normatividad sobre inocuidad de los alimentos en el país (49) el cual señala que "los MMA son indicadores de la calidad sanitaria de los alimentos. Recuentos altos en alimentos estables a menudo indican materias primas contaminadas o tratamientos no satisfactorios desde el punto de vista sanitario o contaminación en proceso".

Al demostrarse que el efecto térmico de pasteurización a 65°C y choque térmico 4°C mantenía una población de sobrevivientes era conveniente estimar si los parámetros cinéticos del crecimiento de los microorganismos mesófilos aerobios, utilizando el modelo primario de Baranyi y Roberts se modifican por efecto de temperaturas de conservación de -10°C , 0°C y 10°C .

Inicialmente se consideró que el almacenamiento y conservación industrial se realiza a 4°C y bajo estas condiciones se evaluó el crecimiento de los MMA a través de un periodo de 144 horas generándose una curva de crecimiento que fue ajustada con el modelo de Baranyi & Roberts (Figura N° 2), presenta una fase de latencia o adaptación, seguida de una fase logarítmica, sin dar muestra de la presencia de la fase estacionaria dentro de los 21 días de conservación experimental a 4°C . La calidad sanitaria del HLP expresado por la numeración de MMA fue de 2.82 Log UFC/mL, cantidad que representa un bajo nivel de contaminación; así mismo, se observó que el nivel máximo permisible del número de MMA ($>10^4$ UFC/mL) se superó a los 9 días de conservación.

En el HLP conservado a 4°C se presentaron cambios poblacionales de MMA que se caracterizaron a través de sus parámetros o constantes. Así tenemos que la fase de adaptación o latencia tiene una duración de 2.498 ± 0.293 días,

seguida de una fase logarítmica con velocidad (μ_{max}) de 0.11 ± 0.002 Log UFC/mL/h, alcanzando un incremento del nivel poblacional de 4.11 ± 0.165 Log UFC/mL. El tiempo en el cual se establece la velocidad absoluta de crecimiento es a las 10.86 ± 0.301 días, que coincide aproximadamente con el tiempo en el cual se inicia el deterioro del producto.

Durante el periodo de almacenamiento prolongado es cuando el deterioro del HLP se pone de manifiesto, que en este estudio fue a los 9 días; sin embargo, Rego et al. (52), indica que "para las muestras de huevo pasteurizado líquido fértil, el número de microorganismos aeróbicos mesófilos fue mayor al aumentar el período de almacenamiento. Sus numeraciones alcanzaron por encima de $6.40 \log$ cfu/mL el día 21. Las diferencias con estos resultados se podría explicar asumiendo que la materia prima utilizada antes de la pasteurización presentaba una contaminación elevada con bacterias nativas del huevo, así como no haber controlado el factor tiempo-temperatura durante el pasteurizado".

El tratamiento térmico de pasterización seguido del choque térmico de frío utilizado es óptimo y deja una cantidad de MMA de 2.82 Log UFC/mL considerado como bajo que en cierto modo puede asegurar una estabilidad del producto por un tiempo determinado casi siempre de pocos días.

Al respecto, Cwиковá et al. (53). "Evaluó la calidad microbiológica de los productos líquidos de huevo (clara de huevo pasteurizada líquida, yema de huevo pasteurizada con azúcar 33%, mezcla de huevo entero pasteurizada) encontrando que el mayor valor del conteo de microorganismos aeróbicos totales fue $3.1 \log$ CFU.mL⁻¹ mientras que el valor más bajo fue de $1.6 \log$ CFU.mL⁻¹". Techer et al. (17), "investigó la calidad microbiana de la clara de huevo líquida pasteurizadas confirmando que dicho tratamiento fue globalmente eficiente en contaminantes mesofílicos $0.8 \pm 0.9 \log$ CFU/mL". La media del total de bacterias viables y recuentos de coliformes en el contenido de huevos fue de 3.95×10^4 UFC/g. Mahdavi et al. (54), estudió la calidad

microbiológica del huevo siendo el promedio del total de bacterias viables de 3.95×10^4 UFC/g". Miller et al. (55) reporta que "las muestras pasteurizadas (sin bacteriocina) alcanzaron un recuento total de 4,2 log CFU/ml después de dos semanas de almacenamiento".

Por lo expuesto, coincidimos en que "los resultados de las mediciones de monitoreo microbiológico internacional han demostrado que la pasteurización de los productos de los huevos no es un procedimiento suficiente para reducir el conteo de gérmenes; varios microorganismos de supervivencia, algunas veces microorganismos patógenos, pueden encontrarse en el huevo líquido después de la pasteurización" (56).

El crecimiento a bajas temperatura no está claramente estudiado cuando nos referimos a los microorganismos psicrotrofos y psicrófilos que pueden rápidamente adaptarse a la matriz del HLP motivo por el cual deben ser considerados como los principales microorganismos del deterioro del huevo líquido pasteurizado.

Obtener criterios del crecimiento microbiano a bajas temperaturas es novedoso y por ello se requiere de las herramientas de la microbiología predictiva para estimar los parámetros cinéticos del crecimiento de los microorganismos mesófilos aerobios utilizando el modelo primario de Baranyi & Roberts y explicar las modificaciones por efecto de temperaturas de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $10\text{ }^{\circ}\text{C}$

La conservación del huevo líquido pasteurizado industrialmente se realiza a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, siendo ésta temperatura un factor que, en el corto plazo de almacenamiento, puede mantener la calidad sensorial y bromatológica, pero no guarda relación directa con el factor microbiológico. Esta observación determinó que se debe caracterizar el crecimiento de los microorganismos mediante los hallazgos de sus parámetros cinéticos de los MMA en el HLP a temperaturas de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

18

La cinética de crecimiento de MMA a bajas temperaturas de conservación a -10 °C, 0 °C y 10 °C, describe una fase de latencia de 42.42 horas (1.75 días), 22.78 horas (0.95 días) y 15.74 horas (0.66 días), respectivamente. En este periodo de tiempo aparentemente pareciera una manifestación de sobrevivencia sin actividad de incremento poblacional que puede ser expresado matemáticamente en forma lineal; sin embargo, cuando los datos experimentales del crecimiento se ajustan con el modelo de Barangy & Roberts se observa que la población inicial aumenta insensiblemente a pesar de que pueden verse afectados por diversos factores intrínsecos y extrínsecos que le ofrece el HLP como el cambio de pH, actividad del agua, temperatura, etc., que de alguna forma favorecen el incremento a la resistencia térmica de los grupos microbianos que conforma los MMA”.

Los crecimientos observados a las temperaturas se caracterizan porque la fase de latencia o retardo (λ) se hace mínimo cuando la temperatura se incrementa o se acerca al óptimo y aumenta gradualmente conforme la temperatura se aleja de este punto. En estos ambientes de bajas temperaturas las velocidades de crecimiento (μ_{max}) fueron 0.012, 0.023 y 0.038 Log UFC/mL/h, para -10, 0 y 10 °C respectivamente.

La velocidad de crecimiento ocurrido dentro de la fase de latencia son determinantes para generar el crecimiento logarítmico considerando que el microorganismo es mesófilo, psicrotrofo y psicrófilo. En este estudio podemos inferir que la población denominada está integrada por microorganismos preferentemente mesófilos y psicrotrofos.

Diferentes estudios están demostrando que ciertos microorganismos especializados pueden seguir creciendo a bajas temperaturas, como es el caso de los psicrotrofas y psicrófilos. Walker et al. (57) demostró que “el crecimiento de tres cepas de *Listeria monocytogenes* a temperaturas de

refrigeración (-0.5 a 9.3 grados °C), tuvieron tiempos de latencia de 1-3 días y de 3 a más de 34 días con incubación a 5 y 0 °C respectivamente”.

Khan et al. (58), investigó la cinética de supervivencia e inactivación de una cepa sustituta de *Bacillus anthracis* (cepa Sterne) en huevo líquido entero a bajas temperaturas (-20, 0 y 5 grados °C). A 0 y 5 °C, se observó una reducción del 60-100% en la viabilidad de las esporas dentro de las 2-3 semanas. Los datos de supervivencia e inactivación de *B. anthracis* en productos de huevo líquidos informados en esta investigación serán útiles para desarrollar modelos de evaluación de riesgo en bioseguridad de alimentos”.

Zárate (59), estudió el comportamiento del *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, donde menciona que la fase lag (λ) a 10°C es muy extensa y que culmina a las 17.43 horas. Sancho, 2015, reporta que “las bacterias lácticas mesofílicas presentes en el queso tienen una fase de latencia que termina a las 19.06 horas, aduciendo que durante el tiempo de adaptación muchas células bacterianas contenidas en el inóculo pueden morir y sólo las que sobrevivieron establecieron la curva de crecimiento”.

Cossins et al. (60), señalan que “durante el crecimiento en ambientes fríos son importantes muchas capacidades metabólicas. La adaptación homeoviscosa, permite a las células mantener la fluidez de sus membranas a bajas temperaturas. Conforme la temperatura disminuye, la célula sintetiza cantidades crecientes de ácidos grasos mono-insaturados y di-insaturados para que sus lípidos tengan una fluidez compatible con un metabolismo activo.

Maarten et al. (61) realiza una evaluación de la exposición para el *Bacillus cereus* psicrotrofico y mesófilo en un producto vegetal refrigerado cocido. Se prevén niveles probables de unidades formadoras de colonias de *B. cereus* (cfu) en envases de puré de verduras en el momento en que el consumidor retire el producto de su refrigerador. Se predice que la cepa psicrotrofica

terminará por encima de un nivel de umbral de 10^5 ufc/g. Si el puré se almacena a 4°C en el refrigerador doméstico y se respeta la fecha de caducidad, para la cepa mesofílica, el nivel de umbral (ufc/g) rara vez se pasa, pero la carga de esporas en el punto final es mayor que en la cepa psicrotrofica.

Este estudio ha demostrado que las bacterias mesófilas aerobias que sobreviven a las temperaturas de pasteurización y luego pasan a conservarse a temperaturas de congelación de -10 y 0°C y refrigeración de 10°C permanece activos, siempre y cuando tengan mecanismos para adecuarse necesariamente a una serie de aclimataciones fisiológicas para lo cual deben cambiar las vías bioquímicas (62), alterar los lípidos de la membrana para mantener la fluidez de la membrana, sintetizar moléculas protectoras que incluyen proteínas y azúcares (63,64), sintetizar proteínas anticongelantes (65), y posiblemente producir solutos compatibles para controlar el potencial hídrico (66). La conservación del huevo líquido pasteurizado a temperatura de 10°C bajo cero tiene mucha significación porque a dicha temperatura algunas bacterias tienen una velocidad de crecimiento muy lento que no permite apreciar el deterioro del alimento.

El valor del estado fisiológico bacteriano es poco considerado cuando se trata de caracterizar el crecimiento de aquellos que son alterantes o patógenos, utilizando modelos matemáticos aplicados a los alimentos. Es definido como un número adimensional entre 0 y 1; si el estado fisiológico es = 0, significa que no hay crecimiento y la fase Lag (λ) es infinito; si el estado fisiológico es = 1, no hay fase lag o adaptación y el crecimiento comenzará inmediatamente.

Para el modelo de Baranyi, la fase de retraso o adaptación (λ) está determinada por la relación entre h_0 y μ . El h_0 es en realidad un parámetro virtual, que representa el estado fisiológico de las bacterias. En la mayoría de las aplicaciones, se asume que h_0 es constante.

B

Para efectos de éste estudio los cultivos bacterianos de mesófilos aerobios, el estado fisiológico tuvo valores de 0.312, 0.299 y 0.247 y son aproximadamente iguales ($p \geq 0.05$), debido a que todas las células son consideradas como sobrevivientes al efecto térmico de la pasteurización a 65 °C y el choque térmico de 4 °C. Los valores h_0 que se obtuvieron fueron relativamente estables durante la fase de latencia y cercanos entre sí, como en este caso en que, h_0 para -10 °C es el mayor y luego disminuyen a 0 °C y 10 °C; indicando que, en este rango de temperaturas los valores de h_0 se ven afectados por la temperatura que predisponen las condiciones fisiológicas para que se inicie la fase logarítmica. Las velocidades de crecimiento de cada temperatura fueron comparadas estableciéndose diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$), siendo la temperatura el factor de la diferencia.

El modelo de Baranyi & Robert ajusta los datos experimentales (Log UFC/mL) del crecimiento y demuestra una fase de latencia o retraso (λ) que está definido por el estado fisiológico (h_0) de las bacterias mesófilas y la tasa de crecimiento (μ) en condiciones de crecimiento a temperaturas de -10, 0 y 10 °C.

Las adaptaciones bacterianas a entornos fríos generan un estado de estrés que condiciona a una adaptación posterior y "ocurre cuando las bacterias en crecimiento están expuestas a una caída repentina de temperatura de al menos 10 °C, lo que produce un choque por frío en microorganismos susceptibles" (67). Las adaptaciones al frío no se realizan en un solo momento, sino que es un proceso en el cual "la respuesta de choque al frío se divide en etapas de cese inicial del crecimiento, reanudación del crecimiento después de un período de adaptación y cambios en la síntesis de proteínas" (68).

Las bacterias mesófilas aerobias presentes en el huevo líquido pasteurizado en condición de sobrevivientes sufren una situación de estrés considerada como cualquier desviación de los requerimientos óptimos con la capacidad de

A

disminuir el crecimiento bacteriano. Se puede considerar que el factor genético sea el más importante cuando se trata de sobrevivencia, adaptaciones y crecimiento. "Las situaciones que inducen la expresión de genes que responden a condiciones ambientales específicas también pueden definir una situación estresante y, posteriormente, resultar importantes en la inducción de respuestas de estrés bacteriano durante las interacciones huésped-patógeno"(69).

Weber et al. (70) Concluye que el aspecto crucial de la adaptación de la membrana citoplásmica no es su composición molecular específica, sino su estado físico en términos de su fluidez.

El estudio planteó la hipótesis de la dependencia de la fase de latencia a bajas temperaturas. Los resultados hallados determinan que la fase (λ) o el tiempo de adaptación, de los microorganismos mesófilos aerobios presente en el huevo líquido pasteurizado, es dependiente de las condiciones que se instalan cuando se encuentran a bajas temperaturas, entendiéndose que a menor temperaturas mayor es el tiempo de latencia.

Los microorganismos responsables del deterioro del huevo líquido pasteurizado no pertenecen a un solo grupo taxonómico. Diferentes tipos de bacterias pueden ser la causa de su alteración. La presencia de la variedad de microorganismos depende de su naturaleza, propiedades intrínsecas y el proceso de transformación al que es sometido.

El modelo de Arrhenius tuvo una buena calificación cuando se aplicó y permitió la expresión de la dependencia de la temperatura del crecimiento microbiano en términos como el parámetro de la Energía de Activación (E_a) usado frecuentemente en el modelado cinético de fenómenos físicoquímicos en las que se incluye las reacciones de deterioro de los alimentos. Cuando se trata de sistemas biológicos y de alimentos complejos la ecuación es empírica que y es un punto de referencia cuantitativo común para evaluar las

sensibilidades del crecimiento bacteriano a la temperatura en las que se produce en una herramienta confiable y práctica para predecir la vida útil del HLP.

El conocer el comportamiento de un grupo bacteriano, indicador de contaminación cruzada, como las bacterias mesófilas aerobias presentes en el huevo líquido pasteurizado permite determinar su tiempo de vida útil usando el modelo de Arrhenius. El cálculo de las constantes del modelo se obtuvo mediante el crecimiento de MMA en el HLP a temperaturas 15 °C, 25 °C y 35 °C, de las cuales se obtuvieron las velocidades de crecimiento (μ_{max}) de 0.00465, 0.0932, 0.1402 Ln UFC/m, respectivamente, y a partir de la relación entre ellas se expresó mediante la ecuación no lineal: $y = -4910.4x + 14.021$ y de ésta manera quedaron establecidas las energías de activación ($E_a = 40827.38 \text{ Ln UFC} \cdot \text{KJ/g} \cdot \text{Kg}$) y el factor pre-exponencial ($A = 0.0246 \text{ Ln ufc/g} \cdot \text{h}$); que son las constantes que requiere el modelo de Arrhenius.

El cálculo de la vida útil del HLP consideró que el límite microbiológico que separa la calidad aceptable de la rechazable "m" fue $5 \times 10^4 \text{ ufc/mL}$ ($\text{Ln} = 10.82 \text{ Ln ufc/g}$), según NTS 071 MINSA/DIGESA 2008; así mismo Velocidad de crecimiento a 4°C = 0.025 Log UFC/mL. La vida útil del huevo líquido conservado a una temperatura de 4 °C es 18.35 días; en tanto que si se calcula con los valores de recuentos microbianos superiores a "M" será de 22.25 días, tiempo en el cual el alimento representa un riesgo para la salud.

El huevo líquido pasteurizado actualmente está considerado como un componente alternativo cuando se refiere al uso del huevo en la elaboración de muchos productos alimenticios; por ello se exige que se calidad se mantenga durante un periodo de tiempo sin pérdida de sus propiedades en condiciones de inocuidad y seguridad alimentaria, motivos que actualmente se exija el tiempo de vida útil. Varios investigadores han reportado su estabilidad a través del tiempo de almacenamiento como es el caso de Nahed et al. (71) que determinó el tiempo de vida útil para claras de huevo, yema de

B

huevo con sal y yema de huevo con miel fue de 3 semanas (21 días). York et al. (72) estudió muestras comerciales de huevos enteros líquidos pasteurizados; se mantuvieron aceptables hasta 12 días a 2 ° C. y 5 días a 9 ° C. No se encontraron organismos de E. coli, salmonela, estreptococos ni estafilococos en el huevo líquido.

Imai et al. (73) demostró que "en los productos pasteurizados almacenados a -5 y -3 C, la vida útil se extendió considerablemente hasta 22 días, sin afectar negativamente a las propiedades funcionales. Ballas Egg Products Corp. (74) "elabora huevo líquido pasteurizado que deben mantenerse refrigerado a 40 ° F o menos en todo momento. La vida útil recomendada es de doce (12) días a partir de la fecha de fabricación. Premiun Nutregg (75), comercializa ovoproductos de los cuales "el tiempo de duración del huevo entero líquido pasteurizado es 10 días a contar de la fecha de elaboración a temperatura de almacenamiento de refrigeración (0 y 4°C), manteniendo en todo momento la cadena de frío y con un estricto control de las manipulaciones que puedan contaminar el producto o facilitar su deterioro".

Nuevas tecnología emergen como preservación no térmica del huevo entero líquido con campos eléctricos pulsados (PEF) la cual es una alternativa atractiva al procesamiento térmico cuando la coagulación de proteínas es una preocupación. Para éstas condiciones, Gongora Nieto et al. (76) encontró que "la vida útil máxima mantenida a 4 ° C del huevo entero líquido con 0,15% de ácido cítrico fue de 20 días y con tratamientos de Pulsos eléctricos (266 pulsos) tenía una vida útil de 30 días a 4 ° C.

Todas las evidencias anteriormente presentadas demuestran que los valores de vida útil encontrados en este trabajo son aproximadamente cercanos, por lo cual se infiere que el modelo de Arrhenius es un modelo de tipo secundario que, en términos de la microbiología predictiva, es útil para la determinación del tiempo de vida útil del huevo líquido pasteurizado.

CONCLUSIONES

Se demuestra que el proceso de pasteurización industrial utilizado para la erradicación de bacterias Gram-negativas en el huevo líquido es eficiente. Sin embargo, los microorganismos mesófilos aerobios resisten éste proceso y su población sobreviviente representa un factor potencial de su deterioro.

La conservación del huevo líquido pasteurizado utilizando bajas temperaturas, congelación y refrigeración, está condicionado a respetar sus propiedades funcionales y en este contexto los microorganismos mesófilos aerobios muestran crecimiento en función del tiempo, sus parámetros cinéticos de su crecimiento demuestran velocidades que se incrementan en proporción al incremento de la temperatura; siendo mayor a temperaturas de refrigeración.

Durante la conservación del huevo líquido pasteurizado a bajas temperaturas los microorganismos mesófilos aerobios mostraron tener capacidad para adaptarse y permanecer fisiológicamente activas. La adaptación representa la fase de latencia y se produjo en días para temperaturas de congelación y horas para la de refrigeración.

Las respuestas del crecimiento a bajas temperaturas se puede explicar con mayor precisión cuando el modelo de Barangy & Roberts incorpora en su formulación el valor del estado fisiológico (h_0) de los microorganismos mesófilos presentes en el huevo líquido pasteurizado que contribuye a una mejor comprensión del modelamiento del crecimiento de dichos microorganismos cuando pasan de una temperatura mesofílica a temperaturas psicrotrofas y psicrófilicas.

Considerando que el crecimiento logarítmico, de menor o mayor cuantía, a bajas temperaturas se basa en sus parámetros de velocidad de crecimiento y estado fisiológico se obtuvo el tiempo de vida útil mediante el modelo de

R

Arrhenius que alcanza a un periodo de días garantizando sus condiciones de inocuidad.

Los microorganismos mesófilos aerobios presentes en el huevo líquido pasteurizado son los principales elementos responsables de su deterioro y su presencia está relacionado a la contaminación cruzada a partir del huevo fresco con insuficiente limpieza y desinfección.

Este estudio demostró que la conservación del huevo líquido a bajas temperaturas alteran los valores de los parámetros cinéticos del crecimiento de las bacterias mesófilas aerobias, disminuyendo el tiempo de vida útil.

RECOMENDACIONES

- Elaborar un modelo secundario que integre el pH y Temperatura con la Velocidad de crecimiento a temperaturas de refrigeración.
- Establecer parámetros cinéticos para Bacterias indicadoras de la presencia de bacterias patógenas en ovoproductos conservados a bajas temperaturas industriales.
- Determinar la temperatura máxima de conservación en relación al estado fisiológico de los microorganismos mesófilos aerobios.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Loaiza , J., Sánchez , M., Henao, S., & Cardona, N. Detección de bacterias contaminantes en huevos para consumo en Medellín y su área Metropolitana. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 2011;6(2).
2. Kuda , T., Iwase , T., Yuphakhun , C., Takahashi , H., Koyanagi , T., & Kimura , B. Surfactant-disinfectant resistance of Salmonella and Staphylococcus adhered and dried on surfaces with egg compounds. *Food Microbiol.* 2011;28(5): 920-5.
3. McNeill , K., & Hamilton , I. Effect of acid stress on the physiology of biofilm cells of Streptococcus mutans. *Microbiology*. 2004; 150 (3):735-42.
4. Kubota , H., Senda, S., Tokuda , H., Uchiyama , H., & Nomura , N. Stress resistance of biofilm and planktonic Lactobacillus plantarum subsp. plantarum JCM 1149. *Food Microbiol.* 2009; 26(6):592-7.
5. Takahashi , H., Suda , T., Tanaka , Y., & Kimura, B. Cellular hydrophobicity of Listeria monocytogenes involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride [Internet]. 2010 [consultado 10 april 2019]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1472-765X.2010.02842.x>
6. Parsek , M., & Tolker-Nielsen, T. Pattern formation in Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Curr Opin Microbiol.* 2008; 11(6): 560-6.
7. Sahal , G., & Bilkay, I. Multi drug resistance in strong biofilm forming clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. *Braz J Microbiol.* 2014; 45(2): 539-44.
8. Forsythe , R. egg processing technology--progress and sanitation programs. *Journal of Milk and Food Technology.* 1970;33(2): 64-73.
9. Shafi, R. C., & Nichols, M. Microbial flora of commercially pasteurized egg products. *Poultry Science.* 1970; 49: 578-85.

10. Payne J., Gooch J. and Barnes E. Heat-resistant Bacteria in Pasteurized Whole egg. *Journal of Applied Bacteriology*. 1979; 46:601-613.
11. Kline, L., Sugihara, T., & Ijichi, K. Further studies on heat pasteurization of raw liquid egg white. *Food Technology*. 2005; 20: 1604-6.
12. Bradshaw , J., Shah , D., Forney, E., & Madden, J. Growth of *Salmonella enteritidis* in yolk of shell eggs from normal and seropositive hens. . *Journal of Food Protection*. 2000; 53:1033-1036.
13. Clay , C., & Board, R. Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated hens shell eggs. *Epidemiology & Infection*. 1991; 106: 271-281.
14. McMeekin , T., Bowman , J., McQuestin , O., Mellefont , L., Ross , T., & Tamplin , M. The future of predictive microbiology: strategic research, innovative applications and great expectations. *Int J Food Microbiol*. 2008; 128(1): 2-9.
15. Linewaver, H., Palmer , H., Putnam, G., Garibaldi, J., & Kaufman, V. Egg pasteurization Manual. ARS 74-48. USDA Agric. Res. Serv., Albany, California. 1969; 02: 54-63.
16. Protais, J., Gerault, P., Queguiner, S., Boscher, E., & Ermel, G. Identification et comportement des bactéries d'altération dans la matrice œuf entier liquide. *Sciences et Techniques Avicoles*. 2006; 57: 4-13.
17. Techer , C., Daoud , A., Madec , M., Gautier , M., Jan , S., & Baron, F. Microbial quality of industrial liquid egg white: assumptions on spoiling issues in egg-based chilled desserts. *J Food Sci*. 2015; 80(2): 389-98.
18. Muñoz , E. Elaboración de clara de huevo deshidratada pasteurizada. Tesis Titulación por examen profesional. Facultad de Industrias Alimentarias Universidad Nacional Agraria La Molina. 2017.
19. Casas , N., Moncayo, D., Cote, S., Cárdenas , A., & Espitia , L. Evaluación de la estabilidad del huevo de codorniz en conserva con sales y conservantes orgánicos. *Scientia Agropecuaria*. 2016; 7 (3): 231 – 238.

20. Kobashikawa S., K. Propiedades tecno-funcionales de los ovoproductos destinados para exportación. Titulación por examen profesional Universidad Nacional Agraria la Molina. Facultad de Industrias Alimentarias. 2017.
21. Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A., Geeraerd, A., Van Impe, J., & Debevere, J. Effect of environmental parameters (temperature, pH and aw) on the individual cell lag phase and generation time of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* (2006).
22. Schultze, K. K., Linton, R. H., Cousin, M. A., Luchansky, J. B., & Tamplin, M. L. A Predictive Model To Describe the Effects of Temperature, Sodium Lactate, and Sodium Diacetate on the Inactivation of a Serotype 4b Strain of *Listeria monocytogenes* in a Frankfurter Slurry. *Journal of Food Protection.* 2006; 69(7): 1552-1560.
23. Ross, T., McMeekin, T., & Baranyi, J. Predictive microbiology and food safety. in R. K. Robinson, C. A. Batt, and P. D. Patel, ed. *Encyclopedia of Food Microbiology.* 2000: 1699-1710.
24. McDonald , K., & Sun , D. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 1999 ; 52(1-2): 1-27.
25. Labuza, T., & Fu, B. Growth kinetics for shelf-life prediction: Theory and practice. *Journal of Industrial Microbiology.* 1993 ; 12: 309–323.
26. Fu , B., Taoukis, P., & Labuza, T. Predictive Microbiology for Monitoring Spoilage of Dairy Products with Time-Temperature Integrators. *Journal of Food Science.* 1991; 56: 1209–1215.
27. Wijtzes , T., Rombouts, F., Kant-Muermans , M., Van Riet , K., & Zwietering , M. Development and validation of a combined temperature, water activity, pH model for bacterial growth rate of *Lactobacillus curvatus*. *Int J Food Microbiol.* 2001 ; 63(1-2): 57-64.
28. Rodríguez O., Hanssen H. Obtención de dextrano y fructosa, utilizando residuos agroindustriales con la cepa *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F. *Revista EIA.* 2007;(7): 159-172. ISSN 1794-1237.

29. Zwietering, M., Jongenburger, I., Rombouts, F., & Van 't Riet, K. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56(6): 1875–1881.
30. McKellar, R. A heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics. *International Journal of Food Microbiology.* 1997; 36:179-186.
31. Ohkochi, M., Koseki, S., Kunou, M., Sugiura, K., & Tsubone, H. Growth modeling of *Listeria monocytogenes* in pasteurized liquid egg. *Journal of Food Protection.* 2013; 76(9):1549-56.
32. Singh, A. Dynamic predictive model for the growth of *Salmonella* spp. in liquid whole egg and risk evaluation of egg white hydrolysates manufacturing process for spore formers: *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*. Thesis Magister. University of Nebraska – Lincoln. Food Science and Technology Department. 2013.
33. Ratkowsky, D., Olley, J., McMeekin, T., & Ball, A. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J Bacteriol.* 1982;149(1): 1–5.
34. Huang, L., Hwang, A., & Phillips, J. Effect of Temperature on Microbial Growth Rate—Mathematical Analysis: The Arrhenius and Eyring–Polanyi Connections. *Food Science.* 2011;76(8).
35. Giannuzzi, L., Pinotti, A., & Zaritzky, N. Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 1998; 39(1-2): 101-10.
36. Baranyi, J., & Roberts, T. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol.* 1994;23(3-4): 277-94.
37. Labuza, T., & Riboh, D. Theory and applications of Arrhenius kinetics to the prediction of nutrient losses in foods. *Food Technology.* 1982; 36: 66-74.
38. Ross, T., & Mcmeekin, T. Predictive microbiology-A review. *International Journal of Food Microbiology.* 1994;23(3-4):241-64.



39. Labuza, T., Fu, B., & Taoukis, P. Prediction of shelf life and safety of minimally processed CAM/MAP chilled foods: a review. *Food Protection*.1992; 55:743-750.
40. McMeekin, T., Olley, J., Ross, T., & Ratkowsky, D. A. *Predictive Microbiology: Theory and Application*. John Wiley & Sons, New York.1993. 87-115.
41. Buchanan, R., & Klawitter, L. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. *International Journal of Food Microbiology*. 1991; 12(2-3): 235-245.
42. Montville, T. Principios que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbiana en los alimentos. In: Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; y Montville, T.J. 2000.
43. Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M., & Painter, P. *Microbiología 2*. Reverté.1989.
44. Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. *Brock Biology of the Microorganisms*. Eighth edition.Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ, USA:1997.
45. Madigan , M. *Brock Biología de los Microorganismos*. Ed. Prentice Hall Iberia.1999.
46. Sutherland , J., & Bayliss, A. Predictive modelling of growth of *Yersinia enterocolitica*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology*. 1994;21(3): 197- 215.
47. Pal, A., Labuza, T., & Diez-Gonzalez, F. Comparison of primary predictive models to study the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures in liquid culturesand selection of fastest growing ribotypes in meat and turkey product slurries. *Food Microbiology*.2008;25:460-470.
48. ICMSF. International commission on Microbial specifications for Food, of the international Union of Biological Societies.*Microorganismos de los alimentos: su significado y métodos de enumeración*.Segunda ed. Zaragoza, España: Acribia S. A.; 2000.

#

49. MINSA/DIGESA. Criterios microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. NTS N° 071- 2008.
50. Payne J., Gooch J. and Barnes E. Heat-resistant Bacteria in Pasteurized Whole Egg, *Journal of Applied Bacteriology*.2008; 46(3):601-613.
51. Polo L., Mañes-Lázaro R., Olmeda I., Cruz L., Medina A., Ferrer S., Pardo I. Influence of freezing temperatures prior freeze-drying on the viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine. *Journal applied microbiology*. 2017;122 :1603 – 1614.
52. Rego I., Menezes L., Figueiredo T. Bioactive amines and microbiological quality in pasteurized and refrigerated liquid whole egg. *Poultry Science*. 2014; 93 :1018–1022.
53. Cwíková O., Nedomová Š. Microbiological quality of egg liquid products. *Potravinárstvo*.2014; (1):114-118.
54. Mahdavi M., Jalali M., Safaei H. Shamloo E. Microbial quality and prevalence of Salmonella and Listeria in eggs. *International Journal of Environmental Health Engineering*. 2012;1.
55. Miller P., Haveroen M.E., Solichová K., Merkl R., McMullen L.M., Míková K., Chumchalová J. Shelf life extension of liquid whole eggs by heat and bacteriocin treatment. *Czech J. Food Sci*.2010; 28:280–289.
56. Rivoal K, Protais J, Quéguiner S, Boscher E, Chidaine B, Rose V, Gautier M, Baron F, Grosset N, Ermel G, Salvat G .Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the heterogeneity and clonality of Salmonella serotype Enteritidis, Typhimurium and Infantis isolates obtained from whole liquid eggs, *Int. J. Food Microbiol*.2009 ;129: 180-186.
57. Walker, S.J. & Archer, P & Banks, J.G. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigerator temperature. *The Journal of applied bacteriology*.1990; 68:157-62.
58. Khan S., Sung K., Nawaz M., Cerniglia C., Tamplin M, Phillips R., Collins L. The survivability of *Bacillus anthracis* (Sterne strain) in processed liquid eggs, *Food Microbiology*. 2009; 26:123-127

59. Zárate E. Modelamiento del efecto del cloruro de sodio sobre el crecimiento y la producción de nisina de *Lactococcus lactis* [internet]. 2009. [consultado 2 abril 2019]. Disponible en: https://unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/informes_finales_investigacion/marzo_2011/zarate%20sarapura_fcnm/informe%20final.pdf
60. Cossins A.R., Sinensky, M. Adaption of membranes to temperature, pressure and exogenous lipids, *Physiology of Membrane Fluidity*. In M. Shinitzky. CRC Press, Boca Raton, Fla; 1984. 1-20.
61. Maarten J. Nauta, Sonia Litman, Gary C. Barker, Frédéric Carlin, A retail and consumer phase model for exposure assessment of *Bacillus cereus*, *International Journal of Food Microbiology*. 2003;83.
62. Methe´ B., Nelson K., Deming J., Momen B., Melamud E., Zhang X. et al. The psychrophilic lifestyle as revealed by the genome sequence of *Colwellia psychrerythraea* 34H through genomic and proteomic analyses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2005;102:10913-10918.
63. Mihoub F, Mistou M., Guillot A, Leveau J., Boubetra A., Billaux F. Cold adaptation of *Escherichia coli*: microbiological and proteomic approaches. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;89,(2-3):171-184.
64. Kandrór O., Bretschneider N., Kreydin E., Cavalieri D., Goldberg A. Yeast Adapt to Near-Freezing Temperatures by STRE/Msn2,4-Dependent Induction of Trehalose Synthesis and Certain Molecular Chaperones. *Mol Cell*. 2004;13(6): 771 – 781.
65. Bae M., Cho E., Choi E , Park O. Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. *The Plant Journal*. 2003;36(5): 577-741
66. Mindock, C.A., Petrova, M.A., and Hollingsworth, R.I. Re-evaluation of osmotic effects as a general adaptive strategy for bacteria in sub-freezing conditions. *Biophys. Chem*. 2001;89: 13–24.

B

67. Jones P. & Inouye M. RbfA, a ribosomal binding factor, is a cold shock protein whose absence triggers the cold shock response. *Mol Microbiol.* 1996; 21: 1207-1217.
68. Miller, A. J., D. O. Bayles. and B. S. Ehlen. 2000. Cold shock induction of thermal sensitivity in Listeria monocytogenes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4345-4350.
69. Storz, G., Hengge-Aronis. Bacterial stress responses. ASM Press, Washington. DC. 2000.
70. Weber M, Klein W., Muller L., Niess U. and Marahiel M. Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock *Molecular Microbiology.* 2001;39(5):1321-1329.
71. Nahed W., Walaa E., Amin M. The effect of different preservation methods on egg quality and validity. *Assiut Vet. Med. J.* 2014; 60.
72. York L. R., Dawson L. E. Shelf Life of Pasteurized Liquid Whole Egg. *Poultry Science.* 1973; 52:1657-1658.
73. Imai C., Saito J., Ishikawa M. Storage Stability of Liquid Egg Products Below 0 °C. *Poultry Science.* 1986; 65:1679-1686.
74. Ballas Egg Products Corp. Zanesville, Ohio. Liquid Egg Whites. 2017. Disponible en: http://www.ballasegg.com/assets/pdfs/2017/specifications_liquid_egg_2017.pdf
75. Premiun Nutregg. Ficha técnica huevo entero liquido pasteurizado. 2018. Disponible en: <http://disfrut.cl/wp-content/uploads/2018/09/FT-01-POE-GC-01-Huevo-L%C3%ADquido-Pasteurizado-rev.07-May18.pdf>
76. Góngora-Nieto M., Pedrow P. Swanson G., Barbosa-Cánovas G. Energy analysis of liquid whole egg pasteurized by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering.* 2003; 57:209-216

ANEXOS



MATRÍZ DE CONSISTENCIA

Título: DETERMINACIÓN DEL EFECTO TÉRMICO SOBRE EL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS MESOFILOS AEROBIOS DEL HUEVO LÍQUIDO PASTEURIZADO PARA LA ESTIMACIÓN DE LA VIDA ÚTIL MEDIANTE EL MODELO DE ARRHENIUS.

Autor: Edgar Zárate Sarapura **Lugar de ejecución:** Laboratorio OVITEC. Laboratorio Ciencias Nautales 2017 – 2019

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA	INDICADOR ES
¿De qué manera influye la temperatura sobre la cinética del crecimiento de los microorganismos mesófilos aerobios (MMA) y de la vida útil del huevo líquido pasteurizado (HLP) y predecirlo mediante el modelo de Arrhenius?	<p>Objetivo general Determinar el efecto térmico sobre el crecimiento de MMA del HLP para la estimación de la vida útil mediante el modelo de Arrhenius.</p> <p>Objetivos específicos</p> <ol style="list-style-type: none"> Determinar los parámetros cinéticos del crecimiento MMA a temperaturas de -10 °C, 0 °C y 10°C mediante el modelo primario Barangy y Roberts. Determinar el estado fisiológico de los MMA presente en el HLP. Caracterizar la cinética de adaptación de los MMA presente en el HLP Determinar el tiempo de vida útil del HLP en relación a los microorganismos mesófilos aerobios utilizando el modelo de Arrhenius. 	<p>Hipótesis Si se determina el efecto térmico sobre la cinética del crecimiento de los MMA en el HLP entonces se estimará el tiempo de vida útil mediante el modelo de Arrhenius.</p> <p>Hipótesis específicas</p> <ul style="list-style-type: none"> Los parámetros cinéticos del crecimiento del MMA obtenidos mediante el modelo primario Barangy y Roberts se modifican por efecto de temperaturas de -10 °C, 0 °C y 10°C El estado fisiológico de los MMA presente en el HLP es dependiente de la temperatura La cinética de adaptación de los MMA presente en el HLP es función de la temperatura. El tiempo de vida útil del HLP determinado por el modelo de Arrhenius está relacionado a la velocidad del crecimiento de los MMA 	<p>Variable dependiente: :</p> <p>Vida útil</p> <p>Variable independiente e: Temperatura</p>	<p>Diseño: Experimental, Prospectivo y Longitudinal 3 grupos experimentales. Cada uno a -10, 0 y 10 °C, respectivamente.</p> <p>Técnicas de recolección de datos *Determinación de parámetros de crecimiento de MMA a Temperaturas -10, 0, y 10 °C. $Y = c + \ln\left(\frac{-1 + \exp(b \cdot d) + \exp(b \cdot x)}{1 + \exp(b \cdot x) + \exp((b \cdot d) + c - a)}\right)$ </p> <p>Caracterización de adaptación de los MMA presente en HLP conservado a -10, 0 y 10 °C. $\lambda \text{ (horas)} = (M - (1/B)) + ((\log N - A) / ((B \times D) / \exp(1)))$ </p> <p>Determinación del Estado fisiológico de los MMA en HLP conservado a -10, 0 y 10 °C. $(h_0) = 10^{(-\log(\lambda) \cdot \mu_{\max})}$ Determinación de la vida útil del HLP en función de MMA a temperaturas de -10, 0, 10 °C $\mu = A e^{\frac{-E_a}{RT}}$ </p>	<p>Variación UFC/mL</p> <p>Parámetros cinéticos por Modelo de Barangy y Arrhenius</p>

BASE DE DATOS

Crecimiento de microorganismos mesófilos aerobios en huevo líquido pasteurizado conservado a 4 °C y variación del pH y sólidos Totales. (Valores promedios n=5)

Días	LOG UFC/mL	pH	Sólidos Totales
0	92	7.56	26
1	100	7.56	26
2	102	7.56	26
3	105	7.54	26
4	105	7.52	26
5	107	7.51	25.9
6	110	7.48	25.9
7	112	7.44	25.9
8	115	7.39	25.6
9	155	7.36	25.4
10	360	7.32	25.2
11	760	7.25	25
12	1250	7.21	24.8
13	2420	7.11	23.4
14	3890	6.83	22.1

Crecimiento de microorganismos mesófilos aerobios en huevo líquido pasteurizado conservado a 4 °C por un periodo de 21 días. (Valores promedios n=3)

Huevo líquido pasteurizado	Crecimiento de mesófilos aerobios UFC/mL			
	Días de almacenamiento a 4°C			
	1	7	14	21
MUESTRA A	1047	6026	6918	660693
	2754	4467	5888	93325
	603	2884	10715	229087
MUESTRA B	363	575	6026	47863
	741	1072	9550	575440
	1445	6026	741310	2187762
MUESTRA C	4467	60256	3467369	21379621
	1660	8913	758578	2630268
	5623	16596	870964	7585776

Crecimiento de microorganismos mesófilos aerobios (UFC/mL) en huevo líquido pasteurizado conservado a -10 °C, 0 °C y 10 °C. (Valores promedios n=3)

Crecimiento de microorganismos mesófilos aerobios (UFC/mL)			
Horas	-10 °C	0 °C	10 °C
0	138.04	123.03	91.20
12	144.54	131.83	120.23
24	144.54	144.54	186.21
36	165.96	154.88	501.19
48	177.83	269.15	1258.93
60	213.80	489.78	3235.94
72	331.13	1023.29	10232.93
84	489.78	1905.46	26302.68
96	660.69	3715.35	53703.18
108	776.25	6606.93	85113.80
120	1023.29	9772.37	125892.54
132	1288.25	12022.64	165958.69
144	1348.96	13803.84	239883.29

Crecimiento de microorganismos mesófilos aerobios (UFC/mL) en huevo líquido pasteurizado a 15 °C, 25 °C y 35 °C. (Valores promedios n=3) para determinación de la vida útil

Crecimiento de microorganismos mesófilos aerobios (UFC/mL)			
Horas	15 °C	25 °C	35 °C
0	91.90	104.71	114.82
12	95.50	123.03	288.40
24	108.81	134.90	602.56
36	116.01	165.96	18620.87
48	125.56	724.44	724435.96
60	183.37	3548.13	10964781.96
72	313.81	16982.44	363078054.77
84	825.40	138038.43	4466835921.51
96	2670.96	758577.58	16595869074.38
108	10797.75	6760829.75	36307805477.01
120	34145.49	17782794.10	42657951880.16
132	52480.75	40738027.78	52480746024.98
144	74131.02	70794578.44	67608297539.20