UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

**Departamento de Ingeniería de los Alimentos y del
Equipamiento Agrícola**

**Validación física y biológica de tratamientos térmicos
aplicados en un reactor prototipo para la industria
alimentaria**

María Dolores López Martínez

2012

**CONFORMIDAD DE SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE DEPÓSITO DE
TESIS DOCTORAL POR EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS**

D. Alfredo Palop Gómez y Dña. Presentación García Gómez, directores de la Tesis doctoral
“Validación física y biológica de tratamientos térmicos aplicados en un reactor prototipo
para la industria alimentaria”

INFORMAN:

Que la referida Tesis Doctoral, ha sido realizada por D^a. María Dolores López Martínez,
dando nuestra conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

La rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- ☐ Ciencias
- ☐ Ciencias Sociales y Jurídicas
- ☒ Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 10 de mayo de 2012

LOS/LAS DIRECTORES/AS DE LA TESIS

Fdo.: Alfredo Palop Gómez

Presentación García Gómez

COMISIÓN DE DOCTORADO

**CONFORMIDAD DE DEPOSITO DE TESIS DOCTORAL
POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA**

D. Francisco Artés Hernández, Presidente/a de la Comisión Académica del Programa
Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario.

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada, "Validación física y biológica de tratamientos térmicos aplicados en un reactor prototipo para la industria alimentaria", ha sido realizada por D^a. María Dolores López Martínez bajo la dirección y supervisión del Dr. Alfredo Palop Gómez y la Dra. Presentación García Gómez, dando su conformidad a la misma la Comisión Académica, con la finalidad de que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

La Rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- ☐ Ciencias
- ☐ Ciencias Sociales y Jurídicas
- ☒ Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 10 de mayo de 2012

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA

Fdo. Francisco Artés Hernández

COMISIÓN DE DOCTORADO

A mis padres,

AGRADECIMIENTOS

Durante estos años son muchas las personas que han contribuido, de una u otra forma, al desarrollo de esta tesis, y por ello les quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directores de tesis.

A la Doctora Presentación García Gómez, una vez más no tengo palabras para agradecerte todo lo que haces por mi, si hoy estoy escribiendo esto es gracias a ti, gracias por tu confianza día a día y por tu apoyo indiscutible.

Al Catedrático Alfredo Palop Gómez, gracias por abrirme las puertas del departamento, por todo lo que me has enseñado, por todo el tiempo que has dedicado en esta tesis, por estar ahí siempre que te he necesitado y por enseñarme que todo tiene una explicación. Es un placer trabajar contigo.

A D. Luis Dussac Moreno, gracias por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis y seguir contando conmigo como parte del equipo de Centro Tecnológico.

A D. Pedro Sánchez Campillo, gracias por estar siempre ahí cuando necesito tanto una enciclopedia como un amigo. Gracias por ser mi mejor ejemplo de profesionalidad y persona.

A D. Juan Alarcón González, gracias por confiar en mí para la realización de cualquier trabajo, por tu amistad y tus consejos.

A David, gracias por ponerle música a la planta piloto, por ayudarme a hacer todas las pruebas como si de tu tesis se tratase y por ser tan buen compañero y amigo.

A María, con la que he ido de la mano todos estos años, compartiendo fallos y éxitos, dispuesta siempre a ayudarme. Gracias por tener el corazón tan grande, aquí me tienes para lo que necesites.

A Rocío, que me inició en el mundo de la microbiología, gracias por todas las placas que sembramos juntas, por hacer todos esos momentos tan divertidos, por enseñarme que con esfuerzo todo se consigue y por ser tan especial.

A Mila, gracias por escuchar cada día mis alegrías, mis penas, por toda tu atención, toda la ayuda prestada, y sobre todo por las prisas de última hora.

A Ángel, porque aunque no se te oiga mucho siempre estás ahí cuando mas se te necesita.

A Ana, no sabía que en la Universidad me había perdido a una persona tan especial, gracias por estar siempre ahí.

A Marian, por toda la ayuda documental prestada, tan imprescindible en la realización de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio en la Universidad de Cartagena, Raquel, María Dolores, Vera, May, Marina, Fermín, Juan Pablo y Leymaya, por todo lo que me habéis enseñado, toda la ayuda prestada, pero sobre todo por vuestra acogida, confianza y por hacerme sentir como uno más, mil gracias.

También agradecer a personas que pasan por el CTC y han dejado su pequeña huella en esta tesis, gracias Edu, Nacho y Raquel.

A mis chicas, Isa, Mayka, Clemen, Noelia, Elisa, Alicia, Sere y Jose por todo lo que me hacen reír que me ayuda a despejar la mente y a pensar mejor.

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el apoyo incondicional de mi familia, mis padres y mis hermanas.

Por último agradecer a mi marido, su comprensión, apoyo, ayuda y ánimo en todo momento.

RESUMEN

El cálculo del tratamiento térmico que ha recibido un alimento es un punto crítico en cuanto a seguridad alimentaria se refiere. Los microorganismos son excelentes indicadores del nivel de letalidad alcanzado tras un proceso de esterilización. La evaluación microbiológica requiere la utilización de integradores tiempo-temperatura (ITTs), especialmente diseñados para que los esporos de los microorganismos queden inmovilizados, que puedan procesarse y que, analizados posteriormente, permitan comprobar el impacto del calor sobre el alimento.

En esta tesis doctoral se han desarrollado dos tipos de ITTs microbiológicos capaces de evaluar la severidad del tratamiento térmico aplicado. Un ITT para la validación de tratamientos térmicos aplicados a alimentos ácidos, seleccionando *Alicyclobacillus acidoterrestris* como elemento sensor. Para la validación de tratamientos de esterilización de alimentos de baja acidez se desarrolló un ITT con *Bacillus sporothermodurans* como elemento sensor.

A los microorganismos seleccionados se les determinó su termorresistencia bajo condiciones isotérmicas y no isotérmicas simulando los tratamientos térmicos industriales de esterilización de vesículas de mandarina y sopa de verduras. Se obtuvo un valor de $D_{105\text{ }^{\circ}\text{C}} = 0,63\text{ min}$ y un $z = 10,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ en zumo de mandarina para *A. acidoterrestris*, mostrando curvas de supervivencia lineales, sin hombros ni colas. Para *B. sporothermodurans* se obtuvieron curvas de supervivencia con hombros que, no obstante, fueron reproducibles y predecibles mediante el uso de modelos no lineales como el de Weibull (valores $\delta_{135\text{ }^{\circ}\text{C}} = 0,13\text{ min}$ y $z = 7,6^{\circ}\text{C}$ en solución de almidón) o el de Geeraerd (valores $D_{135\text{ }^{\circ}\text{C}} = 0,10\text{ min}$ y $z = 7,9^{\circ}\text{C}$ en el mismo medio). Para ambos microorganismos, la predicción de inactivación microbiana bajo condiciones no isotérmicas se pudo realizar adecuadamente a partir de los datos obtenidos en condiciones isotérmicas.

Los esporos de los microorganismos seleccionados fueron incluidos en ITTs de alginato y utilizados para evaluar los tratamientos térmicos aplicados en el termorresistómetro Mastia y en un reactor prototipo piloto. Estos tratamientos simulaban los tratamientos térmicos industriales de esterilización de las vesículas de mandarina y sopa de verduras. En ambos equipos los ITTs predijeron con exactitud la

letalidad de los tratamientos térmicos aplicados, mostrando que la distribución del calor es homogénea. También permitieron detectar sobreprocesados en los tratamientos aplicados en el reactor prototipo piloto, poniendo de manifiesto la conveniencia de llevar a cabo validaciones biológicas de los tratamientos térmicos que se aplican en la industria alimentaria, especialmente cuando la medida de la temperatura en el interior de los equipos es incierta.

ABSTRACT

The calculation of the heat treatment that a food has received is a critical point in terms of its safety. Microorganisms are excellent indicators of the lethality levels achieved after a sterilization process. The microbiological evaluation requires the use of time-temperature integrators (TTIs), specially designed for microbial spores to be immobilized, that, once processed and subsequently analysed, will allow to check the impact of heat on the product sterility.

Two types of microbiological TTIs able to assess the severity of the heat treatment applied were developed in this thesis. A TTI for the validation of thermal treatments applied to acid foods used, selecting *Alicyclobacillus acidoterrestris* as a sensor element. The other TTI was for low acid foods. In this case *Bacillus sporothermodurans* was chosen as a sensor element.

The heat resistance of these microorganisms was analysed under isothermal and non-isothermal conditions simulating the industrial heat treatments of tangerine vesicles and vegetable soup. The heat resistance of *A. acidoterrestris* was characterized by $D_{105} = 0,63$ min and $z = 10,8$ °C in tangerine juice, showing linear survival curves, without shoulders and tails. The isothermal survival curves of *B. sporothermodurans* showed shoulders. These curves could be appropriately described by the non linear models of Weibull ($\delta_{135\text{ C}} = 0,13$ min and $z = 7,6^{\circ}\text{C}$ in starch solution) and Geeraerd ($D_{135\text{ C}} = 0,10$ min and $z = 7,9^{\circ}\text{C}$ in this same medium). Predictions of microbial inactivation under non-isothermal conditions was, for both microorganisms, accurately performed from isothermal data.

The spores were included in alginate TTIs and they were used to estimate the severity of thermal treatments applied both in a thermoresistometer Mastia and in a food pilot plant scale system. These treatments simulated the sterilisation treatments applied in the food industry for tangerine vesicles and vegetable soups.

In both equipments, the TTIs accurately predicted the lethality of the thermal treatments applied, showing that heat distribution was homogeneous. They also enabled to find out overprocessing in the thermal treatments applied in the pilot plant scale system, showing the convenience of performing biological validation of the thermal treatments applied in the food industry, especially when uncertainty in temperature measurements inside the equipments exists.

ÍNDICE

1. Antecedentes	1
1.1. Microorganismos de interés en los alimentos procesados por calor	3
1.1.1. Características generales de los esporos.....	4
1.1.2. Ciclo biológico de los esporulados.....	6
1.1.2.1. La esporulación	6
1.1.2.2. Transformación del espora en célula vegetativa	10
1.1.3. Mecanismos de termorresistencia.....	13
1.2. <i>Bacillus sporothermodurans</i>	16
1.3. <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	19
1.4. Termorresistencia microbiana	23
1.4.1. Cinética de destrucción microbiana por el calor	23
1.4.1.1. Primera ley o ley de supervivencia.....	24
1.4.1.2. Curvas de supervivencia no logarítmicas	26
1.4.1.3. La distribución de Weibull	31
1.4.1.4. Segunda ley o ley de la destrucción térmica.....	33
1.4.2. Métodos para determinar la termorresistencia microbiana	34
1.4.2.1. Sistemas de calentamiento indirecto.....	35
1.4.2.2. Sistemas de calentamiento directo.....	37
1.4.2.3. Sistemas de mezcla.....	40
1.4.2.4. Métodos de partícula	41
1.4.3. Factores que afectan a la termorresistencia	41
1.5. Tratamientos térmicos	46
1.5.1. Pasteurización.....	47
1.5.2. Esterilización	47
1.5.3. Equipos para la aplicación de tratamientos térmicos.....	48
1.5.3.1. Equipos para la aplicación de tratamientos térmicos de productos envasados.....	48
1.5.3.2. Equipos para la aplicación de tratamientos térmicos de productos no envasados.....	53

1.5.4. Otros sistemas para la aplicación de tratamientos térmicos	55
1.6. Evaluación de los procesos de esterilización en los alimentos.....	57
1.6.1. Métodos de evaluación de tratamientos térmicos.....	57
1.6.1.1. Método “in situ”	58
1.6.1.2. Métodos físico-matemáticos.....	58
1.6.1.3. Integradores tiempo-temperatura.....	59
1.6.1.3.1. Integradores tiempo-temperatura químicos.....	61
1.6.1.3.2. Integradores tiempo-temperatura físicos	61
1.6.1.3.3. Integradores tiempo-temperatura biológicos.....	61
1.6.2. Evaluación de otros métodos de procesamiento de alimentos	65
1.6.2.1. Microondas	65
1.6.2.2. Altas presiones.....	66
1.6.2.3. IV y V gama	69
1.6.3. Validación física y biológica de los tratamientos térmicos	70
2. Justificación y objetivos	75
3. Materiales y métodos.....	77
3.1. Microorganismos	79
3.2. Elaboración de suspensiones de esporos	80
3.3. Mineralización de <i>Bacillus megaterium</i> con manganeso y con calcio	81
3.4. El termorresistómetro mastía.....	81
3.5. Determinación de termoresistencia de microorganismos en termorresistómetro.....	83
3.6. Recuento de supervivientes	84
3.7. Reactor prototipo para la industria alimentaria	84
3.8. Elaboración de integradores tiempo-temperatura.....	87
3.9. Validación con integradores tiempo-temperatura a escala laboratorio	88
3.10. Validación con integradores tiempo-temperatura a escala planta piloto.....	88
3.10.1. Características de la prueba con vesículas de mandarina	88
3.10.2. Características de la prueba con almidón	89

3.11. Cálculo del número de microorganismos supervivientes	89
3.12. Análisis de datos	90
3.12.1. Cálculo de los valores D y z en condiciones isotérmicas	90
3.12.2. Modelo de Weibull	90
3.12.3. Modelo de Geeraerd	91
3.12.4. Predicción del número de supervivientes en condiciones no isotérmicas ..	92
3.12.5. Análisis estadístico	94
3.13. Funciones de distribución	94
 4. Resultados	 95
 4.1. CAPITULO I: Selección de un microorganismo adecuado para la validación biológica de tratamientos térmicos aplicados a alimentos ácidos.	 97
4.1.1. Estudio comparativo de la termorresistencia a pH 3,5 y 95°C en distintas especies del género <i>Bacillus</i> y <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	102
4.1.2. Estudio comparativo de la termorresistencia a pH 3,5 y en condiciones no isotérmicas en distintas especies del género <i>Bacillus</i> y <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	107
4.1.3. Influencia de las condiciones de esporulación en la termorresistencia de <i>B. megaterium</i>	109
4.1.4. Influencia de un tratamiento de mineralización en la termorresistencia de <i>Bacillus megaterium</i>	111
 4.2. CAPITULO II: “Validación del tratamiento térmico con <i>Alicyclobacillus</i> <i>acidoterrestris</i> aplicado a un alimento ácido en el reactor prototipo T-sensation”	 115
4.2.1. Efecto del medio de calentamiento en la termorresistencia de <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	117
4.2.2. Termorresistencia de <i>A. acidoterrestris</i> bajo condiciones no isotérmicas	121

4.2.3. Validación del tratamiento térmico a escala laboratorio y a escala planta piloto	123
4.2.4. Ajuste de distribuciones a los datos de supervivientes en ITTs.	126
4.3. CAPITULO III: “Validación del tratamiento térmico con <i>Bacillus sporothermodurans</i> aplicado a un alimento de baja acidez en el reactor prototipo T-sensation”	129
4.3.1 Termorresistencia de <i>Bacillus sporothermodurans</i> en condiciones isotérmicas.	132
4.3.2. Utilización de los modelos de Weibull y Geeraerd para describir el fenómeno de hombro en la inactivación por calor de los esporos de <i>B. sporothermodurans</i> sometidos a tratamientos isotérmicos de calentamiento	133
4.3.3. Termorresistencia de <i>B. sporothermodurans</i> bajo condiciones no isotérmicas	137
4.3.4. Validación del tratamiento térmico aplicado a un alimento de baja acidez a escala laboratorio y a escala planta piloto	138
4.3.5. Análisis estadístico	143
5. Conclusiones.....	147
6. Bibliografía.....	153

1. ANTECEDENTES

1.1. Microorganismos de interés en los alimentos procesados por calor.

Los principales tipos de microorganismos que participan en el deterioro de los alimentos son bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Pueden atacar prácticamente todos los componentes de los alimentos, y cuando éstos se contaminan bajo condiciones naturales, es probable que actúen a la vez varios tipos de microorganismos y contribuyan a una serie de cambios simultáneos (Davis y col., 1996).

Ciertas bacterias grampositivas pueden sintetizar una forma de resistencia, el esporo, que les permite sobrevivir en condiciones más desfavorables, y se transforma de nuevo en una forma vegetativa cuando las condiciones del medio vuelven a ser favorables. Las

bacterias esporuladas son las que tienen más interés en los alimentos tratados por calor, por su elevada termorresistencia. De todas las bacterias que forman esporos, las más estudiadas por su importancia tanto económica como sanitaria, han sido las pertenecientes a la familia *Bacillaceae*: *Bacillus*, *Clostridium* y *Desulfotomaculum* (Zechman, 1988). Hasta ahora los alimentos ácidos estaban excluidos de los alimentos con riesgo de alteración por parte de esporulados, hasta que Cerny y col. (1984) encontraron una nueva bacteria responsable del deterioro de zumo de frutas pasteurizado, llamada *Bacillus acidoterrestris* por Deinhart y col. (1987) y renombrada como *Alicyclobacillus* por Wisotzkey y col. (1992), debido a la diferente composición de los ácidos grasos de su membrana plasmática.

1.1.1. Características generales de los esporos.

El descubrimiento de los esporos tuvo lugar en 1876 por Ferdinand Cohn durante un estudio sobre las bacterias que eran capaces de sobrevivir en medios sometidos a ebullición. Simultáneamente, Robert Koch describía el ciclo completo de *Bacillus anthracis* y demostraba la relación existente entre los esporos y determinados bacilos (Keynan y Sandler, 1983).

Los esporos bacterianos comienzan a formarse durante la fase estacionaria de crecimiento, cuando se han agotado uno o más nutrientes del medio, pueden sobrevivir en ambientes adversos durante meses o años y, una vez que las condiciones de crecimiento sean apropiadas, pueden germinar y desarrollarse para formar células vegetativas. Los esporos se caracterizan por un bajo contenido de agua y porque no tienen un metabolismo detectable. Además, son altamente resistentes a las altas temperaturas, la congelación, las radiaciones y a la acción de ciertas sustancias químicas. Su estructura única es la que determina sus propiedades de resistencia.

Se ha avanzado considerablemente en el conocimiento de la estructura del espora gracias a los trabajos de Tipper y Gautier (1972), Warth (1978a), Russell (1982), Gombas (1983) y Gould (1984), entre otros.

El espora es, en esencia, un protoplasto deshidratado rodeado de una serie de envolturas. Desde el interior hacia fuera podemos distinguir el protoplasto, la membrana

plasmática, la pared celular, el córtex o corteza, las cubiertas o envolturas externas y un exosporio, el cual puede estar rodeado por una capa superficial (Figura 1).

El **citoplasma** o **protoplasto** está rodeado por la membrana plasmática y contiene ADN, ARN, proteínas, enzimas, lípidos y otras moléculas más pequeñas. La cantidad de agua libre del protoplasto del espora es mucho menor que la de las células vegetativas, estimándose según Warth (1978a) una actividad de agua del orden de 0,73. El protoplasto del espora contiene gran cantidad de minerales, especialmente calcio y otros cationes divalentes (Murrell y Warth, 1965). En esta estructura deshidratada del protoplasto se encuentran además grandes cantidades de ácido dipicolínico (DPA). El DPA es una sustancia característica de los esporos, que no se encuentra en las células vegetativas. Además del posible papel que juega en la termorresistencia bacteriana, también parece estar implicado en el mantenimiento de la latencia y/o inicio de la germinación (Hersom y Hutland, 1985).

Rodeando al protoplasto se encuentran la **membrana** y la **pared celular**, ambas similares a las de las células vegetativas (Warth, 1978a). Estas dos capas constituyen la denominada membrana interna del espora (Setlow, 2003).

Rodeando a la pared celular, se encuentra el **córtex** o corteza, estructura necesaria para mantener la latencia del espora y que le confiere su resistencia al calor y otros agentes físicos, al mantener el grado de deshidratación necesario (Gould y Dring, 1975; Nakashio y col., 1985; Beaman y col., 1988; Marquis y col., 1994).

Por encima del córtex se encuentra la membrana externa del espora, la cual a su vez está formada por las envolturas externas y el exosporio (Setlow, 2003).

Las **envolturas externas** las forman tres capas. La más interna está formada por un material poco consolidado, incluyendo restos de citoplasma de la célula madre y de la membrana del preespora. La capa intermedia tiene una estructura laminada y la más externa es fina, sin estructura laminar (Murrell y col., 1965).

El **exosporio** es una capa sin estructura organizada, que se encuentra solamente en algunas especies de esporulados, como *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sporothermodurans* y algunas especies del género *Clostridium*. Esta estructura puede tener un papel protector frente a algunas sustancias nocivas para el espora, pero no parece que intervenga en la resistencia térmica del mismo, ni como barreras de permeabilidad (Nicholson y col., 2000).

Figura 1.1. Estructura del espora bacteriano. Corte transversal de *Bacillus sporothermodurans*. Fuente: Tabit y Buys, 2010.

1.1.2. Ciclo biológico de los esporulados.

En el ciclo biológico de los esporulados pueden apreciarse dos procesos diferentes, uno es el crecimiento vegetativo (similar al del resto de las especies bacterianas) y el otro es el ciclo del espora. El ciclo del espora es la serie de transformaciones que parten de una célula vegetativa, pasan por la formación de esporos y terminan en otra nueva célula vegetativa (Zechman y Pflug, 1988).

Si las condiciones son adecuadas la célula se multiplica y se produce el crecimiento vegetativo, pero si hay una deficiencia nutricional se activa el proceso de formación de un espora, que se mantendrá en estado latente hasta que las condiciones sean adecuadas para la germinación (Keynan y Sandler, 1983).

1.1.2.1. La esporulación.

La esporulación es el proceso por el cual la célula vegetativa con actividad metabólica normal se convierte en una forma de resistencia.

Habitualmente la esporulación se completa en ocho horas (Gould, 1984) y se acepta la existencia de siete etapas morfológicas de acuerdo a los trabajos de Warth (1978a),

Setlow (1981), Keynan y Sandler (1983) y Freese y Heinze (1983), tal y como muestra la figura 1.2.

En la **fase 0**, la célula se encuentra en la etapa final del crecimiento exponencial y contiene un cromosoma, que recibe el mensaje de que se ha producido una carencia nutritiva.

En la **fase 1** o de formación del filamento axial, el ADN se hace más denso y ocupa el centro de la célula, además se inicia la formación del presepto. La formación del filamento axial parece que responde a una reordenación de la molécula de ADN (Keynan y Sandler, 1983). No se puede considerar como una fase específica del proceso de esporulación por ser igual a la fase que se produce en condiciones normales de crecimiento.

En esta fase comienza un importante recambio intracelular de proteínas. Según numerosos autores en esta fase el espora excreta al exterior la mayor parte de los antibióticos y enzimas, por lo que estos compuestos pueden considerarse como indicadores tempranos de la esporulación (Coote y Binnie, 1981).

Durante la **fase 2** o de formación del septo, se forma un tabique cerca del polo celular a causa de la invaginación de la membrana citoplasmática. La septación se completa dando origen a dos compartimentos separados, el preespora y la célula madre. La formación del septo asimétrico es el primer suceso que diferencia a la esporulación (Keynan y Sandler, 1983).

La **fase 3** o de inclusión de la preespora dura una hora y en ella se inicia una invaginación del preespora hacia el citoplasma de la célula madre, que termina por englobarlo. El citoplasma del espora en formación queda delimitado por dos membranas debido al crecimiento de la membrana citoplasmática y la pared celular alrededor del protoplasto. La membrana más interna se transformará en la pared celular del espora en formación, mientras que la más externa se transformará en las envolturas celulares y exosporio (Setlow, 2003).

Al finalizar esta fase, el protoplasto del preespora se encuentra envuelto por una doble membrana. La orientación de la membrana externa se encuentra invertida lo que dificulta el transporte, que se reduce a un fenómeno de difusión. A partir de esta fase la célula madre pierde viabilidad y es incapaz de sintetizar ADN, perdiendo además la

capacidad de crecimiento al ser transferida a un medio favorable (Lundgren y col., 1969).

Tras la invaginación, el protoplasto del preesporo sufre importantes cambios biofísicos, que conducen a su diferenciación como esporo. Estos cambios incluyen modificaciones en el ADN, aparición de unas proteínas pequeñas solubles en medio ácido (SASP), síntesis de DPA, aumento del contenido en calcio, reducción del volumen del esporo, formación del córtex y adquisición de refringencia (Murrell, 1981; Freeze y Heinze, 1983).

En la **fase 4** o de formación del córtex, comienza a formarse el córtex del esporo por el depósito de un peptidoglicano específico del esporo entre la membrana externa e interna. Además comienza la acumulación de calcio en el preesporo, y la síntesis de DPA (Murrell, 1981). Al mismo tiempo se produce un descenso del pH interno del esporo en aproximadamente 1 ó 2 unidades (Setlow, 1981).

En esta fase los esporos empiezan a ser refringentes, pero presentan una resistencia mínima a diversos agentes físicos y químicos (Murell, 1981).

La **fase 5** o de síntesis de la cubierta dura dos horas. La membrana exterior se transforma en la capa cortical por la incorporación de proteínas. En esta fase las proteínas son procesadas por enzimas proteolíticos específicos e integradas en dichas envolturas. Posteriormente estas envolturas pueden sufrir cambios (Keynan, 1978).

En la **fase 6** se produce la maduración del esporo, se finaliza la síntesis de la cubierta y el esporo se consolida como forma de resistencia. El citoplasma se vuelve homogéneo y electrodenso. En esta fase se le confiere al esporo su característica termorresistencia.

En la última fase, **fase 7** o de lisis del esporangio, la célula madre se lisa y el esporo sale al exterior. Sin embargo, no todos los esporos se liberan de la célula madre.

El esporo, una vez formado, se mantiene en estado latente hasta que las condiciones son adecuadas para germinar y desarrollarse. En estado latente puede estar hasta millones de años (Slepecky y Leadbetter, 1986). La causa de su prolongada supervivencia es su estado ametabólico. El esporo maduro posee una serie de sistemas enzimáticos que, sin embargo no son capaces de actuar, posiblemente por su estado de

agregación con los minerales y/o por el grado de deshidratación del protoplasto (Marquis y col., 1985; Beaman y col., 1984)

Figura 1.2. Ciclo de esporulación. (Fuente: Prescott y col., 2004).

Además del mantenimiento de la latencia, es muy importante el mecanismo por el que se instaura, ya que en la fase de esporulación coexisten en el preesporo, todavía metabólicamente activo, los enzimas y substratos que, posteriormente, durante la germinación, permitirán la reactivación del metabolismo en pocos minutos. Según Setlow (1994) se produce una inhibición enzimática de tal magnitud, que sólo puede ser el resultado de la presencia en el esporo en fase de esporulación de formas inactivas de los enzimas (proenzimas) y de la ausencia de agua.

Estos proenzimas serían transformados en los enzimas activos en las últimas fases de la esporulación, cuando la cantidad de agua presente en los esporos ya no es suficiente para permitir la actividad enzimática (Setlow, 1994). Posteriormente, la

rehidratación que tiene lugar en la germinación permitirá la rápida activación de todos estos sistemas enzimáticos.

1.1.2.2. Transformación del espora en célula vegetativa.

La transformación del espora en célula vegetativa comprende tres fases: activación, germinación y desarrollo.

La **activación** es un cambio reversible, no metabólico, en la estructura terciaria de determinadas proteínas del espora. Se produce una activación de los enzimas latentes y cambios morfológicos y estructurales (Berg y Sandine ,1970). El espora se hace sensible a diversos factores que pueden estimular su germinación, pero no se ve afectada su resistencia característica a los agentes físicos y químicos.

Los principales factores responsables de la activación de los esporos son el calor, los pHs extremos y los agentes reductores (Foster y Johnstone, 1989). Parece que el porcentaje de activación aumenta con el tiempo y con la temperatura de calentamiento (Russell, 1982). La activación se ve afectada por el pH, existiendo una amplia variación en la respuesta de la activación a pH ácidos. El valor mínimo oscila entre menos de 4 para *Bacillus subtilis* (Thorley, 1961) a 6,5-7 para *Clostridium sporogenes* PA 3679 (Uehara y Frank, 1965), pasando por 5,4 en *Bacillus stearothermophilus* (Fernández y col., 1994).

La **germinación** es un proceso irreversible en que una serie de procesos degradativos, inducidos por germinantes específicos, conducen a la pérdida de las propiedades típicas del espora (Johnstone, 1994). Durante la germinación, el espora restaura su actividad metabólica normal (Keynan y Sandler, 1983).

Según Vinter (Russell, 1982) la germinación comenzaría con la pérdida de la impermeabilidad del espora. Los enzimas líticos se activan, el córtex se degrada, se liberan los fragmentos del peptidoglicano y seguidamente las estructuras del espora se hidratan. El calcio y el DPA son también rápidamente eliminados, de modo que inicialmente se produce una reducción del volumen del espora, que luego aumenta, hasta un 30%, a causa de la rehidratación (Murrell, 1981). Durante el proceso de

germinación se produce la degradación no sólo del peptidoglicano del córtex sino también de las capas exteriores (Chirakkal y col., 2002).

La germinación puede iniciarse por estímulos físicos o químicos, tales como nutrientes (L-alanina, purina, azúcares, etc.), calcio, DPA, enzimas (lisozima), presión hidrostática y otros agentes mecánicos (Russell, 1982). El calor reduce los requerimientos en L-alanina y otros germinantes (Russell, 1982). Según Adams (1978) el esporo posee más de un sistema de germinación, de modo que cuando el sistema principal resulta dañado, se estimula uno secundario, que puede precisar de diferentes condiciones de cultivo, de ahí la gran variedad de estimulantes de la germinación.

La reacción desencadenante de la germinación se desconoce, pero parece más bien un cambio alostérico en una proteína de la membrana que una reacción metabólica (Keynan, 1978), ya que no requiere la síntesis de macromoléculas ni la producción de energía (Setlow, 1983).

Se ha propuesto que la germinación se podría desencadenar por la unión de unos germinantes a sus receptores específicos (Setlow, 2003). Los germinantes (aminoácidos, nucleósidos o azúcares) atravesarían las capas exteriores del esporo e interactuarían con los receptores de la germinación, que se sitúan en la membrana interna del esporo, y esta interacción desencadenaría la eliminación del ácido dipicolínico y los cationes, así como el reemplazamiento de estos compuestos por agua, con la subsiguiente expansión de la pared celular, la hidratación total del protoplasto, la reanudación del metabolismo del microorganismo y la síntesis de macromoléculas (Setlow, 2003). Otras hipótesis plantean que el sistema de germinación podría ser una proteasa, situada probablemente en la membrana interna del esporo, y mantenida en estado inactivo durante la fase de latencia. Durante la fase de activación se produciría un cambio estructural que facilitaría su unión al germinante. Esta unión causaría un nuevo cambio estructural que la activaría definitivamente. La proteasa activa actuaría sobre el enzima lítico del córtex, presente en el esporo latente en forma de proenzima, liberando al enzima activo, que comenzaría la lisis del córtex. La lisis del córtex sería el primer suceso visible de la germinación (Johnstone, 1994).

Setlow y col. (2001) consideran que la germinación se puede subdividir, a su vez, en dos etapas. En la primera se produce una liberación de cationes (H^+ , Zn^{2+} y Ca^{2+}) y de

DPA, que son reemplazados por agua. Los cationes proceden probablemente del protoplasto. La liberación de H^+ produce un aumento del pH del protoplasto de 6,5 a 7,7, cambio esencial para el metabolismo del espora una vez que la hidratación es suficientemente alta para la acción enzimática (Jedrzejak y col., 2001). El reemplazamiento del DPA por agua provoca un incremento de la hidratación del protoplasto y la consiguiente disminución de la resistencia del espora. En la segunda fase se produce la hidrólisis de la capa de peptidoglicano del córtex y el hinchamiento del protoplasto por la entrada masiva de agua (iniciada ya en la fase anterior). Esta rehidratación permite la movilización de proteínas y la acción enzimática.

Según Atrih y col. (1998 y 1999), existen por lo menos tres tipos de actividad enzimática en el proceso de hidrólisis del córtex: glucosaminidasa, lítica transglicosilasa y epimerasa no hidrolítica.

La localización y función de las enzimas líticas del córtex de *B. subtilis*, ha sido estudiada por Chirakkal y col. (2002). SleB y CwIJ son proteínas con actividad transglicosilada (Boland y col., 1998) necesarias para la hidrólisis efectiva del córtex durante la germinación de esporos de *B. subtilis*. CwIJ se encuentra en la capa externa al córtex y se activa por el DPA o por quelatos de calcio (Paidhungat y col., 2001). En algunas especies de *Bacillus*, como *B. megaterium* y *B. cereus*, es necesaria la existencia de un ion específico que transporte la proteína para que la interacción sea efectiva (Chirakkal y col., 2002).

El **desarrollo** es un proceso de síntesis de macromoléculas que conduce a la formación de la nueva célula vegetativa (Levinson y Hyatt, 1966). La separación respecto de la fase anterior no está clara. Setlow (1983) considera que la germinación dura mientras los cambios en el espora se realicen a partir de fuentes de energía endógenas.

Los principales cambios morfológicos que tienen lugar durante el desarrollo son, por este orden, hinchamiento, iniciado ya en la germinación, que se produce como resultado de la absorción de agua, desprendimiento de las envolturas externas y del córtex, elongación del espora hinchado y formación del septo de la primera división celular (Russell, 1982).

El desarrollo es un proceso de diferenciación, distinto del proceso de crecimiento usual de las células vegetativas y del de germinación.

1.1.3. Mecanismos de termorresistencia.

Los esporos representan un estado de letargo de los microorganismos, durante el cual son más resistentes al calor, radiaciones, agentes químicos y otros agentes destructivos que en su forma de células vegetativas, de las cuales proceden y que les dan origen (Banwart, 1979). Por ejemplo, los esporos pueden llegar a ser 100.000 veces más resistentes al calor o 10 veces más resistentes a las radiaciones ionizantes y ultravioleta que las correspondientes células vegetativas (Gould, 1977). No todos los esporos son igual de resistentes para los mismos agentes letales y el hecho de ser muy resistente a un mismo agente no implica que también lo sea a los demás (Gould, 1984), por lo que es necesario caracterizar la resistencia a estos agentes antes de establecer cualquier tratamiento de conservación.

En 1953 Powell descubrió la existencia del DPA en los esporos (Hersom y Hutland, 1985). Al ser éste un compuesto que sólo existía en los esporos bacterianos, Powell afirmó que el DPA era el responsable de su alta resistencia al calor de manera que el protoplasto del espora era un sistema muy condensado y estabilizado por el complejo Ca-DPA, que lo protegía frente a la hidratación. Sin embargo, en 1972 Hanson y col. encontraron mutantes carentes de DPA que manifestaban una termorresistencia normal.

Por todo ello en la actualidad se considera que deben ser otros los compuestos y estructuras que determinen la termorresistencia. Tanto en los esporos mutantes, carentes de DPA, como en los nativos, se observa que el protoplasto se halla altamente deshidratado y muy mineralizado (Beaman y Gerhardt, 1986). Fernández y col. (1994b) indicaron que el DPA contribuye a mantener la termorresistencia alcanzada por otros medios.

Otras teorías sugerían que el córtex tiene actividad mecánica, con la cual logra la deshidratación del protoplasto. Estas teorías se basan en la observación de expansiones y contracciones de la capa de peptidoglicano en respuesta a cambios de pH o fuerzas iónicas y sugieren que durante la esporulación se podría desarrollar esta actividad

mecánica, de manera que se redujese el volumen del protoplasto del esporo forzando la salida de agua (Lewis y col., 1960; Gould y Dring, 1975).

En la actualidad se considera que el grado de deshidratación del protoplasto es uno de los factores más determinantes de la termorresistencia del esporo (Murrell, 1981; Beaman y Gerhardt, 1986). Aunque inicialmente se pensó que el córtex podría ser la estructura responsable de la consecución de este elevado grado de deshidratación (Warth, 1978a; Gould y Dring, 1975), actualmente se piensa que, durante la esporulación, el agua sale del protoplasto por fenómenos osmóticos antes de que se forme el córtex (Marquis y col., 1994). En tal caso la misión del córtex sería la de mantener al protoplasto deshidratado, más que la de causar su deshidratación (Marquis y col., 1994).

Los minerales presentes en el protoplasto consiguen, por precipitación, un alto grado de inmovilización de todas las moléculas y estructuras en él contenidas, haciéndolas menos sensibles al calor (Gerhardt y Marquis, 1989). Un aumento de la mineralización de los esporos debido a altos niveles de cationes divalentes y DPA aumenta la resistencia térmica (Paidhungat y col., 2000). Además, se ha probado en repetidas ocasiones, que la desmineralización de los esporos lleva invariablemente a un descenso de su termorresistencia y también afecta a su sistema de germinación (Alderton y Snell, 1963; Bender y Marquis, 1985; Palop y col., 1999a). La disminución de la termorresistencia cuando los esporos son calentados en medio ácido ha sido atribuida a una lixiviación de los minerales del esporo (Alderton y col., 1976). También se ha propuesto que el descenso de la termorresistencia en medio ácido se debe a una protonización de los grupos carboxílicos del córtex que permiten su colapso y consecuentemente que el esporo se rehidrate disminuyendo su termorresistencia (Gould y Dring, 1975).

Por otro lado los esporos esporulados a temperaturas más elevadas, suelen ser más termorresistentes que los que lo hacen a temperaturas más bajas (Beaman y Gerhardt, 1986; Palop y col., 1999b). En opinión de Beaman y Gerhardt (1986) la temperatura de esporulación y el grado de deshidratación estarían relacionados, de modo que a temperaturas de esporulación elevadas se alcanzarían grados de mineralización y deshidratación mayores.

Beaman y Gerhardt (1986) propusieron que los factores principales que determinan la termorresistencia de los esporos son la mineralización, la deshidratación del protoplasto y la temperatura de esporulación. Melly y col., (2002), también nombran los factores anteriores como los que más contribuyen a la resistencia térmica de los esporos y añaden a estos la presencia de altos niveles de pequeñas proteínas solubles en medio ácido (SASP).

El exosporio y las cubiertas no han sido asociados a la resistencia de los esporos al calor. La capa de proteínas que tiene a lo largo de la membrana externa tampoco producen el mayor efecto en su termoresistencia (Nicholson y col., 2000).

La termorresistencia de los esporos maduros se ha considerado tradicionalmente una propiedad estable, sin embargo, se ha observado que tras un "choque térmico subletal", se produce un aumento de la misma (Sedlak y col., 1993; Heredia y col., 1997). Se ha postulado que el choque térmico provocaría una expulsión de agua del protoplasto, como resultado, bien de una contracción de las envolturas externas (Prokop y Humphrey, 1972) o bien de una expansión del peptidoglicano del córtex (Beaman y col., 1988).

Al margen de los mecanismos que hacen más resistentes a los esporos bacterianos, la molécula clave responsable de la muerte celular irreversible es el ADN (Gould, 1989). Normalmente, el ADN de una célula procarionte sufre lesiones espontáneas debido a la depurinización, desaminación, alquilación y oxidación de los nucleótidos. En las células vegetativas estos daños son rápidamente reparados por efectivos sistemas enzimáticos. En cambio, los esporos bacterianos no presentan actividad enzimática pero han desarrollado distintas estrategias que evitan la acumulación de daños potencialmente letales en su ADN. Por un lado el bajo contenido de agua retarda o altera las reacciones químicas que afectan al ADN. Este menor contenido de agua disminuye la tasa de depurinización y la fotoquímica del ADN frente a la radiación UV respecto a las de una célula vegetativa. La radiación UV no genera dímeros de timina en el ADN de un espora sino un producto denominado SP (fotoproducto del espora) que es un compuesto similar a una timinil-timina. Por otro lado, los esporos bacterianos contienen una gran cantidad (10-20%) de proteínas SASP en el protoplasto (Setlow, 1988). Estas proteínas están asociadas con el ADN del espora y lo protegen de multitud

de daños (Setlow, 2000). Además el ADN alterado durante la latencia es reparado en los primeros momentos de la germinación.

Las SASP pueden ser de dos tipos: alfa/beta y gama. El tipo alfa/beta protege al esporo de factores como la radiación UV, formaldehídos, ácido nitroso y calor seco, y además contribuye significativamente en la resistencia al calor húmedo y al peróxido de hidrógeno (Setlow, 2000; Tennen y col., 2000). La proteína gamma no parece tener un papel tan importante y variado como las alfa/beta en la resistencia de los esporos (Setlow, 1988). Ambos tipos son sintetizados en paralelo durante la esporulación y se degradan a aminoácidos en el primer minuto de la germinación.

En estas circunstancias, la inactivación de los esporos por calor también puede producirse, sin destrucción de su ADN, por el daño térmico causado a diferentes estructuras. El calentamiento conduce a la alteración progresiva de la práctica totalidad de las estructuras del espora, hasta que la destrucción del ADN conduce a su muerte. El cese del tratamiento térmico antes de que se produzca la desnaturalización del ADN da lugar a la aparición de microorganismos que tienen modificada su capacidad para germinar y crecer. Aparentemente estos microorganismos están muertos porque permanecen en estado latente, pero en determinadas circunstancias pueden reparar las estructuras dañadas y restaurar el metabolismo normal. Estos microorganismos son clasificados como dañados (Adams, 1978). La reparación del daño causado a estas moléculas determina la recuperación celular y la viabilidad de los supervivientes al tratamiento térmico. Pero si las condiciones de recuperación no son adecuadas, los microorganismos permanecerán en estado latente y serán considerados inviables (Gould, 1989).

En la actualidad no se conoce con exactitud cuantas y cuales de estas estructuras son las responsables de la inactivación, aunque se sospecha que diversos sistemas enzimáticos y, en especial, el sistema de germinación (Foster y Johnstone, 1989) podrían estar implicados.

1.2. *Bacillus sporothermodurans*.

El género *Bacillus* esta compuesto por bacilos gram positivos capaces de formar esporos, estrictamente aerobios o anaerobios facultativos. El género *Bacillus* se

encuentra comúnmente en frutas y vegetales y los esporos son capaces de resistir las condiciones de esterilización, causando daños y alterando las conservas. No obstante su rango de pHs de crecimiento con un mínimo siempre por encima de 4, les impide desarrollarse en alimentos ácidos. Existen más de 60 especies muy extendidas en la naturaleza.

Muchos de estos bacilos producen enzimas hidrolíticas extracelulares que descomponen polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones. Numerosos bacilos producen antibióticos como la bacitracina, polimixina, tirocidina, etc. Crecen en general en medios sintéticos que contienen azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, etc., y presentan un amplio rango de crecimiento que van desde los 4°C hasta 75°C (Prescott y col., 2002).

Tradicionalmente la especie más termorresistente del género *Bacillus* ha sido *B. stearothermophilus*, reclasificada en la actualidad dentro del género *Geobacillus* (Nazina y col., 2001). No obstante varios autores (Foschino y col. 1990; Kessler y col., 1994; Hammer y col. 1995) publicaron la existencia de bacterias mesófilas formadoras de esporos termorresistentes causantes de la no esterilidad de la leche UHT. Investigaciones moleculares sobre el rRNA de la fracción 16S de los ribosomas de estas bacterias mostraron que una nueva especie de *Bacillus* estaba implicada (Klijn y col., 1994) la cual, fue aislada por primera vez en 1990 en leche esterilizada por UHT en Alemania y descrita por Petterson y col., (1996) como *Bacillus sporothermodurans*.

Su supervivencia a los tratamientos UHT es debido a su inusual cinética de termodestrucción, por la cual es capaz de sobrevivir a un tratamiento de 130°C durante 4 segundos (Huemer y col., 1998), germinando durante el almacenamiento de productos tratados por UHT, causando inestabilidad debido a su actividad proteolítica y por tanto reduciendo su vida útil. Los daños que este microorganismo provoca en la leche se manifiestan en cambios de color, sabor de la leche y desestabilización de la caseína (Klijn y col., 1997). Un aumento de la temperatura y el tiempo de tratamiento para inactivar *Bacillus sporothermodurans* afecta a las características organolépticas y nutricionales de la leche (Claeys y col., 2001). *Bacillus sporothermodurans* también fue aislado en sopa con curry india la cual había recibido un tratamiento térmico con un F_0 mínimo de 8,9 minutos (Oomes y col. 2007).

Su elevada termorresistencia lo hace una de las especies más termorresistentes del genero *Bacillus* por lo que está siendo utilizada como microorganismo de referencia para la evaluación biológica de tratamientos térmicos (Periago, y col., 2004). A pesar de ello existen pocos datos acerca de su termorresistencia, posiblemente debido a su relativamente reciente descubrimiento.

Van Zuijlen y col. (2009) realizaron un estudio sobre como afectan las condiciones de esporulación a la termorresistencia de *Bacillus sporothermodurans* IC4, obteniendo los valores de termorresistencia mas altos a 121°C, 4,1 y 4,34 min., respectivamente, en el agar de esporulación Campden (Campden sporulation agar, CSA) y en el agar nutritivo fortificado (Fortified Nutrient Agar; FNA). Los valores de termorresistencia obtenidos en agar con extracto de sopa de champiñones (Mushroom soap agar; MSA; $D_{121}=2,87$ min.) y en agar nutritivo (D_{121} 2,7 min.) fueron netamente inferiores. En su estudio concluyeron que *Bacillus sportothermodurans* es un microorganismo adecuado para evaluar y optimizar procesos de esterilización de alimentos porque sus esporos tienen una termorresistencia constante y adecuada, la cual puede llegar a ser máxima utilizando diferentes medios de esporulación. Por todo ello, concluye que estos esporos son más adecuados para la validación de procesos, que por ejemplo, los esporos de *Geobacillus stearothermophilus* utilizados normalmente para este fin.

Huemer y col., 1998, en su estudio sobre la termorresistencia de *Bacillus sportothermodurans* J16, B93-20-12 y MB921, y su comparación con la termorresistencia de *Geobacillus stearothermophilus* obtuvieron valores D_{140} de 3,4 a 7,9 s en el rango de temperatura de 130 – 145°C, y un valor z de 13,1-14,2 °C, para *Bacillus sportothermodurans* frente al valor $D_{140}=0,9s$ obtenido para *Geobacillus stearothermophilus*, lo que indica una excepcional termorresistencia de este microorganismo bajo condiciones UHT. Sin embargo estos autores también obtuvieron valores de termorresistencia de *Bacillus sporothermodurans* similares a los de *Bacillus stearothermophilus* en un rango de temperatura de 110 a 120°C, incluso cercanos a los de *Bacillus subtilis*. No obstante, a estas temperaturas, los valores D obtenidos fueron más bajos que los obtenidos por Van Zuijlen y col. (2009) en su estudio.

Los estudios realizados por Periago y col. (2004), mostraron que las curvas de supervivencia isotérmicas de *Bacillus sporothermodurans* en diferentes sopas son claramente no lineales. Por lo tanto ninguno de los métodos convencionales basados en

la linealidad del logaritmo de supervivientes frente al tiempo pueden ser utilizados para predecir su inactivación. Van Zuijlen y col. 2009, también encontraron una frecuente presencia de hombros en las curvas de supervivencia de estos esporos obtenidas tanto por tubos capilares como en el termorresistómetro, lo que corrobora estudios previos y confirma que esto es un fenómeno común en esporos de alta termorresistencia (Cook y Brown, 1965; David y Merson, 1990). Además publicaron que los modelos de Weibull y Geeraerd describieron mejor la inactivación de los esporos de *Bacillus sporothermodurans* que los modelos logarítmicos lineales convencionales, si bien después del hombro inicial de las curvas, las siguientes reducciones logarítmicas siguieran una cinética de primer orden y, por tanto puede ser obtenidos los valores D y z validos para los cálculos relativos al tratamiento térmico. No obstante, Huemer y col. (1998), obtuvieron líneas rectas para las gráficas de supervivencia de *Bacillus sporothermodurans* J16 con coeficientes de correlación de 0,99.

1.3. *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Los microorganismos del género *Alicyclobacillus* son de especial interés para la industria alimentaria ya que son capaces de germinar, crecer y causar daño en productos con pH ácido, previamente considerados fuera del rango de desarrollo de formas esporuladas. No crecen en condiciones de anaerobiosis, pero sí lo hace ante concentraciones de NaCl de hasta un 10% (Walls y Chuyate, 1998).

Los esporos acidófilos fueron aislados por primera vez en 1967 en Japón, en condiciones de altas temperaturas ambientales (Uchino y Doi, 1967). El rango óptimo de pH para estos esporos estaba entre 2,3 y 5 y el de temperatura entre 45°C y 71°C. Basándose en las características morfológicas estos organismos fueron clasificados inicialmente como *Bacillus coagulans*. En 1971, se volvieron a aislar en Estados Unidos bajo las mismas condiciones ambientales, clasificándolos esta vez como una nueva especie dentro del género *Bacillus*, en concreto la especie *B. acidocaldarius* (Darland y Brock, 1971). En 1981, los esporos acidófilos fueron aislados del suelo, indicando esto la amplia distribución de estos organismos (Hippchen y col., 1981). Estos esporos mostraron diferencias con *Bacillus acidocaldarius* en cuanto a rangos de temperatura de desarrollo, caracterización bioquímica y composición del ADN. El rango óptimo de pH

era de 2 a 5 y el de temperatura de 22 a 62°C. Las células formaban esporos terminales y subterminales. Deinhard y col. (1987) realizaron una nueva clasificación y propusieron un nuevo nombre: *Bacillus acidoterrestris*.

En 1992, la creación de un nuevo género, *Alicyclobacillus* (Wisotzkey y col, 1992) fue propuesta para comprender las especies *A. acidocaldarius*, *A. acidoterrestris* y *A. cycloheptanicus*. Los análisis comparativos de la secuencia de su ADN mostraron que las tres eran suficientemente distintas de otras especies de *Bacillus*, como para considerarlas en un género aparte (Deinhard y col., 1987). El género *Alicyclobacillus* es único en la composición de sus ácidos grasos, conteniendo ácidos grasos alicíclicos como componente mayoritario de su membrana celular. Estos ácidos permiten que puedan sobrevivir a bajos pH y altas temperaturas (Krischke y Poralla, 1990).

Dentro del género *Alicyclobacillus*, *A. acidoterrestris* es una especie mesófila, si bien puede crecer a temperaturas relativamente elevadas. Dada su capacidad para crecer a valores de pH por debajo de 3,8 y por su capacidad para superar tratamientos térmicos moderados, *A. acidoterrestris* ha causado una gran preocupación en la industria del zumo de fruta.

Es una bacteria móvil, de forma alargada con esporos centrales, terminales o subterminales. Las colonias son redondas, de color blanco, opacas, de 3 a 5 mm de diámetro tras 5 días de crecimiento a pH 3,7 y 35°C (Walls y Chuyate, 2000). Crece a temperaturas de 26 a 60°C (temperatura óptima de crecimiento 42 a 53°C) y pH de 2,0 a 6,0 con un rango óptimo de pH de 3,5 a 5,0 (Smit y col., 2011). Otras características culturales y bioquímicas son las que se muestran en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. Características culturales y bioquímicas de *Alicyclobacillus acidoterrestris*. (Fuente: Walls y Chuyate, 1998).

Tinción de Gram	+
<i>Movilidad</i>	+
<i>Catalasa</i>	+
<i>Crecimiento anaeróbico</i>	-
<i>Voges-Proskauer</i>	-
<i>D-glucosa</i>	+

<i>L-arabinosa</i>	+
<i>D-xilosa</i>	+
<i>D-manitol</i>	+
<i>Utilización de citrato</i>	+
<i>Propionato</i>	-
<i>Hidrólisis del almidón</i>	-
<i>Deaminación de fenilalanina</i>	-
<i>Reducción de nitrato</i>	-
<i>Formación de indol</i>	-
<i>Crecimiento con 0.001% Lisozima presente</i>	+
<i>Crecimiento con 0.025 presente azida</i>	+
<i>Crecimiento en NaCl (0%,5%,7% y 10%)</i>	+

En cuanto a su distribución, McIntyre y col. (1995) aislaron *Alicyclobacillus acidoterrestris* del agua usada como ingrediente en las bebidas refrescantes de frutas que presentaban daños. También ha sido aislado del suelo y de la superficie de las naranjas (Brown, 1995).

La primera alteración de un alimento registrada y causada por el entonces denominado *Bacillus acidoterrestris* tuvo lugar en Alemania en 1982, en zumo de manzana envasado asépticamente y con un pH de 3,15. Los daños se manifestaron con un mal sabor y un ligero sedimento (Cerny y col., 1984). A partir de este momento se han detectado muchos casos de alteración sobre zumos de frutas con las mismas características en distintos países y casi siempre asociados a épocas de altas temperaturas (Wisotzkey y col., 1992; Brown, 1995; Splittstoesser y col., 1998; Orr y col., 2000).

Los daños que producen, además, son difíciles de detectar ya que el producto presenta una apariencia normal o con un ligero sedimento, siendo el problema más importante el olor que se desprende, con un aroma medicinal o fenólico (Walls y

Chuyate, 1998). El compuesto responsable del mal olor ha sido identificado como guaiacol, el cual, de acuerdo con Pettipher y col. (1997), puede ser detectado por métodos sensoriales en zumo de fruta cuando existe en una concentración de 2 ppb. El guaiacol es detectado en zumo de naranja y manzana cuando existe una concentración de 10^5 células de *A. acidoterrestris* por mililitro. Además no se observa producción de gas y tampoco cambios sustanciales en el pH una vez el microorganismo ha crecido (Walls y Chuyate, 1998), aunque si un sabor de tipo agrio (Komitopoulou y col., 1999; Orr y col., 2000).

Los estudios realizados sobre la resistencia al calor de *A. acidoterrestris* indican que los esporos de este microorganismo pueden sobrevivir a los tratamientos típicos de pasteurización que se aplican en alimentos ácidos. Esto, unido a su capacidad de germinar y crecer en medios ácidos, les permite alterar este tipo de alimentos, que se encontraban hasta ahora exentos de alteración por microorganismos esporulados. Los tratamientos térmicos que aplica la industria alimentaria a los alimentos ácidos consisten en mantener temperaturas de entre 86 y 96°C durante tiempos de dos minutos. Entre otros trabajos, Cerny y col. (1984) y Splittstoesser y col. (1998) calcularon que los valores D_{90} eran de 15 y de 16 a 23 minutos, respectivamente. Splittstoesser y col. (1998) también calcularon el valor $D_{95\text{ C}}$ de 2,4 a 2,8 minutos. Estos valores dan una idea de la baja letalidad de los tratamientos aplicados frente a los esporos de este microorganismo.

De entre los distintos factores que afectan la termorresistencia, el medio de esporulación no parece determinar la termorresistencia de los esporos de *A. acidoterrestris*. Suspensiones esporuladas en agar de patata y dextosa (PDA) y agar suero de naranja (OSA) mostraron valores similares de termorresistencia en agua destilada, con valores D_{115} de 0,16 y 0,11 minutos respectivamente y valores z de 7,6 y 7,3°C (Conesa, 2001).

La termorresistencia de los esporos tampoco se ve afectada por la presencia de diferentes cationes divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+}) en el medio de esporulación, ni por la mineralización y desmineralización de los esporos (Yamakazi y col., 1997b).

Según los estudios realizados por Pontius y col. (1998) y Silva y col (1999), el pH del medio de calentamiento ejercía cierto efecto sobre la termorresistencia de *A. acidoterrestris*. Los datos mostraron una tendencia general a que a valores de pH del medio de calentamiento más bajos, mayor era la reducción de los valores D. Sin embargo, estos datos eran solo significativos a bajas temperaturas. Sin embargo, otros autores como Murakami y col. (1998) o Yamakazi y col. (1997a) no han encontrado ninguna influencia del pH del medio (rangos de 2,5 a 6,9) ni siquiera a bajas temperaturas. También se ha estudiado la influencia del tipo de ácido (málico, cítrico y tártrico), llegando a la conclusión de que no tiene un efecto significativo en la termorresistencia de *A. acidoterrestris* (Pontius y col., 1998).

En cuanto a la composición del medio, según Splittstoesser y col. (1998) y Silva y col. (1999), aumentando la concentración de azúcares observaron que aumenta la resistencia al calor de *A. acidoterrestris*, lo que demuestra la dificultad para destruir a este microorganismo en zumos concentrados. El dióxido de sulfuro y el ácido sórbico, que se suelen usar como conservantes en zumos y que han mostrado reducir la termorresistencia de algunos esporos, sin embargo, no han resultado efectivos en *A. acidoterrestris* en concentraciones de hasta 100 mg/L (Splittstoesser y col., 1998).

Con respecto a sustancias antimicrobianas, la presencia de nisina durante el calentamiento (50 UI) produjo una reducción en los valores D de *A. acidoterrestris* de hasta el 50% en zumo de manzana a pH 3,51 (Komitopoulou y col., 1999).

Por otra parte, no se ha observado la presencia de hombros en las curvas de supervivencia (Silva y col., 1999).

1.4. Termorresistencia microbiana.

1.4.1. Cinética de destrucción microbiana por el calor.

Tradicionalmente el calor se ha utilizado para inactivar células vegetativas en los procesos de pasteurización y para inactivar tanto células vegetativas como esporos en los procesos de esterilización. Esto constituye la base de la industria conservera. Es por esta razón que existe un gran interés sobre el espora bacteriano y su cinética de inactivación por calor.

Las temperaturas ligeramente superiores a la máxima de multiplicación bacteriana causan la muerte de las células vegetativas pero no de los esporos bacterianos, que son mucho más termorresistentes. Debido a esta característica, la inactivación de los esporos es una de las metas principales de la conservación por calor de los alimentos. Existen dos principios o leyes que, tradicionalmente se ha considerado que rigen la destrucción de los microorganismos, incluidos los esporos.

1.4.1.1. Primera ley o ley de supervivencia.

Al someter a una población bacteriana a la acción del calor a una temperatura constante, la tasa de supervivientes es una función exponencial del tiempo de calentamiento. Representando el logaritmo de microorganismos supervivientes frente a los correspondientes tiempos de tratamiento, a una temperatura constante, se obtiene una gráfica, a la que se denomina de supervivencia (Figura 1.3).

Figura 1.3. Gráfica de supervivencia.

Muchos investigadores han intentado explicar el orden logarítmico de la curva de supervivencia. Una de las teorías más aceptadas fue la dada por Rahn (1929, 1945a y b), que achacaba la pérdida de capacidad reproductiva a la desnaturalización de un gen esencial en la reproducción. Si se daña un gen u otra estructura esencial, se perdería la capacidad reproductiva, lo que no ocurriría si se daña cualquier otro tipo de molécula.

Marquis y col. (1994), sugirieron el daño en las proteínas y enzimas como la causa de la inactivación de los esporos y, de hecho, Palop y col. (1998) observaron que la destrucción de los esporos de *B. megaterium* por calor, y también por hidroperóxidos coincidía con la inactivación de determinados enzimas citoplasmáticos. Sin embargo, en muchos esporos no está claro que enzimas o proteínas son críticas para la muerte, y esto es probablemente debido a que las proteínas funcionales que intervienen en la germinación y desarrollo son dañadas al mismo tiempo. Warth (1980) y Setlow (2000) publicaron que la muerte de los esporos por calor no es debida al daño del DNA, pero si a la rotura de la membrana interna permeable junto a la inactivación de las enzimas del protoplasto. Tabit y Buys (2010) estudiaron los daños estructurales que producen los tratamientos térmicos, concluyendo que los primeros signos visibles coinciden con la liberación de su DPA al medio. Sin embargo, el mecanismo exacto y los componentes dañados en el tratamiento térmico están aun por determinar (Tabit y Buys, 2010). En cualquier caso, está claro que con esta consideración, la muerte bacteriana se puede expresar de la misma forma que se hace con las reacciones químicas de primer orden, donde están implicadas una o dos moléculas (ec. 1.1).

$$N_t = N_0 \times e^{-kt} \quad (\text{Ec. 1.1})$$

Siendo

N_t =número de microorganismos supervivientes tras t minutos de tratamiento.

N_0 = número inicial de microorganismos.

k = constante de inactivación

t= tiempo de tratamiento a una temperatura constante.

En muchas ocasiones en lugar de hablarse de la constante de inactivación k, se habla del tiempo de reducción decimal D_T , que se define como el tiempo de tratamiento necesario para reducir una población bacteriana a la décima parte, a una temperatura dada, (Katzin y col., 1943). El valor D_T viene representado en la figura 1.3 por la inversa negativa de la pendiente de la curva de supervivencia y es el tiempo necesario para que la recta atravesase un ciclo logarítmico, o lo que es lo mismo (ec. 1.2):

$$D_T = \frac{t_1 - t_2}{\log n_{t_2} - \log n_{t_1}} \quad (\text{Ec. 1.2})$$

Siendo:

n_{t_1} = Número de individuos supervivientes al tiempo t_1

n_{t_2} = Número de individuos supervivientes al tiempo t_2

D_T es el parámetro empleado para comparar la termorresistencia de distintas cepas bacterianas, ya sean de la misma o distinta especie, a la misma temperatura, o bien de una misma cepa a distintas temperaturas, así como para evaluar el efecto del entorno (concentración y composición del sustrato, pH, temperatura de incubación, sistema de calentamiento, etc.) sobre la resistencia térmica aparente de las mismas. La relación entre los valores D_T y k es la siguiente (ec. 1.3):

$$D_T = \frac{\ln 10}{k} \quad (\text{Ec.1.3})$$

1.4.1.2. Curvas de supervivencia no logarítmicas.

Rahn (1945a) decía textualmente: “Desde las primeras medidas cuantitativas realizadas por Chick (1910) hasta las extensas investigaciones de Watkins y Winslow (1932), la muerte de las células vegetativas, así como de los esporos, es una función logarítmica”. Sin embargo, desde que Rahn afirmara esto hasta hoy, se han descrito muchos casos en los que las curvas no cumplen con la linealidad, aunque en el diseño de las operaciones de esterilización se sigue asumiendo el carácter logarítmico, debido quizás a la sencillez de la expresión matemática. Esta expresión se complicaría al considerar el carácter no logarítmico, pero la desviación del comportamiento logarítmico es un hecho evidente que ha sido observado por muchos autores: Licciardello y Nikerson, 1963; Alderton y col., 1964; Yokoya y York, 1965; Han y col., 1971; Stumbo, 1973; Han, 1975; Han y col., 1976; Pflug y Smith, 1977; Bean y col., 1979a; King y col., 1979; Komemushi, 1983; Peleg y Cole, 1998; Mafart y col., 2002; Geeraerd y col., 2005, entre otros.

La figura 1.4 muestra distintas formas que pueden representar las gráficas de supervivencia.

Figura 1.4. Distintas formas que pueden presentar las curvas de supervivencia a temperatura constante, a: Hombro de activación, b: Convexa, c: De orden logarítmico y d: Curva con cola. Fuente: Casp y Abril, (2003).

En muchos casos, el logaritmo de los supervivientes con respecto al tiempo aparece como una línea recta o aproximadamente recta durante las 4-5 primeras reducciones decimales. Esta situación corresponde con la curva *c* de la figura 1.4. Por tanto, se ha concluido que, en estos casos, la inactivación microbiana es un proceso que sigue una cinética de primer orden (Stumbo, 1973; Texeira, 1992; Jay, 1996; Holdsworth, 1997). En los casos en que la relación del logaritmo de los supervivientes con respecto al tiempo es claramente no lineal se ha sugerido que la población sería una mezcla de subpoblaciones con diferente sensibilidad al calor (Stumbo, 1973, Le Jean y col., 1994), o que la inactivación sigue una cinética de diferente orden o tipo, por lo cual han sido propuestos diferentes modelos matemáticos (Shull y col., 1963; Cole y col., 1993; Hills y Mackey, 1995; Linton y col., 1995; Peleg y Cole, 1998). Las curvas de supervivencia no lineales tienen diferentes formas. Las más comúnmente encontradas son curvas con una concavidad ascendente o descendente (figura 1.4), y curvas sigmoideas con concavidades descendentes y ascendentes alternantes o viceversa.

La curva *a* de la figura 1.4 es típica de los esporos que requieren activación, e indica que durante los primeros minutos muchos esporos estaban en estado de latencia dentro de la población original. En consecuencia no podían germinar y reproducirse en los

medios ordinarios de crecimiento, y no se contabilizan como población original, pero tras la activación por calor germinan, aumentando su número. Pasado un cierto tiempo de calentamiento, todos los esporos están activados (momento en que la curva desciende), a partir de entonces, la curva es estrictamente logarítmica.

Una curva similar puede tener lugar por combinación de la activación y muerte de los esporos. Cuando estos dos fenómenos se producen a la misma velocidad se obtiene la figura 1.5, en la que se observa variación en el recuento de esporos viables al principio del calentamiento, mientras quedan esporos por activar. Williams y col. (1957) y Pflug y Smith (1977) obtuvieron curvas convexas para esporos de *B. stearothermophilus*, mientras que Shull y Ernst (1962) encontraron un hombro de activación para la misma especie. Este comportamiento también se ha explicado por la existencia de varias moléculas o localizaciones críticas en los microorganismos, en lugar de una sola como propuso Rahn (1945a). Moats (1971) y Moats y col. (1971) argumentaban que la muerte de los esporos no puede seguir una cinética de primer orden, puesto que esto implica la inactivación de una única célula y no puede explicar daños subletales. Por lo tanto, asumían que la muerte térmica resulta de la inactivación de varias zonas críticas dentro del espora y lanzaron la teoría del ataque múltiple (multiple hit) y un modelo teórico, en función del número de puntos críticos por espora y proporción de los mismos que deben inactivarse para causar la muerte en las condiciones experimentales usadas. Las curvas teóricas calculadas usando este modelo fueron similares a las experimentales, para células vegetativas, lo cual apoya esta teoría (Cole y col., 1993, Mafart y col., 2002). El carácter no logarítmico de las gráficas de supervivencia ha sido comprobado por otros investigadores en un amplio margen de temperaturas.

Figura 1.5. Curva de supervivencia cuando la activación de esporos es igual a la muerte de las mismas en los primeros momentos de calentamiento.

Ball y Olson (1957) intentaron explicar estos comportamientos por los períodos de inercia (tiempo que tarda el medio de suspensión en alcanzar la temperatura prevista). Otros investigadores midieron estos tiempos de inercia (Stumbo, 1948; Pflug y Esselen, 1953a; Stern y Proctor, 1954) y llevaron a Humphrey y Nikerson (1961) a manifestar que la naturaleza no logarítmica de la curva de supervivencia era más una característica intrínseca de los microorganismos que una consecuencia de aplicar técnicas diferentes. Hoy se sabe que la latencia de los esporos no es la única causa del comportamiento no logarítmico, ya que éste persiste en suspensiones de esporos totalmente activados.

También se obtienen curvas similares a la de la figura 1.5 cuando se trabaja con esporos que se encuentran agregados en grupos de 2 o más células y permanecen así al hacer los recuentos y, en consecuencia, cada colonia se origina por más de una célula. No habrá disminución en el número de colonias hasta que en cada grupo de células quede únicamente un espora viable, momento en el cual la curva comienza a inclinarse. En este caso la desviación de la linealidad se debe más bien a una técnica de muestreo inadecuada que a cualquier peculiaridad en el orden de muerte (Stumbo, 1973).

Cuando un cultivo contiene dos o más especies o cepas de diferente resistencia al calor, la curva de supervivencia que se obtiene es del tipo d de la figura 1.4. La primera parte de la curva describe la muerte de la mayoría de los esporos de menor termorresistencia y la segunda parte describe la muerte de los más resistentes.

Un caso interesante de no-linealidad en las curvas de supervivencia es la presencia de colas. Moats (1971) y Moats y col. (1971) atribuyeron dichas colas a la variación de la termorresistencia dentro de la población, pero creían que se debe más a diferencias fisiológicas que genéticas. Por el contrario, Bean y col. (1979a) atribuyen estas colas a artefactos del método cuando se emplea la técnica de los tubos capilares.

Humphrey y Nikerson (1961) concluyeron que las curvas de supervivencia de los esporos son no logarítmicas y postularon que la muerte de los esporos se debe al daño que sufre un iniciador de la germinación, siendo éste termolábil e inducible por el calor, lo que explicaría la inactivación de la germinación por choque térmico.

La relativa frecuencia con que se observan estas desviaciones ha llevado a diferentes autores a realizar intentos para interpretar matemáticamente las curvas no lineales (Shull y col., 1963; Moats y col., 1971; Han y col., 1976; Rodríguez y col., 1988), así como a

desarrollar modelos matemáticos para transformar curvas lineales en rectas. Perkin y col. (1977) consiguieron transformar en rectas las curvas cóncavas corrigiendo los tiempos de equilibrado a la temperatura de tratamiento (coming up time) de la suspensión de esporos, mientras que Hayakawa y col. (1981) desarrollaron una relación empírica para linealizar las curvas de supervivencia no logarítmicas mediante un proceso iterativo que maximizaba el valor del coeficiente de regresión de los datos experimentales. Los autores aplicaron con éxito esta empírica a varios grupos de datos. Por otra parte, Patino y Helil (1985) presentaron un método estadístico similar al de Hayakawa para calcular los parámetros de termorresistencia de las curvas de supervivencia no logarítmicas.

Más recientemente Geeraerd y col. (2000) han revisado los modelos desarrollados para describir las cinéticas no lineales y, en vista de las limitaciones que han encontrado en todos ellos, han desarrollado un modelo propio que, basado en el concepto del valor D de la clásica cinética logarítmica, permite describir gráficas de supervivencia no lineales de formas bien distintas, incluyendo tanto la presencia de hombro como de colas. La ecuación 1.4 corresponde a este modelo.

$$\text{Log}_{10} N = \text{Log}_{10} \left((N_0 - N_{res}) (e^{-k_{max} t}) \left(\frac{e^{k_{max} SI}}{1 + (e^{k_{max} SI} - 1) (e^{-k_{max} t})} \right) + N_{res} \right) \quad (\text{Ec. 1.4})$$

Donde N representa el número de supervivientes a tiempo t , N_0 el número inicial de microorganismos, N_{res} el número residual de supervivientes al final del tratamiento, k_{max} la constante de inactivación y SI la duración del hombro.

Estos mismos autores han creado un software al que denominan GInaFIT que permite ajustar las curvas de supervivencia con su modelo, así como otros modelos matemáticos que son ampliamente usados en la actualidad (Geeraerd y col., 2005).

Los modelos descritos hasta ahora tienen en común que asumen la cinética logarítmica de destrucción por el calor y, a partir de ella, plantean distintas hipótesis para tratar de explicar las desviaciones de la linealidad. Otro grupo de teorías explica estos comportamientos en base a un planteamiento netamente diferente. Asume la existencia, en la población de microorganismos que está siendo sometida al tratamiento térmico, de una distribución de frecuencias en cuanto a su resistencia al calor, y siendo la forma de la gráfica de supervivencia la consecuencia de dicha distribución. De entre

todos los modelos probabilísticos utilizados, posiblemente el más empleado es el que se basa en la distribución de Weibull, y que se describe ampliamente en el siguiente apartado.

1.4.1.3. La distribución de Weibull.

La distribución de Weibull es una distribución de probabilidades que se diseñó para describir el comportamiento de sistemas o hechos que tienen cierto grado de variabilidad. En 1939, Weibull desarrolló esta distribución para analizar estadísticamente la resistencia de distintos materiales (Cunha y col., 1998). Un modelo simple derivado de la distribución de Weibull es capaz de describir cinéticas de destrucción no logarítmicas en microorganismos. Se trata de la función acumulativa de esta distribución.

En 1998, Peleg y Cole, introdujeron la función de Weibull en el campo de la Tecnología de Alimentos. Si se consideran las gráficas de supervivencia como gráficas acumulativas de una distribución temporal de sucesos letales, cada microorganismo muere o es inactivado a un tiempo específico, de tal forma que la gráfica de supervivencia es un reflejo de la distribución de resistencias de las células y la forma que ésta tenga dependerá de la características de la distribución de resistencias dentro de la población microbiana.

La función de densidad de probabilidad de la distribución de Weibull viene definida como (ecuación 1.5).

$$f(t) = \frac{n}{b} \left(\frac{t}{b} \right)^{n-1} e^{-\left(\frac{t}{b} \right)^n} \quad (\text{Ec. 1.5})$$

La correspondiente función acumulativa de la distribución será (1.6).

$$F(t) = 1 - e^{-\left(\frac{t}{b}\right)^n} \quad (\text{Ec. 1.6})$$

Donde b es el factor de escala y n es el factor de forma. El parámetro de escala está relacionado con la intensidad del tratamiento y representa el tiempo necesario para inactivar el primer ciclo logarítmico de la población microbiana, y el parámetro de forma describe el comportamiento de la población, de tal forma que si $n > 1$ la gráfica es cóncava (fenómeno de hombro), si $n < 1$ la gráfica es convexa y si $n = 1$ la gráfica de supervivencia sería lineal (Figura 1.6).

Se han propuesto diferentes formas de la función acumulativa del modelo de Weibull para describir las curvas de supervivencia no lineales, entre las que destacan las desarrolladas por Peleg y Cole (1998), Van Boekel (2002) y Mafart y col. (2002).

Figura 1.6. Gráficas de la distribución de Weibull. (a) Gráfica de densidad de probabilidad. (b) Gráficas de supervivencia de Weibull.

Peleg y Cole (1998) definieron la siguiente ecuación (ecuación 1.7).

$$\text{Log}_{10} S(t) = -bt^n \quad (\text{Ec. 1.7})$$

Donde $S(t)$ es la fracción de supervivientes tras un tiempo t de tratamiento, b es el factor de escala y n el factor de forma.

La función propuesta por van Boekel (2002) es.

$$\text{Log}_{10}S(t) = -\left[\frac{1}{2,303}\right]\left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta} \quad (\text{Ec. 1.8})$$

Donde α es el factor de escala y β es el factor de forma.

Mafart y col. (2002) modificaron la ecuación del modelo y propusieron la siguiente ecuación (ecuación 1.9).

$$\text{Log}_{10}S(t) = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (\text{Ec. 1.9})$$

Donde δ es el parámetro de escala y p es el parámetro de forma.

Fernández y col. (1999b) demostraron que la distribución de frecuencias de Weibull describía adecuadamente curvas de supervivencia en esporos de *B. cereus* que presentaban hombros de activación. Por otro lado, se ha observado que esta distribución permitió también modelizar cinéticas de inactivación bifásicas con presencia de colas, ampliamente descritas en la aplicación de antimicrobianos naturales o nuevas tecnologías para la conservación de alimentos (Fernández y col., 2002).

También se ha aplicado con éxito para describir la inactivación de esporos de *B. subtilis* mediante altas presiones y la inactivación de varias especies de *Bacillus* y *Clostridium* mediante calor (Peleg y Cole, 1998; Fernández y col., 1999a) o de células vegetativas por pulsos eléctricos (Gomez, 2006).

1.4.1.4. Segunda ley o ley de la destrucción térmica.

También los valores D_T siguen un comportamiento logarítmico con la temperatura de tratamiento. Al representar el logaritmo de los valores D_T frente a las correspondientes temperaturas de tratamiento se obtiene una nueva gráfica, que se denomina de termodestrucción (Figura 1.4). Sobre esta gráfica se define el valor z , como el número de grados que hay que aumentar la temperatura para que el D_T se reduzca un ciclo logarítmico, es decir, cuando se eleva la temperatura de tratamiento en z grados, el tiempo requerido para conseguir la misma destrucción térmica es 10 veces

menor. Se calcula como la inversa negativa de la pendiente de la curva de destrucción térmica (figura 1.7).

Figura 1.7. Curva de destrucción térmica (TDT) de un microorganismo.

Matemáticamente se expresa como (ec 1.10).

$$\frac{\log(D_2) - \log(D_1)}{T_1 - T_2} = \frac{1}{z} \quad (\text{ec 1.10})$$

1.4.2. Métodos para determinar la termorresistencia microbiana.

Los estudios de resistencia microbiana al calor son necesarios para garantizar la inocuidad en alimentos procesados. El conocimiento que proporcionan estos estudios sobre las cinéticas y mecanismos de destrucción han permitido el desarrollo de procesos seguros, que reducen el riesgo de alteración y permiten controlar a los microorganismos alterantes y patógenos.

Son muchos los métodos para determinar la resistencia al calor que se han utilizado (Brown y Ayres, 1982; Stumbo, 1973), cada uno de ellos con sus ventajas y desventajas. Palop y col. (2012) han publicado recientemente una revisión de todos estos métodos. Los métodos disponibles hoy día se pueden agrupar en: métodos

indirectos, métodos directos, métodos de mezcla y métodos de partícula (Brown y Ayres, 1982).

1.4.2.1. Sistemas de calentamiento indirecto.

En los métodos indirectos, la suspensión de microorganismos se sitúa en el interior de tubos de cristal, que son calentados a la temperatura de tratamiento en un baño. El principal inconveniente de estos métodos es el retraso que se produce en alcanzar la temperatura de tratamiento y el tiempo necesario para enfriar por debajo de temperaturas letales una vez finalizado el mismo. Durante el tiempo que tarda la muestra en alcanzar la temperatura prevista, está expuesta a temperaturas que van ejerciendo una acción letal, y por lo tanto algunos microorganismos pueden morir antes de alcanzar la temperatura de proceso.

El método de los **tubos T.D.T abiertos** consiste en utilizar tubos de 13 x 100 mm tapados con algodón, que se calientan con vapor y se enfrían, todo ello bajo presión. Son esos mismos tubos los que sirven para recuperar los microorganismos al añadirles el medio de cultivo, evitándose la posibilidad de perderlos. Aunque los tiempos requeridos para alcanzar las temperaturas de calentamiento y enfriamiento son altos, lo que limita su uso a altas temperaturas, se han empleado para estudios por encima de 100°C (Schmidt y col., 1955).

Una variante de esta técnica consiste en el empleo de **tubos de aluminio** cerrados con roscas de nylon (Odlaug y Pflug, 1977) con capacidad para 1 mL de muestra. Sin embargo, y a pesar del alto coeficiente de transmisión de calor del aluminio, persiste el problema de un apreciable período de inercia, lo cual limita su empleo a altas temperaturas.

El uso de pequeños **capilares** de cristal ha reducido el tiempo de espera al rango de segundos (Stern y Proctor, 1954). El manejo del contenido de los capilares es una tarea tediosa.

Aunque es un método económico y disponible en cualquier laboratorio, Mallidis y Scholefield (1985) combinaron el método de los tubos capilares con un sistema de calentamiento constituido por un bloque de aluminio con orificios, donde se introducían dichos capilares. El bloque se calienta por un conjunto de resistencias eléctricas y la

temperatura se controla con un termopar empotrado en el bloque. Los orificios se rellenan con glicerina para facilitar la transferencia de calor a los capilares. Con este sistema se consigue una gran uniformidad de temperatura entre todos los orificios, siendo el máximo de variación entre ellos de 0,1°C, y se reducen los períodos de inercia.

Otro sistema de calentamiento indirecto es el de las **latas TDT**, en el que se emplean pequeñas latas, de dimensiones 6,35 cm de diámetro por 0,95 cm de altura, que contienen entre 13 y 16 mL de medio inoculado. Las latas cerradas se someten a tratamiento térmico en pequeños autoclaves conectados a un gran tanque de vapor y a la red de agua para enfriarlas rápidamente en los mismos autoclaves. Las temperaturas a las que se ha empleado están comprendidas entre 100 y 140°C. Las latas se pueden incubar directamente o abrir y subcultivar, tal como se realiza en el método de los tubos capilares. Este método fue usado por primera vez por Townsend y col. (1938). Presenta algunas ventajas respecto al método de los tubos capilares: se asemeja más a las condiciones de trabajo de las industrias conserveras, permite trabajar con un gran número de réplicas por experiencia y los botes se abren y cierran más cómodamente que los tubos, pero al igual que éstos, requieren un tiempo apreciable para alcanzar las temperaturas de calentamiento y enfriamiento (períodos de inercia). Se necesitan unos equipos especiales de microautoclaves a vapor y de cierre de los botes. Por otro lado, sólo se detectan alteraciones por incubación directa de los botes cuando se produce abombamiento de los mismos y la operación de transferir el contenido de los botes a los medios de recuperación es una tarea laboriosa y más difícil que en el caso de los tubos (American Can. Co., 1945).

El **método del tanque** consiste en un pequeño depósito de acero inoxidable de forma cilíndrica, de 10 cm de diámetro por 11 cm de profundidad, con camisa de vapor y una capacidad de 900 mL que va equipado con un termómetro y un agitador. En el fondo del tanque hay cuatro válvulas conectadas cada una a un tubo de ensayo para la recogida de muestras. El producto inoculado y frío se introduce en el tanque y comienza a calentarse uniformizándose con la agitación. Cuando llega a la temperatura prevista comienzan a tomarse las muestras, recogiendo en los tubos de ensayo.

Las ventajas de este método consisten en que se pueden emplear medios inoculados, tanto líquidos como líquidos con sólidos y resulta fácil obtener las muestras para el recuento de supervivientes. Sin embargo, los tiempos necesarios para elevar la

temperatura hasta la fijada son muy apreciables, dado el gran volumen de la muestra, quedando limitado su empleo a temperaturas inferiores a los 115,5°C. Por otro lado, la construcción del tanque es compleja y su manejo requiere gran precisión (Williams y col., 1957).

1.4.2.2. Sistemas de calentamiento directo.

En los métodos directos los microorganismos son calentados directamente con vapor. Estos métodos son más complejos y no permiten trabajar con temperaturas por debajo de los 100°C.

Perkin diseñó en 1974 una **planta UHT** a escala laboratorio para procesar pequeños volúmenes (300-500 mL) de producto en condiciones UHT (130-150°C durante unos segundos). Esta planta permite llevar a cabo estudios de termorresistencia en substratos líquidos. Consta esencialmente de una cámara de calentamiento y otra de enfriamiento evaporativo (Perkin y col., 1980). La muestra líquida inoculada se introduce nebulizada dentro del vapor de la cámara de calentamiento. El tiempo de permanencia se controla variando el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la apertura de la válvula de acceso a la cámara con presión negativa. La ventaja de este método es que da al producto el mismo tratamiento que las plantas UHT comerciales. Con ello se consigue ajustar las condiciones del proceso y extrapolarlas a la planta comercial.

Estas plantas son más adecuadas para la aplicación industrial de los datos de termorresistencia que para la investigación básica en laboratorio, donde instrumentos del tipo de termorresistómetro son mucho más precisos.

Stumbo diseñó un **termorresistómetro** para estudiar la termorresistencia a temperaturas comprendidas entre 104 y 150°C (Stumbo, 1948). Consta de tres cámaras contiguas que pueden mantener la presión de vapor de agua independientemente unas de otras, mediante cierres herméticos. Una bandeja metálica es la portadora de las muestras y atraviesa sucesivamente las tres cámaras. La cámara central o de tratamiento, posee un cronómetro graduado en 0,001 minuto que se pone en funcionamiento cuando las muestras entran en ella. El vapor a presión se emplea tanto para esterilizar las cámaras como para el tratamiento de las muestras. Un sistema de cadenas permite a la bandeja

moverse a través de las cámaras. Las muestras pasan de la cámara de espera, a temperatura ambiente, a la de tratamiento que está a alta temperatura con vapor a presión. Allí están el tiempo prefijado, transcurrido el cual pasan a la cámara de descarga de las muestras, también a temperatura ambiente. Las muestras caen en tubos con medio de cultivo o diluyente.

El diseño de Stumbo fue una idea revolucionaria en el estudio de la termorresistencia a altas temperaturas. Permitió reducir los tiempos de inercia de calentamiento y enfriamiento, automatizar los cultivos, controlar el tiempo de exposición con más exactitud, etc. También contemplaba la realización de varias réplicas a la vez.

El diseño de **Pflug y Esselen** (1953a, b) mejoró al de Stumbo ya que la bandeja transportadora de muestras accionada por una cadena se sustituyó por seis cilindros accionados por un pistón neumático. Según los autores, con ello se conseguía una precisión de $\pm 0,012$ segundos, lo que hacía posible la aplicación de tiempos de exposición muy cortos. Otra aportación fue la incorporación de una antecámara presurizada, para impedir la desecación de la muestra a la salida de la cámara de vapor, y simplificar el diseño eliminando la cámara de salida de las muestras, entrando y saliendo éstas de la cámara de vapor por la misma antecámara.

El diseño de nuevos termorresistómetros cobró interés debido a la disponibilidad de nuevos sistemas de control informatizado, que permitieron abordar los estudios por encima de 135°C. Fruto de ello fueron los diseños de David (1985) y de Chipping Campden (Brown y Gaze, 1985 y 1986).

Basándose en los modelos previstos existentes, **David y Merson** (1990) desarrollaron un nuevo termorresistómetro para estudiar los parámetros de termorresistencia hasta temperaturas de 155°C, empleando tiempos del orden de segundos (David, 1985; David y Merson, 1990) y controlado por un ordenador. Consta de un único cilindro transportador de la muestra y perforado en su eje longitudinal para acomodar los termopares a la muestra. Su movimiento es también de vaivén, introduciendo la muestra en la cámara de vapor y retrocediendo a la antecámara para descargarla en un tubo con medio de cultivo o diluyente. Las muestras se colocan en un disco de papel de filtro hidrófilo, que es encerrado entre otros dos discos hidrófobos. La

muestra ha de ser líquida. El conjunto se introduce en un orificio del cilindro transportador y se inmoviliza en posición horizontal con un anillo metálico, dotado de una ranura que permite el paso de un termopar para seguir la evolución de la temperatura de la muestra el cual va conectado a un ordenador que permite registrar 60 lecturas de temperatura por segundo. La antecámara está refrigerada por un serpentín de agua para evitar el calentamiento de la muestra previo a su tratamiento. A continuación, la muestra encerrada entre los discos se expone por ambas caras al vapor de la cámara, lo que favorece un calentamiento-enfriamiento casi instantáneo. Al finalizar el tratamiento, cuando el cilindro portamuestras retrocede, un chorro de aire estéril impulsa la muestra para que caiga dentro del tubo de recogida. Este aire ayuda a enfriar rápidamente la muestra e impide la desecación de la misma por efecto del enfriamiento evaporativo.

Un sistema de microcomputadores relaciona la adquisición de datos de tiempo y temperatura y controlan los tiempos de exposición. Los programas están escritos en *Fortran*, (para fijar condiciones de tratamiento, adquisición y procesado de datos) y en *Ensamblador* (para accionamiento del pistón y medición de la temperatura de la muestra).

Un inconveniente, específico del modelo de David (1985), es que únicamente puede procesar una muestra por tratamiento. Este hecho puede causar problemas cuando se emplea la técnica del número más probable para enumerar los supervivientes.

Basándose en las ideas anteriores, Brown y Gaze (1985 y 1986) desarrollaron un termorresistómetro que incorpora algunas notables mejoras respecto a los diseños anteriores.

El **termorresistómetro de Campdem** incorpora todo el desarrollo tecnológico, al igual que el de David, pero además permite exponer a la vez cinco réplicas de cada tratamiento térmico. Otra ventaja reside en que la cámara de tratamiento y el tanque de reserva de vapor son la misma pieza, con lo que las fluctuaciones térmicas son mucho menores. La carga y descarga de las muestras es por el mismo extremo, al igual que los modelos de David y Pflug, e incorpora los discos de papel para depositar las muestras.

Este tipo de termorresistómetro ha sido ampliamente utilizado por distintos investigadores (Silla y col., 1993; Fernández y col., 1994; Ocio y col., 1994; Rodrigo y col. 1999; Blasco y col., 2004).

Sin embargo, los avances tecnológicos han hecho viejos a estos modelos. Las modernas técnicas de los tratamientos UHT exigen, para obtener datos fiables de termorresistencia, que los tiempos de inercia sean casi nulos. Esto sólo puede lograrse con un control programado. Además estos termorresistómetros, son unos equipos que implican un gran desembolso inicial y altos costos de mantenimiento.

1.4.2.3. Sistemas de mezcla.

En los métodos de mezcla, la suspensión de microorganismos es directamente inoculada en el medio de tratamiento, una vez éste ha alcanzado la temperatura adecuada (Levine, 1956; Kooiman y Geers, 1975). Con ello estos métodos pretenden reducir la fase de inercia de calentamiento de las suspensiones de microorganismos.

El primer sistema de mezcla corresponde a **Levine y col.**, quienes diseñaron en 1927 el método del frasco (Stumbo, 1973). Este método consistía en poner un frasco de Woult con el medio de tratamiento en un baño termostático. Por el cuello central se ponía un eje de agitación y por uno de los laterales un termopar. El cuello restante se reservaba para inocular la suspensión de microorganismos, una vez que la temperatura de tratamiento se había estabilizado, y para la toma de muestras. Este sistema y los derivados a partir de él (Aiba y Toda, 1967, Koiman y Geers, 1975) eran baratos, sencillos y evitaban las fases de inercia del calentamiento, sin embargo, únicamente se podían emplear a temperaturas inferiores a la de ebullición.

Basado en los métodos de mezcla el **termorresistómetro de Sala y Condón (TR-SC)** fue puesto en funcionamiento por el equipo de Condón (Condón y col., 1989 y Condón y col., 1993), y desde entonces ha sido ampliamente usado por distintos investigadores (Condón y Sala, 1992; González y col., 1995; Palop y col., 1996; Pagán y col., 1999; Conesa y col., 2003). El termorresistómetro TR-SC (Condón y col; 1993) incorpora muchas de las ventajas de los métodos existentes: permite llevar a cabo determinaciones de termorresistencia mediante un sistema multipuntual en alimentos homogeneizados, a temperaturas de pasteurización o UHT, con una monitorización

constante del pH, y es posible calcular valores de D_T extremadamente bajos, del orden de 0,0009 min. (para *Bacillus coagulans*; Condón y col., 1993). Sin embargo, no es capaz de realizar tratamientos no isotérmicos.

El **termorresistómetro Mastía** (Conesa y col., 2009) es una modificación del anterior al que se le ha incluido un serpentín por el que circula agua que actúa como sistema refrigerante. También se incorporó un autómata programable conectado a la resistencia y al sistema de enfriamiento para controlar la temperatura dentro del vaso principal.

Este termorresistómetro es el que se ha empleado en la presente tesis doctoral para el estudio de termorresistencia de microorganismos. Por lo tanto, su funcionamiento se explica detalladamente en el apartado 3.5 de materiales y métodos.

1.4.2.4. Métodos de partícula.

Otro método para determinar la termorresistencia son los **métodos de partícula**, que consisten en pequeñas partículas con elementos sensibles al calor (ITTs), de los cuales se habla en el siguiente apartado, y que son objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral.

1.4.3. Factores que afectan a la termorresistencia.

La termorresistencia bacteriana es una propiedad compleja que resulta afectada por numerosos factores (tabla 1.2). Se muestra a continuación una clasificación de estos factores, dando una idea de la complejidad del tema (Palop, 1995).

Tabla 1.2. Factores que influyen en la termorresistencia de los esporos,

Factores intrínsecos y genotípicos	Características genéticas	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Especie</u> 2. <u>Cepa y lote de esporos</u>
Factores previos al tratamiento térmico	Condiciones de esporulación	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Medios de esporulación:</u> formulación, pH, agar, tipo de medio, etc 2. <u>Condiciones de incubación:</u> temperatura, humedad, tiempo de incubación, etc.
	Condiciones de recuperación y limpieza	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Número de lavados</u> 2. <u>Aplicación de sonicación</u>
	Condiciones de almacenamiento	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Medio de almacenamiento:</u> formulación, pH, actividad de agua, 2. <u>Refrigerado, congelado o liofilizado</u> 3. <u>Temperatura</u> 4. <u>Humedad relativa</u> 5. <u>Tiempo</u>
Simultáneos al tratamiento térmico	Condiciones de calentamiento	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Temperatura</u> 2. <u>Medio de calentamiento:</u> formulación, pH, actividad de agua,)
Posteriores al tratamiento térmico	Condiciones de recuperación	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Condiciones posteriores al tratamiento:</u> temperatura, tiempo 2. <u>Diluyente</u> 3. <u>Medios de recuperación:</u> formulación pH, actividad de agua, potencial redox, capacidad tamponadora, tipo de medio, sólido o líquido, siembra en volumen o en superficie, efecto de arrastre del diluyente 4. <u>Condiciones de incubación:</u> temperatura, humedad relativa, composición gaseosa de la atmósfera, tiempo

A continuación se comentan brevemente los más importantes.

Con respecto a las **características genéticas**, la especie bacteriana es determinante en la termorresistencia de los esporos, como también lo son la cepa y el lote de esporos, aunque estos en menor medida. No obstante la influencia de otros factores puede ser de mayor magnitud que las características genéticas (Put y Aalsbersber, 1967).

El contenido en ADN parece ser un factor a tener en cuenta en la termoresistencia de los esporos. Belliveau y col. (1990) realizaron una comparación entre dos subpoblaciones de *B. megaterium* con diferentes contenidos en ADN, una población

más “ligera” ($0,65 \times 10^{-14}$ g de ADN por esporo) y otra más “pesada” ($1,25 \times 10^{-14}$ g de ADN por esporo). Encontraron una relación positiva entre la termorresistencia y el contenido en ADN (por ejemplo, a 80°C la población mas pesada era un 130% más termoresistente que la ligera), pero llegaron a la conclusión de que este factor no es determinante en la resistencia de los esporos.

Con respecto a las **condiciones de esporulación**, la temperatura es uno de los factores que en mayor medida determina la resistencia al calor de los microorganismos esporulados. Los esporos son normalmente más termorresistentes cuando la esporulación se produce a más altas temperaturas (Palop y col, 1999b).

Según Warth (1978b) la termorresistencia está relacionada con la temperatura máxima a la que un microorganismo puede crecer. Esta teoría se basa en una correlación obtenida por el autor al representar la resistencia al calor de varias especies frente a sus temperaturas máximas de crecimiento. Los datos de resistencia al calor fueron obtenidos a partir de esporos esporulados a la temperatura óptima de crecimiento. La temperatura óptima de esporulación normalmente es mayor que la temperatura óptima de crecimiento y Warth obtuvo una correlación similar al enfrentar los datos de resistencia al calor con la temperatura óptima de esporulación. Condón y col. (1992) demostraron que esporos de *B. subtilis* obtenidos de células incubadas a 32 ó 52°C mostraban los valores de termorresistencia correspondientes a la temperatura de esporulación, independientemente de la temperatura a la que habían crecido antes de la esporulación. Para Condón y col. (1992a) es la temperatura a la que se produce la esporulación la que realmente determina la termorresistencia.

En un estudio realizado por Beaman y Gerhardt (1986), existía una relación lineal entre la temperatura de esporulación y la temorresistencia, aunque en algunas especies no se cumplía. Para Condón y col. (1992a) la relación no es lineal y el rango de máxima influencia depende de la cepa.

La temperatura de esporulación influye también en el contenido en minerales, Lechowich y Ordal (1962) demostraron que al aumentar la temperatura de esporulación aumenta el grado de mineralización y por tanto la resistencia al calor. Sin embargo los datos publicados sobre la relación de mineralización de los esporos y la termorresistencia no siempre concuerdan.

En cuanto a la composición del medio de esporulación, el pH, el contenido en calcio y la concentración de fosfatos son los factores más importantes (Russell, 1982). Los esporos son más termorresistentes a pHs del medio de esporulación próximos a la neutralidad (Mazas y col., 1997). Los fosfatos y el tipo de minerales existentes en el medio de esporulación determinan el grado y tipo de mineralización de los esporos maduros que, a su vez, determinará su termorresistencia (Slepecky y Foster, 1959). Los minerales estabilizan las proteínas y otras estructuras sensibles al calor.

Con respecto a otros tratamientos físicos, como la sonicación (Sanz y col., 1982), radiaciones ionizantes (Lara y col. 2001), tratamientos químicos con peróxido de hidrógeno o acidificación del espora aplicados antes del calentamiento reducen la termorresistencia, siendo esta reducción mayor cuando se aplican simultáneamente al calor (Pallas y Hamdy, 1976; Gombas y Gómez, 1978).

Con respecto a las **condiciones de calentamiento**, los factores más importantes que determinan la termorresistencia de los esporos son la temperatura del medio de calentamiento, su composición, el pH, la actividad de agua y el sistema de calentamiento.

La influencia del pH del medio de calentamiento ha sido estudiada por diversos autores (Cook y Gilbert, 1968; Lowick y Anema, 1972; Brown y Thorpe, 1979; Cameron y col., 1980; Cerny, 1980; Blocher y Busta, 1983; Ocio y col., 1994, entre otros). Todos ellos concluyeron que los esporos presentan su máxima termorresistencia con pHs cercanos a la neutralidad, decreciendo conforme el medio se acidifica. La magnitud del efecto varía según la especie (Cerny, 1980) e incluso es diferente entre las diferentes cepas dentro de la misma especie (Brown y Thorpe, 1979).

Gould y Dring (1975) intentaron explicar la disminución de la resistencia al calor de los esporos calentados en medios ácidos. Sería debido a una protonización de los grupos carboxilo del córtex que llevaría a su colapso y a la consiguiente rehidratación del protoplasto. Okereke y col. (1990) observaron por microscopía electrónica que el calentamiento provocaba una disminución en el tamaño del córtex y un aumento del volumen del protoplasto. En opinión de Warth (1985) si el córtex se colapsara por la protonización, los esporos serían muy inestables. Propuso que la presión osmótica creada por el córtex no es sólo provocada por los grupos carboxilo, sino por toda la estructura, lo que incluye los cationes divalentes (Stewart y col., 1981; Marquis y col.,

1985) mostraron que la acidificación del medio de calentamiento produce un intercambio de cationes divalentes del espora con protones del medio, de manera que se produce una protonización de las proteínas que se hacen más sensibles a la desnaturalización.

La actividad de agua es quizá el factor que más influencia tiene en la termorresistencia microbiana. Los valores D pueden aumentar, incluso miles de veces, al reducir la actividad de agua del medio hasta valores de 0,2-0,4 (Murrell y Scott, 1966; Alderton y Snell, 1970). Por debajo de estos valores la termorresistencia parece disminuir de nuevo (Russell, 1982). El tipo y la molaridad del tampón empleado como medio de calentamiento también parecen afectar a la termorresistencia, aunque existen resultados contradictorios.

La presencia de espesantes y grasas en el medio de calentamiento también afecta a la termorresistencia. Sustancias como peptona o carne cocida protegen a los esporos frente al calor. También los lípidos en el medio de calentamiento aumentan la termorresistencia, aunque su efecto depende del tipo de lípido y del microorganismo en cuestión (Russell, 1982).

Con respecto a las **condiciones de recuperación**, cuando el tratamiento térmico previo ha sido suave, no se observan diferencias entre los diferentes medios en cuanto a la capacidad para recuperar los microorganismos dañados. Sin embargo, cuando el tratamiento térmico previo es más severo se observa que no todos los medios son capaces de recuperar la misma cantidad de microorganismos (Adams, 1978).

La temperatura de incubación se ve afectada, de manera que se reducen los márgenes de crecimiento (Labbe y Norris, 1982).

Palop y Martínez (2006) concluyeron, en un estudio realizado con *B. coagulans*, que el tiempo necesario para desarrollar las colonias era mayor cuando el pH del medio de recuperación era ácido. Resultados similares fueron encontrados para esporos de *B. cereus* (Cook y Brown, 1965; Cook y Gilbert, 1968; Mallidis y Scholefield, 1986; López y col., 1997) y de *B. stearothermophilus* (Fernández y col., 1995).

1.5. Tratamientos térmicos.

Tras los descubrimientos de Appert y Pasteur, la industria conservera americana fue, a principios del siglo XX y gracias a los avances en termobacteriología, el motor principal que impulsó la moderna Tecnología de los Alimentos. En la década de 1920, Bigelow, Esty y Meyer, en los laboratorios de la National Canners Association, estudiaron en profundidad los mecanismos de acción del calor sobre los microorganismos y la cinética de destrucción microbiana, sentando las bases de los actuales procesos de esterilización. En la década de 1940, Esselen demostró el orden logarítmico de destrucción de las vitaminas sometidas al calor y encontró que su cinética de destrucción presentaba características diferentes de la de los microorganismos, siendo menos sensibles que aquéllos a los tratamientos térmicos a elevadas temperaturas (Esselen y Pflug., 1956).

A partir de este momento, el principal objetivo de la Tecnología de los Alimentos fue el desarrollo de instalaciones que permitieran la aplicación de tratamientos más cortos a temperaturas más elevadas. Así, el tratamiento en baños abiertos fue sustituido por los tratamientos en autoclaves estáticos y posteriormente dinámicos, y de los procesos discontinuos se pasó a los continuos que evolucionaron hasta llegar a los modernos procesos de esterilización, que permiten el calentamiento rápido de diversos productos envasados. La puesta a punto de las instalaciones de esterilización por inyección de vapor, junto con la aplicación de los métodos de envasado aséptico, ha permitido aplicar tratamientos térmicos a temperaturas elevadas durante tiempos muy cortos (HTST, UHT) a la mayoría de los alimentos líquidos.

Los objetivos principales que se persiguen al aplicar un tratamiento térmico a un alimento son (Downing, 1996):

- A. Destruir los microorganismos que puedan afectar a la salud del consumidor.
- B. Destruir los microorganismos que puedan alterar el alimento.
- C. La inactivación enzimática.
- D. Optimizar la retención de factores de calidad a un costo mínimo.

El tratamiento térmico de un alimento depende de la termorresistencia de los microorganismos y enzimas presentes en el alimento, de la carga microbiana inicial que

contenga el alimento antes de su procesado, del pH del alimento, de su estado físico y de las cinéticas de inactivación de factores de calidad (color, vitaminas, etc.).

Bajo el título de tratamientos térmicos se suelen englobar todos los procedimientos que tienen entre sus fines la destrucción de los microorganismos capaces de alterar el producto o que pueden suponer un riesgo para el consumidor durante su vida útil. Cabe destacar dentro de éstos, la pasteurización y la esterilización.

1.5.1. Pasteurización.

Es el método que conserva los alimentos por inactivación de sus enzimas y destrucción de los microorganismos relativamente termosensibles (bacterias no esporuladas, levaduras y hongos filamentosos), provocando cambios mínimos en el valor nutritivo y las características organolépticas del alimento (Fellows, 1994).

La intensidad del tratamiento térmico y el grado de prolongación de su vida útil se hallan determinados principalmente por el pH del alimento. El objetivo principal en los alimentos de baja acidez ($\text{pH} \geq 4,6$) consiste en la destrucción de la flora patógena y la reducción de la flora banal, para conseguir un producto seguro desde el punto de vista sanitario, aunque de corta conservación y almacenado en condiciones de refrigeración. Para los alimentos ácidos ($\text{pH} \leq 4,6$), el objetivo es conseguir una estabilización del producto que respete sus cualidades organolépticas, ya que no son necesarias altas temperaturas porque en medios ácidos no es posible el crecimiento de bacterias esporuladas (Kyzlink, 1990), permitiendo el almacenamiento a temperatura ambiente.

1.5.2. Esterilización.

Significa la destrucción de todos los organismos viables que puedan ser contados por una técnica de recuento o cultivo adecuados y sus esporos, mediante la aplicación de calor a temperaturas superiores a 100°C .

Los alimentos de baja acidez necesitan un tratamiento energético, temperaturas a partir de 116°C , durante diversos tiempos, que sean suficientes para que la posibilidad de que sobreviva el *Clostridium botulinum* sea muy pequeña. Los tiempos de vida útil son superiores a 6 meses (Fellows, 1994).

El principal objetivo de la esterilización de alimentos es la destrucción de los microorganismos, pero a la vez ocurrirán otros procesos. Unos son deseables como destrucción enzimática, ablandamiento de los tejidos etc, que pese a ello se deberán controlar para que no produzcan efectos excesivos y lleguen a afectar a sus propiedades físicas: color, forma, consistencia, etc. Otros son menos deseables pero inevitables en parte, como cambios sustanciales en su valor nutritivo y características organolépticas. Las mejoras, en los procesos tecnológicos van encaminadas por tanto a reducir los efectos no deseados sobre los componentes nutritivos y las características organolépticas de los alimentos, reduciendo los tiempos de tratamiento (De Ritter, 1982).

Dada la complejidad de la acción de los tratamientos térmicos sobre los alimentos, será necesaria su optimización de forma que se obtengan en cada caso los resultados buscados. Por tanto, un tratamiento térmico debe ajustarse de forma que se consigan los resultados deseables y se minimicen los indeseables, lo que inevitablemente llevará a elegir unas condiciones que establezcan un compromiso entre unos y otros que conduzca a un resultado global satisfactorio.

1.5.3. Equipos para la aplicación de tratamientos térmicos.

1.5.3.1. Equipos para la aplicación de tratamientos térmicos de productos envasados.

Los **pasteurizadores** se utilizan para el tratamiento térmico de alimentos ya envasados. Funcionan a presión atmosférica, por lo tanto solo pueden alcanzar temperaturas inferiores a 100°C. Según el modo de transmisión de calor, se distingue entre pasteurizadores de baño de agua, de vapor y de duchas de agua caliente. En estos equipos, las etapas de calentamiento-mantenimiento-enfriamiento pueden realizarse de manera continua o intermitente.

Los equipos más sencillos son los **calderines** que consisten en baños de agua caliente, donde se sumergen los recipientes llenos y cerrados y se les mantiene el tiempo deseado. Lo más frecuente es mantener el agua en ebullición. Cuando se opera a temperaturas más bajas 75-90°C es necesario un regulador automático de temperatura.

Para producciones grandes se utilizan **pasteurizadores continuos** por inmersión o duchas de agua caliente, consistentes en un túnel por el que los envases son llevados por un sistema transportador a lo largo de las diferentes zonas funcionales de la instalación.

Para aplicar tratamientos térmicos a temperaturas superiores a 100°C a alimentos envasados, es necesario hacerlo bajo una presión que permita el aumento de la temperatura. Esto se consigue en **autoclaves**, cuyas paredes gruesas y cierres son capaces de soportar las presiones de trabajo requeridas. Se utilizan para la esterilización de alimentos envasados de baja acidez para lo que se aplican temperaturas superiores a 115°C. Existen los que trabajan por cargas y en continuos. En los **autoclaves discontinuos** la esterilización discurre siguiente manera. Después de introducir en el autoclave los alimentos envasados a esterilizar y de cerrar el autoclave, se procede a introducir el medio calefactor (agua o vapor). Transcurrido el tiempo de mantenimiento y esterilizados los envases, se procede al enfriamiento del producto con agua fría, aplicada por inmersión o por duchas. Los autoclaves de este tipo, empleados por la industria conservera, suelen ser de sección circular y pueden estar dispuestos en posición vertical u horizontal. Los envases se colocan en cestas de geometría apropiada para el autoclave (Casp y Abril, 2003).

La operación con cualquier sistema de esterilización debe asegurar la homogeneidad del tratamiento térmico aplicado al lote de envases que se encuentre en su interior. Esta homogeneidad se conseguirá cuando los factores de que depende la temperatura en el centro térmico del alimento envasado se mantengan constantes en cualquiera de las posiciones dentro del recinto.

En el mercado se encuentran un gran número de autoclaves, de tecnologías muy diferentes. Para sistematizar el análisis de estas máquinas se han ordenado por el tipo de calefacción que usan, ya que ésta condiciona en gran medida sus características constructivas, su operación y los productos para los que pueden utilizarse (Gavin, 1988).

Los equipos que funcionan con **vapor de agua saturado** constan fundamentalmente de una entrada de vapor con un sistema de distribución del mismo en el interior del autoclave que asegure la buena homogeneidad de la temperatura, unos sistemas de purga que consigan evacuar todo el aire existente en el equipo antes de la puesta a presión, un sistema de desagüe para eliminar los condensados y el agua de enfriamiento,

un sistema de entrada del agua para enfriamiento en su interior y sistemas de control y medida: válvula de regulación de vapor, termómetro y registro de temperatura, manómetro, válvulas de seguridad, etc (Gavin, 1988). En el caso de calefacción por vapor de agua saturado, el mantenimiento de la temperatura prevista está exenta de problemas, puesto que dicha temperatura se gobierna a través de la presión existente en el autoclave.

En los que calientan por **mezcla de vapor de agua–aire** el medio transmisor de calor es una mezcla de vapor y aire. Este último se utiliza para producir la contrapresión en la esterilización al margen de la temperatura elegida. La calefacción se consigue inyectando vapor de agua saturado. Como consecuencia de las distintas propiedades físicas del aire y del agua, ambos son inmiscibles. Para evitar la formación de puntos fríos en el autoclave, vapor y aire se someten a intenso entremezclado con ayuda de un ventilador. Los condensados producidos durante el calentamiento permanecen en el interior de la carcasa y se emplean para el enfriamiento del producto pulverizándolas sobre él después de haber sido enfriados en un intercambiador de calor externo con agua fría. La presión durante todo el proceso se mantiene en el nivel deseado por inyección de aire comprimido.

En los autoclaves que funcionan con **agua sobrecalentada** estas condiciones el calentamiento del producto se consigue por intercambio de calor sensible, no de calor latente, por lo que el coeficiente de transferencia de calor superficial es mucho menor que en el caso de la condensación de vapor, y es función de la velocidad con la que circula sobre la superficie a calentar. Si se utiliza agua caliente en reposo como fluido calefactor, el coeficiente de película es muy pobre y además se producen amplias diferencias de temperaturas entre los distintos niveles de agua. Así pues, la masa de agua sobrecalentada esta en movimiento en todo momento, utilizándose para ello el sistema más apropiado para cada caso, de forma que se consiga que la velocidad de circulación del agua sea siempre la misma, pues al variar ésta, variará el coeficiente de película (Casp y Abril, 2003). El enfriamiento del agua de proceso se consigue por medio de un intercambiador de calor, contra agua fría, consiguiéndose así que el agua que está en contacto con los envases durante el proceso completo sea la misma. La presión en el recinto se regula también por inyección de aire comprimido.

Los **autoclaves rotatorios** cuentan con un dispositivo especial de rotación en el cual se insertan los cestillos o bandejas cargadas de envases. El mecanismo giratorio es movido por un motor que acciona un eje que atraviesa la pared posterior del autoclave. En la mayoría de los autoclaves es posible técnicamente trabajar con velocidades de 3 a 36 rpm (Sielaff, 2000). La carga de estos autoclaves se realiza a través de una puerta existente en la cara frontal del aparato. Los envases a esterilizar se colocan antes en cestos o bandejas, que después se introducen en el autoclave con ayuda de un transportador de rodillos. Mediante un sistema a presión, los cestillos o las bandejas se fijan al autoclave, de manera que no se desplacen al girar el aparato.

La instalación de un sistema de esterilización en continuo tiene sentido en el caso de que se trabajen grandes series del mismo producto en el mismo envase. En un esterilizador en continuo se encuentran zonas a diferentes temperaturas que se mantendrán constantes durante todo el tiempo en que el esterilizador esté en marcha, es decir, el calentamiento, mantenimiento y enfriamiento del producto se realiza porque el envase se traslada por las zonas de temperatura creciente, de temperatura de régimen y de temperatura decreciente del esterilizador. Generalmente constan de varios recintos separados que se mantienen a temperaturas diferentes para que en ellos se pueda producir el calentamiento, la esterilización y el enfriamiento del producto.

Estos sistemas ahorran energía y aplican tratamientos uniforme. Además se consigue una reducción de la mano de obra ya que en todos ellos la carga y descarga se realiza de forma automática. Casi siempre los envases recorren el interior del esterilizador en posición horizontal.

A continuación se describen los **autoclaves continuos** más importantes.

El principio de funcionamiento de **esterilizadores hidrostáticos** es muy sencillo: constan de una cámara de vapor parcialmente llena de agua que se mantiene bajo presión gracias a dos columnas hidrostáticas a las que está conectada. En estas condiciones, la temperatura de la cámara de vapor es la del vapor saturado a la presión a la que se encuentre, y que se corresponde con el desnivel existente entre la altura del agua en la cámara de vapor y en las dos columnas hidrostáticas.

En la primera columna se produce el precalentamiento, a la vez que se va

aumentando la presión externa a la que son sometidos los envases, al incrementarse la columna de agua que soportan. Al mismo tiempo que se incrementa la presión se incrementa la temperatura, ya que gracias al movimiento de los envases en el transportador, a la estrechez de la columna y a la entrada de agua por la columna de salida, se invierte la tendencia natural a la estratificación del agua por temperatura, siendo esta mayor cuanto más baja sea la posición. A continuación el producto entra en la cámara de vapor en la que se mantiene el tiempo marcado por la velocidad del transportador. Después de la esterilización el producto se evacua por otra columna, en la que encuentra temperaturas y presiones cada vez más bajas. El agua de las columnas circula en contracorriente de los envases, permitiendo así una importante recuperación del calor, y por lo tanto un bajo consumo energético (Casp y Abril, 2003).

Los esterilizadores **neumohidrostáticos** se desarrollaron para solucionar el problema de los esterilizadores hidrostáticos de no poder utilizar determinados tipos de envases. El problema se resolvió utilizando agua sobrecalentada en lugar de vapor de agua. El agua caliente se encuentra en el depósito inferior de la cámara de vapor, y se mantiene a la temperatura deseada por inyección de vapor. Una bomba de gran caudal se encarga de elevar esta agua a la parte superior de la cámara, donde se pulveriza sobre los envases que la recorren. La presión de la cámara se regula por inyección de aire comprimido. En la columna de enfriamiento se repite el mismo esquema pero con una temperatura menor, regulándose también su presión, al mismo nivel que en la cámara de esterilización, por inyección de aire comprimido. El esterilizador dispone por lo tanto de las columnas hidrostáticas de precalentamiento y de enfriamiento final y de dos cámaras centrales, la de esterilización y la de enfriamiento a sobrepresión.

El **Sterilmatic** está compuesto por dos o más carcassas horizontales cilíndricas, colocadas en serie, y en las que se produce el calentamiento y el enfriamiento de forma sucesiva para todos los envases. En el interior de las carcassas se disponen los mecanismos que colocan los envases en su posición y los hacen avanzar de forma automática manteniéndolos en su interior el tiempo adecuado. En la primera carcassa se produce la esterilización mediante vapor de agua, y en las siguientes se efectúa el enfriamiento a sobrepresión o a presión atmosférica por inmersión parcial en agua. En este esterilizador el procesado se realiza con agitación lo que permite acortar el tiempo

de tratamiento de los productos con suficiente fluidez.

El **Hydrolock** está formado por una cámara horizontal donde tiene lugar la esterilización, por medio de vapor saturado o mezcla de vapor-aire comprimido, y el preenfriamiento a contrapresión de los envases. Un sistema de esclusa permite la entrada y salida de los envases al recinto presurizado. Cuando se requiere se puede conseguir que el tratamiento se realice con agitación, por medio de unas pistas longitudinales al eje de la carcasa sobre las que rozan los envases, produciéndose así un agitación axial, que mejora la penetración de calor en muchos productos

El **Storklave** está compuesto por dos carcasas cilíndricas dispuestas en posición vertical. Una de ellas se dedica a la esterilización y la otra al enfriamiento. Los envases se depositan automáticamente sobre unas bandejas, por las que recorrerán todo el esterilizador. Gracias a estas bandejas se puede tratar al mismo tiempo envases de altura diferente, siempre que el diámetro sea el mismo y se mantenga constante la penetración de calor en los distintos tamaños. Las bandejas cargadas entran en la columna de esterilización y son tomadas por un conjunto de 4 árboles helicoidales giratorios que las hacen ascender. En la parte más alta de la columna las bandejas son transferidas horizontalmente hasta la parte superior de la carcasa de enfriamiento, donde otros árboles helicoidales se encargan de que descendan por la columna de enfriamiento hasta el plano de descarga. El calentamiento en este esterilizador se produce por medio de vapor de agua, y el enfriamiento por medio de agua fría pulverizada. Si se requiere contrapresión se inyecta aire comprimido.

1.5.3.2. Equipos para la aplicación de tratamientos térmicos de productos no envasados.

Estos equipos son los utilizados en el método de procesado aséptico de alimentos. El procesado aséptico es un proceso a temperatura elevada durante corto tiempo HTST (High Temperature Short Time), en el cual el producto pasa a través de un sistema calentamiento-mantenimiento-enfriamiento, con el siguiente llenado y cerrado en un envase estéril y en un ambiente también estéril. Este término incluye el sistema de

procesamiento del producto y el sistema de envasado. El tratamiento aséptico de los alimentos se ha desarrollado con altibajos desde sus inicios. Aunque se tiende a pensar que es un avance reciente, en realidad, como concepto tiene una antigüedad de cerca de un siglo. El proceso de calentamiento- refrigeración-llenado (HCF) fue iniciado por Ball en 1923 en el American Can Research Department. El tratamiento aséptico tal como lo conocemos hoy día fue desarrollado, sin embargo, por Martin Dole con la puesta a punto del "Dole Aseptic Process".

Para el calentamiento del producto en el procesado aseptico se pueden emplear **sistemas directos**, en estos el medio de calentamiento (vapor de agua) se pone en contacto con el producto. Existen dos tipos de calentamiento directo: *La inyección de vapor*, se introduce el vapor al producto en la cámara de inyección. *La infusión de vapor*, se introduce el producto en una cámara de vapor saturado a la temperatura de esterilización del producto.

En los **sistemas indirectos** existe una separación física entre producto y medio de calentamiento. Son los denominados intercambiadores de calor, de los cuales existen diferentes diseños.

En los **intercambiadores de placas**, estos hacen de superficie intercambiadora con producto en un lado y medio de calentamiento en el otro. Se usan para líquidos homogéneos de relativa baja viscosidad. Cada placa está rodeada de juntas para formar el circuito y montadas en una prensa. El número de placas y el perfil de las mismas se ajusta a las necesidades de tratamiento de cada producto.

Los **intercambiadores tubulares** se utilizan normalmente para líquidos homogéneos de baja y media viscosidad. Existen de varias configuraciones: de dos o tres tubos concéntricos en los que el producto fluye a través del tubo interior en el tubo doble y a través del tubo intermedio en el tubo triple y el medio de calentamiento fluye en el otro tubo, en dirección opuesta al producto. De tubo en cámara, en los que el tubo está enrollado dentro de una cámara, fluyendo el producto a través del tubo y el medio de calentamiento en la cámara a contra corriente. Y por último los multitubulares, que consisten en un haz de tubos en una cámara, donde el producto fluye a través de los tubos y el medio de calentamiento fluye en la cámara a contracorriente.

Dentro de los intercambiadores tubulares se encuentran los intercambiadores de superficie rascada. Estos intercambiadores se utilizan para el procesamiento de

productos más viscosos o con trozos en suspensión, actualmente en el mercado existen dos tipos de configuraciones:

- Eje rotatorio con cuchillas raspadoras dentro del tubo intercambiador de calor.
- Eje con rascadores a 120°C o 180°C, que se mueve en sentido longitudinal.

1.5.4. Otros sistemas para la aplicación de tratamientos térmicos.

El aumento de la demanda de productos mínimamente procesados seguros y con altas cualidades nutricionales, ha llevado a desarrollar técnicas de procesamiento que reduzcan los tiempos de calentamiento, principalmente en productos líquidos con partículas, en las que los altos tiempos de calentamiento necesarios para alcanzar la seguridad microbiológica comprometen los beneficios atribuidos al envasado aséptico (Sasthy y Palaniappan, 1992). Un estudio realizado por Jamieson y Williamson (1999) concluyó que calentamiento óhmico, microondas y radiofrecuencia son las tecnologías más prometedoras para el electrocalentamiento a escala industrial.

El **calentamiento óhmico** consiste en pasar una corriente eléctrica directamente a través de un alimento conductor, la cual provoca la vibración de las moléculas del alimento que causa la fricción y disipación de energía en forma de calor. Con este método la distribución de calor en el producto es más rápida, lo cual proporciona mejores resultados en cuanto a la retención de sabor y a la integridad de las partículas comparado con los métodos convencionales (Skudder, 1993). Sin embargo, la eficiencia de este tipo de calentamiento es dependiente de la conductividad del alimento. La reformulación de productos para obtener una adecuada conductividad eléctrica ha limitado su aplicación industrial en el procesamiento aséptico (Sandeep, 1999).

El calentamiento por **radiofrecuencia** es una prometedora alternativa a los métodos convencionales de tratamiento térmico, debido al rápido calentamiento generado en el interior del producto, por el uso de ondas de radiofrecuencia, el cual reduce los tiempos de tratamiento y permite un calentamiento más uniforme (Mackenna, 2006). El calentamiento por radiofrecuencia es especialmente efectivo para el tratamiento de productos de gran diámetro, tales como carne, o de productos líquidos con partículas de gran tamaño.

El procesamiento de alimentos por **microondas** presenta varias ventajas con respecto a los tratamientos térmicos convencionales de pasteurización y esterilización de alimentos. El rápido calentamiento producido en el alimento por las microondas permite alcanzar elevadas temperaturas en cortos tiempos ya que evita la resistencia a la transferencia de calor producida por el envase del alimento, tal y como sucede en los tratamientos convencionales. Este hecho mejora la eficiencia del proceso, obteniéndose productos de mayor calidad. Para alimentos que contienen partículas de gran tamaño, los tratamientos convencionales de calentamiento provocan un sobreprocesado de la parte líquida del producto para asegurar la esterilización en el centro de la partícula. En estos casos también los tratamientos por microondas son una alternativa barata y rápida a los tratamientos convencionales para el tratamiento de productos particulados sin deteriorar su textura y calidad nutricional. Además de la rapidez de tratamiento, es una técnica fácil de usar y capaz de tratar el alimento envasado para evitar la recontaminación de productos. Estas ventajas hacen que esta tecnología sea una alternativa interesante a los métodos convencionales de procesamiento de alimentos.

Desafortunadamente, hay un número de factores específicos en microondas que pueden causar la no uniformidad del calentamiento, como por ejemplo, esquinas o bordes de calentamiento, distribución no homogénea del campo eléctrico, o variaciones en las propiedades dieléctricas en alimentos no homogéneos. Como consecuencia de estos factores la distribución del calor puede diferir de un producto a otro. Cuando estos factores son ignorados, la calidad y seguridad de los alimentos procesados por microondas puede verse comprometida (Mudgett, 1986). Esta es la principal razón por la que el procesamiento por microondas no ha sido adoptado de manera generalizada por la industria.

Por lo tanto, para el desarrollo de esta técnica, son esenciales métodos de control rápidos y seguros que permitan optimizar, controlar y diseñar un tratamiento térmico efectivo. Estos métodos deberían facilitar la localización de los puntos fríos y calientes, la naturaleza de su movilidad y repetibilidad y los perfiles de temperatura de los alimentos envasados, para asegurar la esterilidad y estabilidad del alimento y así disponer de un producto que se procesa rápidamente y que tendrá una calidad nutricional, sensorial e higiénica excelente (Bertrand, 2005). Determinar la distribución de temperatura en alimentos envasados procesados por microondas es todo un reto ya

que no se pueden predecir por los métodos convencionales, como por ejemplo la medida in situ mediante sondas de temperatura, debido a su interferencia con el proceso.

1.6. Evaluación de los procesos de esterilización en los alimentos.

Con el objetivo de garantizar la seguridad microbiológica de los alimentos conservados por el calor, es necesaria una estricta evaluación del proceso térmico. Esta evaluación conlleva la medida cuantitativa del impacto del proceso térmico en términos de seguridad (inactivación de microorganismos y análisis de riesgos) y de calidad (valor nutritivo y organoléptico), lo cual es de vital importancia en el diseño, optimización, validación y control del proceso.

1.6.1. Métodos de evaluación de tratamientos térmicos.

El impacto del tratamiento térmico puede ser estimado mediante medidas físicas, empleando sondas de temperatura situadas en determinados puntos del producto. Estas medidas proporcionan un perfil de tiempo – temperatura al que se somete el alimento. No obstante, las sondas se sitúan en puntos concretos del alimento, que no tienen porque ser reflejo de lo que ocurre en otros puntos del mismo. Además, no siempre es posible el registro de temperaturas, por ejemplo, en los sistemas de procesado en continuo.

Por todo ello se han desarrollado técnicas que permiten evaluar el impacto de los procesos térmicos en términos de seguridad microbiológica y calidad de los alimentos. Estas se pueden agrupar en: Método in situ, métodos físico-matemáticos e Integradores Tiempo-Temperatura (ITTs).

Tradicionalmente se han usado los dos primeros, como métodos más comunes de evaluación, mientras que más recientemente se están desarrollando métodos basados en los ITTs, para evitar las limitaciones y desventajas que las otras dos técnicas presentan dependiendo de la forma en la que el alimento es producido y térmicamente procesado (Van Loey y col., 1996).

1.6.1.1. Método “*in situ*”.

Este método está basado en la valoración de determinados índices de calidad y seguridad del alimento antes y después del tratamiento térmico. Algunos de los parámetros analizados han sido la pérdida de vitaminas (Mulley y col, 1975), la evaluación física del color y la apreciación sensorial del gusto y textura (Hayakawa y Timbers, 1977). La principal ventaja del método “*in situ*” que permite conocer directamente y con precisión el impacto del proceso en el parámetro de interés. Las desventajas de la utilización de esta técnica es que en algunos casos, la reducción de un atributo de calidad va más allá de los límites de detección de las técnicas analíticas utilizadas. El análisis del parámetro bajo investigación puede ser bastante laborioso, llevar mucho tiempo y ser caro, lo cual hace de esta técnica un método inviable de control rutinario (Van Loey y col., 1996).

1.6.1.2. Métodos físico-matemáticos.

Una alternativa al método “*in situ*” para la evaluación de los procesos térmicos ha sido durante los últimos años el desarrollo de métodos físico-matemáticos. En estos métodos, la evolución tiempo-temperatura del alimento se registra o se reconstruye mediante modelos matemáticos, que combinados con datos cinéticos permiten determinar el impacto térmico. Stoforos y Merson (1990) propusieron modelos matemáticos para el calentamiento de productos enlatados, que incluían piezas sólidas inmersas en un líquido de cobertura.

No siempre es posible el registro directo del perfil de tiempo-temperatura del producto bajo ciertas condiciones de procesado. Además para desarrollar estos modelos es necesario conocer las características físicas del alimento, como por ejemplo viscosidad y conductividad a altas temperaturas, coeficiente de transferencia de calor, distribución de tiempo de residencia, etc, que en ocasiones resultan difíciles de medir. También estos métodos necesitan ser validados microbiológicamente. Todo ello hace que los modelos matemáticos utilizados en los últimos años no siempre puedan predecir exactamente la evolución tiempo-temperatura en el interior del alimento, necesaria para establecer los tratamientos térmicos a los que va a ser sometido.

1.6.1.3. Integradores tiempo-temperatura.

Los integradores tiempo-temperatura son un método rápido, fácil y correcto para determinar el impacto del proceso sobre el producto sin la necesidad de conocer el historial tiempo-temperatura del proceso (Yingjie y col., 2003). Con el desarrollo de los Integradores Tiempo-Temperatura (ITTs) se intenta resolver las desventajas asociadas a las técnicas de evaluación hasta ahora utilizadas (método “*in situ*” y método físico-matemático).

Un ITT es un sistema que cuantifica el impacto producido por el calor en los alimentos, indicando así, el grado de esterilización alcanzado (Ocio y col, 1997). Es un pequeño artefacto constituido por una matriz o soporte portadora de un elemento sensor, el cual experimenta unos cambios irreversibles, precisos, fáciles de medir y dependientes del tiempo-temperatura de tratamiento a que se somete, imitando los cambios que experimenta un parámetro de calidad o seguridad de un alimento que está sometido a las mismas condiciones de esterilización o pasteurización (Weng y col., 1991). La principal ventaja de un integrador tiempo-temperatura es la posibilidad de cuantificar el impacto producido, sin necesidad de conocer la evolución tiempo-temperatura del alimento (Van Loey y col. 1999).

Todos los ITTs son por definición indicadores “*post factum*” del impacto de un proceso térmico, porque el cálculo del impacto del proceso está basado en el cambio de estatus del ITT después del tratamiento térmico, y la comparación con el estatus inicial. El tiempo posterior al procesado térmico necesario para calcular el impacto del proceso mediante un ITT, depende sobre todo de la naturaleza del sistema de control. Por ejemplo, los estudios microbiológicos consumen más tiempo (varios días), mientras que en general la evaluación de la actividad enzimática o la cuantificación de un compuesto químico son mucho más rápidas (algunos minutos).

De acuerdo con su definición, un ITT debe cumplir los siguientes requisitos en cuanto a estructura, comportamiento y uso:

- ✓ El integrador debe contener un elemento sensor calibrado y resistente al tratamiento térmico, y debe experimentar la misma evolución tiempo-temperatura que el alimento.

- ✓ El tamaño del integrador y su forma geométrica deben ser similares a las del alimento, con el elemento sensor distribuido homogéneamente en su interior.
- ✓ Debe retener adecuadamente al elemento sensor, de forma que no se produzcan pérdidas del mismo durante el proceso de esterilización.
- ✓ El integrador debe ser incorporado en el producto de manera que no distorsione el proceso, ni modifique el perfil tiempo-temperatura del alimento.
- ✓ El integrador debe ser barato, fácil y sencillo de preparar, y fácil de analizar y recuperar.
- ✓ El integrador debe ser estable y capaz de ser almacenado durante largos periodos de tiempo sin pérdida de funcionalidad.
- ✓ Debe tener suficiente resistencia física para soportar el proceso de calentamiento sin desintegrarse.

En función de la naturaleza del elemento sensor, los ITTs pueden ser de distintos tipos: sistemas químicos, sistemas físicos y sistemas biológicos. Los sistemas biológicos se dividen a su vez en sistemas microbiológicos, enzimáticos y no-enzimáticos.

En general, los ITTs se pueden introducir en un sistema-portador para localizarlos en una posición definida dentro del alimento o bien pueden estar dispersos por todo el alimento.

Cuando no existe un contacto físico entre el elemento sensor y el alimento, las cinéticas de este sensor se pueden determinar independientemente del tipo de alimento y naturaleza del medio que lo rodea. Cuando el elemento sensor está inmerso en una partícula, las propiedades termofísicas del sistema-portador, deberían ser iguales a las propiedades termofísicas del alimento para asegurar así que la transferencia de calor en el portador sea la misma que en el alimento y en este caso, las cinéticas del sensor se deben determinar en la propia partícula.

En el caso de que el elemento sensor esté disperso en el alimento, es necesario tener en cuenta el nuevo ambiente químico en el que está inmerso, por lo que se deben realizar estudios previos de calibración cinética.

1.6.1.3.1. Integradores tiempo-temperatura químicos.

Los ITTs químicos se basan en la detección de reacciones químicas para cuantificar el impacto de un proceso térmico. Por ejemplo, es posible comparar la disminución de esporos de *B. stearothermophilus* con la reducción de la concentración de metilmetionina sulfonada (MMS) (Berry y col, 1989). La principal ventaja de este tipo de ITTs son su fácil manejo y su alta precisión en el análisis del cambio de concentración del componente químico después del tratamiento.

Una desventaja asociada a los ITTs químicos, es el alto valor de z (20-50 °C) o los bajos valores de su energía de activación (E_a : 160-60 kJ/mol), que les hacen inadecuados para garantizar la seguridad microbiológica en el intervalo de temperaturas de esterilización (Swartzel y col., 1991).

1.6.1.3.2. Integradores tiempo-temperatura físicos.

Los ITTs físicos están basados en fenómenos de difusión. El sistema descrito por Witonsky (1977) consiste en una sustancia química coloreada que es capaz de difundir y ser absorbida en papel bajo el efecto de calor húmedo (vapor de agua). La respuesta del ITT se calcula midiendo la distancia a la que llega el compuesto difundido.

La principal desventaja de este sistema es que como es activado por vapor de agua, no se pueden usar en procesos térmicos donde se aplica calor seco, ni se pueden incluir dentro del producto.

1.6.1.3.3. Integradores tiempo-temperatura biológicos.

El tratamiento térmico puede producir cambios irreversibles en la estructura terciaria de las proteínas, que en el caso de las enzimas puede afectar a su actividad.

Basados en los métodos de detección para medir la actividad de proteínas se pueden establecer dos tipos de ITTs:

- *ITTs enzimáticos*, donde la actividad residual de la enzima es una respuesta directa de la proteína frente al impacto térmico. Los sistemas enzimáticos utilizan esta pérdida de actividad para medir el impacto de los procesos térmicos. Se han utilizado

proteínas con termoestabilidad en diferentes intervalos de temperatura y con diferentes energías de activación permitiendo así cubrir un amplio intervalo de seguridad y de atributos de calidad de los alimentos. De Cordt y col, (1992), propusieron el uso de la enzima amilasa de *Bacillus licheniformis* como ITT. Otros ITTs enzimáticos han sido desarrollados con los enzimas galactosidasa, lipasa, y nitrato reductasa inmovilizadas en alginato.

- *Métodos inmunoquímicos* basados en la interacción específica antígeno-anticuerpo. El tratamiento térmico de las proteínas puede afectar a los sitios de unión de forma que el anticuerpo no se una a la proteína. Brown (1991) estudió la inactivación del antígeno después del tratamiento térmico.

A pesar de que estos sistemas de proteínas pueden proporcionar medidas de detección rápidas y de bastante exactitud, presentan inconvenientes debido a que las enzimas se inactivan bastante antes de alcanzar la temperatura en los procesos HTST, por lo que es necesario aumentar su termoestabilidad para que funcionen correctamente a temperaturas elevadas.

La utilización de **ITTs microbiológicos** para el control de la eficacia del proceso de esterilización constituye uno de los principales objetivos de la industria alimentaria y farmacéutica.

La evaluación microbiológica de un proceso de conservación necesita el uso de un indicador que pueda ser procesado en el sistema y que evalúe la esterilidad alcanzada. La aplicación de indicadores microbiológicos para la evaluación de un proceso de esterilización de alimentos es una buena alternativa, ya que el nivel de inactivación del integrador microbiológico en el tratamiento térmico da una idea del nivel de esterilización alcanzado (Zechman, 1988). Las técnicas de validación microbiológica consisten en la evaluación del proceso térmico utilizando microorganismos seleccionados que se someten al proceso, se recuperan y se cuantifican. El integrador debe experimentar una evolución de temperatura similar a la que existe en el punto más frío del alimento real.

Existen diferentes formas de proceder para una validación microbiológica (Martínez y col, 2006).

Se pueden inyectar los esporos directamente en el seno del producto antes del calentamiento. Esta técnica consiste en inocular una cantidad conocida de esporos en la masa del producto antes de comenzar el proceso de esterilización. Presenta el inconveniente de que los esporos son difíciles de recuperar y cuantificar si el medio es líquido.

Los esporos en suspensión también se pueden inocular en un pequeño bulbo de vidrio. En este método se fija un bulbo pequeño de vidrio en el centro de una partícula del alimento y se somete a las condiciones del proceso. Esta técnica tiene como ventaja la facilidad para recuperar los esporos, pero no da resultados reales de resistencia térmica de las mismas ya que su entorno químico no es el del alimento.

Los esporos se pueden inmovilizar inyectándolos en el centro de una partícula del alimento. En el caso de alimentos particulados, la inoculación de los esporos se puede efectuar en el centro de las partículas del alimento. Esto permite mejorar el ajuste de las condiciones del proceso ya que la dinámica del movimiento de las partículas a través de los pasos de calentamiento y de mantenimiento en un proceso aséptico, es muy compleja. La partícula se recupera después del tratamiento térmico y se cuantifica la destrucción de esporos. En este caso, los esporos están en contacto con el entorno químico del alimento. Este método presenta algunos problemas, como por ejemplo poder recuperar los esporos resistentes después de que la partícula ha pasado por el proceso de calentamiento, mantenimiento y enfriamiento. Si la partícula del alimento después del calentamiento se rompe, los esporos se perderán, lo que produce errores en los valores de esterilización determinados para el proceso.

Por último los esporos se pueden inocular en partículas artificiales. Esta técnica consiste en inocular una cantidad conocida de esporos en una partícula de un material inerte al producto e incorporarlas al alimento antes de comenzar el proceso y, una vez finalizado, recuperarlas para cuantificar la destrucción térmica de los esporos. Estas partículas son las que realmente son consideradas ITTs microbiológicas.

Un ITT microbiológico consiste en un sistema inoculado con microorganismos, normalmente esporos bacterianos de concentración y termorresistencia conocida bajo las condiciones de esterilización que se pretenden validar. El nivel de inactivación del integrador microbiológico nos proporciona información sobre la magnitud del proceso térmico y por lo tanto, del nivel de esterilización alcanzado.

La selección de microorganismos que pueden ser usados como indicadores biológicos para tratamientos de esterilización depende de cuáles sean las aplicaciones específicas para las que se han diseñado. Generalmente, se utilizan las cepas de las especies más resistentes para la valoración de los procesos de esterilización, aunque en determinadas condiciones se pueden emplear microorganismos menos resistentes pero más parecidos a la microflora natural del producto o más fáciles de detectar.

Los valores z de los esporos utilizados para controlar la seguridad microbiológica de los alimentos de baja acidez son similares al valor de z de *Clostridium botulinum* ($z=10$ °C) que se usa como referencia en la esterilización de este tipo de productos. Para la validación de los procesos de pasteurización de alimentos ácidos se usan esporos con un valor de parámetro $z=8,62$ °C y una temperatura de referencia de 95°C (Gombas, 1983).

Existen diferentes tipos de geles que pueden ser utilizar como sistema portador, como geles de albumina (Fink y Cerny, 1988), carragenato (Godia y col., 1987), poliacrilamida (Röner, 1990). Sin embargo, los mas utilizados son los geles de alginato (Ocio, 1995). Estas partículas son suficientemente estables al calor y tienen la facilidad de que gelifican en presencia de calcio y luego se disuelven con ácido cítrico.

Dallyn y col. (1977) describieron un integrador que consistía en la inmovilización de esporos bacterianos en pequeñas bolitas de alginato. Este ITT tenía suficiente fuerza mecánica para ser utilizado en intercambiadores de calor de superficie rascada. Posteriormente, Bean y col. (1979b) inmovilizaron esporos de *Bacillus stearothermophilus* en perlas de alginato de 1,6 – 3,2 mm de diámetro y observaron que el tamaño de las bolitas era demasiado pequeño para evaluar procesos de esterilización de alimentos que contenían partículas grandes. Otras partículas de alginato con forma de cubo y más grandes (8-24 mm) fueron desarrolladas por Brown y col. (1984), quienes observaron discrepancias entre los valores de esterilización experimentales y los calculados mediante un modelo matemático de transferencia de temperatura. Otra aproximación fue realizada por Sastry y col., (1988), quienes desarrollaron un integrador inoculando esporos bacterianos inmovilizados en un gel de alginato que introducían dentro de champiñón. En este integrador se observó una falta de homogeneidad en la distribución de los esporos que dificultó la interpretación de los resultados y en algunos casos, el pie del champiñón se desprendía de la cabeza durante el proceso de calentamiento.

Otros problemas que presentan los ITTs desarrollados en una matriz de alginato son que las partículas no se pueden almacenar por mucho tiempo (Brown y col. 1984) y que los esporos pueden perderse por lixiviación en el calentamiento. Ocio (1995) desarrolló un ITT a base de alginato y puré de champiñón al cual agregó un 4% de almidón, observando que esto permitía la congelación de la partícula por largos periodos de tiempo y su descongelación posterior, manteniendo unas características similares a las que poseía la partícula que no contenía almidón y que había sido almacenada siete días en refrigeración. Posteriormente Rodrigo (1997) utilizó un integrador similar al desarrollado por Ocio (1995) para evaluar un proceso térmico a escala piloto. Este autor no encontró diferencias significativas entre los valores de letalidad experimentales y los calculados por un modelo matemático.

1.6.2. Evaluación de otros métodos de procesamiento de alimentos.

1.6.2.1. Microondas.

Existen métodos establecidos para la medida de la temperatura en microondas, tales como láminas de cristal líquido, papel térmico, sondas de fibra óptica, uso de sustancias modelo, termografía de infrarrojos (IR), radiometría microondas y uso de imágenes por resonancia magnética (MRI), pero desafortunadamente muchos de estos métodos tienen graves limitaciones (Knoerzer y col. 2005). Los ITTs son la forma más práctica de determinar la esterilidad y la distribución tiempo-temperatura de alimentos esterilizados por microondas (Holyoak y col, 1993; Kim y col, 1996; Prakash y col, 1997).

Yingjie y col. (2003) investigaron el uso de la peroxidasa como ITT para controlar el tratamiento térmico, y determinar el perfil tiempo-temperatura de partículas tratadas por microondas. Para ello la enzima fue inmovilizada en partículas cilíndricas de alginato (16 mm de largo, $L/D = 1:1$) y tratadas en un sistema microondas originalmente diseñado por Loh y Breene (1983), y modificado por Chen (1990). La potencia estudiada fue de 258 W y las partículas fueron tratadas de 15 a 85 con intervalos de 5 s, y después enfriadas rápidamente. El color desarrollado en la superficie de las partículas tenía diferente intensidad de color rojo dependiendo del tratamiento recibido, y fue medido con un sistema de detección del color, el cual fue calibrado con 16 niveles de concentración de enzima. Este sistema podía detectar la distribución de concentración

activa de encima y por lo tanto determinar la homogeneidad del calentamiento por microondas. El perfil tiempo-temperatura en el centro de la partícula fue medido por una sonda de fibra óptica. Las conclusiones obtenidas en este estudio fueron que el centro de las partículas sufría una temperatura mayor que la superficie, y se observaba una falta de uniformidad de tratamiento a través de los perfiles de temperatura calculados con las sondas.

Pandit y col. (2006) estudiaron la cinética de formación de un indicador químico M-2 (4-hidroxy-5-methyl-3(2H)-furano) en puré de patata, como herramienta para determinar la localización de los puntos fríos y calientes durante el tratamiento a alta temperatura y cortos tiempos por microondas. La formación de este indicador en puré de patata con 1,5% de D-ribosa fue determinada por cromatografía líquida y correspondía a una cinética de primer orden. La cinética de formación de este indicador no estaba influenciada por el tipo de patata, pero si por su contenido en sales.

1.6.2.2. Altas presiones.

Teniendo en cuenta las ventajas que el uso de ITTs presentan frente a los métodos *in situ* y físico matemáticos para evaluar el impacto del tratamiento térmico en alimentos, ha sido desarrollado el uso de pITTs (integradores presión-temperatura-tiempo), en similitud con los ITTs, para evaluar los procesos de altas presiones. (Bauer y Knorr, 2005; Claeys y col, 2003). Para un correcto uso de este tipo de indicadores, al igual que en indicadores para evaluar tratamientos térmicos, se requiere su completa caracterización cinética.

Son necesarios distintos pITTs para los diferentes procesos que se pueden dar en las altas presiones. Estos se pueden agrupar en procesos de pasteurización con altas presiones para los que la temperatura oscila entre 10 y 40°C y la presión entre 400 y 600 MPa y en procesos de esterilización con altas presiones donde la temperatura y las presiones aumentan por encima de los 60°C y de los 600 MPa respectivamente. Los pITTs deben mostrar sensibilidad a estas combinaciones de temperatura y presión.

Se han propuesto diversos sistemas para su aplicación como pITTs, tales como pITTs microbiológicos, enzimáticos, físicos e incluso químicos, si bien en estos últimos la anormal curva de presión frente a temperatura resulta un inconveniente.

Como **pITTs microbiológicos** se emplea un microorganismo como elemento sensor, el cual es necesario que este sea resistente a las presiones de proceso. Los esporos de *Clostridium botulinum* están entre los más resistentes a las altas presiones, pero es aconsejable el uso de microorganismos no patógenos para su utilización en alimentación. En este sentido *Clostridium sporogenes* y *Geobacillus stearothermophilus* son los microorganismos no patógenos utilizados en el diseño y validación de procesos térmicos de esterilización (Sebaihia y col 2007). Koutchma y col (2005) propusieron el uso de esporos de *Clostridium sporogenes*. Los valores D_T y z , obtenidos en condiciones isotérmicas e isobáricas, resultaron adecuados para la validación del proceso. Sin embargo este indicador biológico mostró una inadecuada inactivación para procesos, con tiempos 6 veces menores al valor D en determinadas condiciones de presión y temperatura. Patazca y col. (2006) determinaron que *G. stearothermophilus* tampoco es adecuado para ser utilizado como elemento sensor en pITTs.

En el caso de la pasteurización por altas presiones, *Listeria innocua* ha sido seleccionada como sustitutivo del microorganismo patógeno *L. monocytogenes* (Anonymous, 2000).

Se están llevando a cabo estudios sobre el comportamiento de enzimas intrínsecas y extrínsecas del alimento, como **pITTs enzimáticos** porque presentan una curva presión-temperatura similar a la de inactivación microbiana (Smeller, 2002). Claeys y col. (2003) han investigado el uso de la fosfatasa alcalina como sensor en la evaluación de los tratamientos por altas presiones de la leche, ya que su cinética de inactivación está completamente caracterizada, aunque se ha demostrado que no resulta adecuado para evaluar este tipo de tratamientos. Un dato a tener en cuenta en el uso de indicadores intrínsecos es que su cinética de inactivación depende de la composición del alimento. Por ejemplo la actividad de ALP depende del contenido en grasa, azúcar, etc. Sin embargo, estos parámetros no afectan a la cinética de inactivación cuando el procesado térmico se realiza a presión atmosférica.

Una alternativa al uso de indicadores intrínsecos es el uso de indicadores extrínsecos enzimáticos. Basándose en los magníficos resultados obtenidos para la α -amilasa como ITT Guiavarc'h y col. (2004) y Ludikhuyze y col. (1997), investigaron el adecuado uso de la α -amilasa *B.subtilis* para validar el impacto del tratamiento con altas presiones.

Los modelos cinéticos se determinaron bajo condiciones isobáricas e isotérmicas bajo ciclos dinámicos de presión simples y múltiples.

Denys y col. (2000), demostraron que aunque la inactivación de la lipoxigenasa de la soja es correctamente caracterizada bajo condiciones isotérmicas e isobaricas, los modelos cinéticos no pueden simular la inactivación bajo condiciones no isotérmicas o no isobáricas, lo que impide su aplicación como pITT.

Aunque hay cantidad de datos cinéticos disponibles sobre la sensibilidad de enzimas en el rango de presión-temperatura aplicados en pasteurización para el desarrollo de pITTs enzimáticos, es necesaria la investigación en la inactivación enzimática en el rango de presión y temperatura aplicados en la esterilización por altas presiones. Un posible punto de partida podría ser el uso de enzimas extremofílicas o extremo enzimas de origen microbiológico (Eichler, 2001).

Minerich y Labuza (2003) desarrollaron un sensor de presión, consistente en una pastilla de polvo de cobre, basándose en el hecho de que la densidad del polvo de cobre aumenta con la presión aplicada, por lo que la densidad de este sensor aumenta con la presión hidrostática aplicada, observándose una relación lineal entre el valor Heckel, calculado a partir de la densidad relativa, y una presión de 400 a 600 MPa. Además el aumento del tiempo de proceso produce un aumento en la densidad del polvo de cobre. Sin embargo, este sensor no permite distinguir entre procesos a distinta temperatura (7-24°C), lo que limita el uso de este sistema como pITT. Una observación realizada por este autor es que el sensor debe ir colocado en el jamón para dar una medida correcta, pues este sufre una presión de 9 MPa menos que la presión del agua.

Bauer y Knorr (2005) sugirieron un pITT elaborado a base de almidón gelatinizado. A diferencia del polvo de cobre cuya densidad aumenta con la presión, la gelatinización del almidón no es solo altamente sensible a los cambios de presión y tiempo de tratamiento, sino también a la temperatura. La resistencia a la presión depende principalmente del tipo de almidón, por lo que debe ser seleccionado en función de los requisitos específicos del proceso de presurización. Además el almidón puede ser encapsulado proporcionando una simple herramienta para evaluar las condiciones del procesado por altas presiones.

1.6.2.3. IV y V gama.

Un efectivo control de la cadena de frío en la producción, almacenamiento, distribución y consumo de productos que se comercializan congelados o refrigerados es imprescindible para asegurar la calidad y la seguridad alimentaria de estos productos (Tsironi y col., 2008). Frecuentemente desde la producción del alimento hasta su adquisición por parte del consumidor la cadena de frío se interrumpe en este último paso. Por lo tanto son especialmente necesarios sistemas para el control de la temperatura en este último eslabón de la cadena (Betts y Everis, 2000; Thomas, 2007).

Los integradores tiempo-temperatura (ITTs) proporcionan la posibilidad de continuar con el control del historial tiempo-temperatura a lo largo de toda la cadena de frío (Taoukis y Labuza, (1989). Estos indicadores permiten a productores y consumidores comprobar si productos perecederos han sido almacenados y abastecidos correctamente, y por tanto asegurar la confianza del consumidor y optimizar la vida útil del producto.

Estos ITTs son colocados en la superficie del envase del producto, integrando el historial tiempo-temperatura desde el momento de la activación del indicador. La integración del historial tiempo-temperatura es visualizada como un cambio de color que es función del tiempo y la temperatura. El cambio de color completo o punto final del indicador es alcanzado cuando este indicador junto con el envase, ha sido sujeto a un tiempo predefinido o superado una determinada temperatura (Fu y Labuza, 1995).

Existen varios sistemas de ITTs disponibles. El principio en el que se basan la mayoría de estos indicadores son reacciones enzimáticas, químicas, electroquímicas o microbiológicas cuya velocidad depende de la temperatura y como resultado se obtiene un cambio de color en la etiqueta (Labuza, 2000).

Fresh-Check por LifeLines Technology (USA) es un ITT basado en una reacción de polimerización de monómeros de diacetileno. Este ITT consiste en un adhesivo circular, en el que el centro se va oscureciendo más o menos rápido en función de la temperatura, sufriendo un cambio gradual de color que muestra la frescura del producto.

VITSAB es otro tipo de ITT cuyo cambio de color es causado por una bajada de pH, debido a una controlada hidrólisis enzimática de un sustrato lipídico. Antes de la activación del ITT, la lipasa y el sustrato lipídico están en compartimentos separados y

son mezclados rompiendo la barrera que los separa en el momento de la activación del ITT. La reacción enzimática causa un gradual cambio de color de amarillo oscuro a amarillo brillante.

OnVuTMc es otro tipo de ITT basado en una reacción fotocromática en estado sólido. Los pigmentos fotosensibles del agua de la tinta, como benzilpiridinas cambian de color, de incoloro a azul cuando son expuestos a luz ultravioleta, y de azul a incoloro con el calor. Cada ITT es diseñado para una determinada vida útil y unas condiciones de almacenamiento del producto óptimas. La duración de la decoloración de la etiqueta es proporcional a la cantidad de luz utilizada en el proceso de activación de los pigmentos fotosensibles y puede ser ajustada controlando la duración e intensidad de dicha luz. Debido a la posibilidad de determinar la vida útil del ITT usando diferente tiempos de carga, las etiquetas pueden ser adaptadas de una manera muy flexible a la vida útil del producto. Por lo tanto una sola etiqueta podrá ser utilizada para diferentes productos modificando únicamente el tiempo de carga (Kreyenschmidt y col, 2009).

Para el buen desarrollo de este tipo de ITTs es necesario un completo estudio cinético de la respuesta del ITT, basado en modelos fiables de vida útil y cinéticos tanto del producto como del ITT, para poder monitorizar el efecto integral de la temperatura y cuantitativamente trasladarlo a la calidad del alimento y de la producción al punto de consumo (Taoukis y Labuza, 1989; Taoukis, 2001).

Han sido utilizados diferentes modelos para analizar la utilidad de este tipo de ITT como etiqueta de calidad. Taoukis y Labuza (1989), desarrollaron el más comúnmente utilizado, basado en la ecuación de Arrhenius. Este modelo muestra la correlación entre la dependencia de la temperatura y la velocidad de deterioro microbiano de la calidad del producto y la dependencia de la temperatura con el cambio de color del ITT.

Smolander y col, (2004), correlacionaron la velocidad de cambio de color del ITT con el recuento microbiológico del alimento. Además estos autores compararon la vida útil del ITT con la del producto para evaluar la utilización del ITT para monitorizar la frescura del alimento.

1.6.3. Validación física y biológica de los tratamientos térmicos.

La letalidad de un tratamiento térmico se puede determinar por medio del historial tiempo-temperatura del alimento y a través de los distintos métodos de evaluación

descritos en el apartado 1.6.1. Cuando el método de evaluación consiste en un integrador tiempo-temperatura microbiológico, (apartado 1.6.1.3.3), las medidas obtenidas con este ITT permiten calcular el denominado factor de esterilización biológico (F.BIO). Dicho valor se calcula a partir de las determinaciones del valor inicial (X_0) y final (X) del atributo elegido. Suponiendo una cinética de reacción de primer orden en el atributo de interés, el impacto del tratamiento térmico se puede expresar como (ecuación 1.11, Stumbo, 1965).

$$F_{T_{ref}}^z = D_{T_{ref}} (\log X_0 - X) \quad (\text{Ec. 1.11})$$

Donde $F_{T_{ref}}^z$ es el tiempo de tratamiento a la temperatura de referencia (T_{ref}) necesario para llevar el atributo de interés desde su valor inicial (X_0), hasta su valor final (X) y $D_{T_{ref}}$ es el tiempo de reducción decimal del atributo X a la temperatura de referencia.

En esta ecuación, el superíndice z hace referencia al valor z del atributo en cuestión. Cuando el atributo empleado es el número de microorganismos, el valor $F_{T_{ref}}^z$ es el valor de esterilización biológico (F. BIO).

Recientemente, Mafart y col. (2002) han extendido el cálculo del valor $F_{T_{ref}}^z$ incluso a cinéticas de inactivación microbianas no logarítmicas, como las que se pueden describir mediante la función de supervivencia de la distribución de Weibull. En ese caso el valor $F_{T_{ref}}^z$ se puede calcular a partir de la ecuación 1.12.

$$F_{T_{ref}}^z = \delta (\log X_0 - X)^{1/p} \quad (\text{Ec. 1.12})$$

Donde δ y p son los parámetros de escala y de forma respectivamente de la distribución de Weibull.

Independientemente del atributo elegido y de que su cinética sea logarítmica o se ajuste a la distribución de Weibull, el valor $F_{T_{ref}}^z$ es el equivalente en minutos de tratamiento a una temperatura de referencia constante de todo el tratamiento al que ha sido sometido el ITT. Así pues se tiene que seleccionar previamente una temperatura de referencia, a la que será convertido cualquier tratamiento, para poder conocer su intensidad a la misma temperatura durante diferenciales de tiempo y el cálculo equivalente letal del tratamiento completo, es decir, el cálculo del factor de esterilización físico ζ (F. PHY) se realiza mediante la ecuación 1.13.

$$F_{T_{ref}}^z = \int_0^t L_T \times dt = \int_0^t 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}} \times dt \quad (\text{Ec. 1.13})$$

Aunque F.PHY y F.BIO deberían ser iguales para el mismo tratamiento térmico, varios estudios muestran diferentes valores entre ambos (Michiels, 1972; Berry y Bradshaw, 1986). Existen diversas razones que explican estas diferencias. Los valores del F.BIO pueden ser erróneos debido a un incorrecto uso del ITT, el cual depende del sistema biológico y del proceso analítico. Los errores en la determinación de los valores del F.PHY pueden ser debidos a la incorrecta determinación de los parámetros requeridos.

En alimentos enlatados, las posibles diferencias entre F.PHY y F.BIO pueden ser debidas a que el lugar donde está colocada la sonda de medición de temperatura del producto y el lugar donde está el integrador no son el mismo. Por lo tanto están sujetos a diferentes variaciones de temperatura durante el calentamiento y el enfriamiento del producto. También puede ocurrir que la cinética de destrucción microbiana pueda ser inexacta para predicciones en sistemas más complejos, donde la temperatura varía a lo largo del proceso y pueden darse fenómenos de adaptación al calor u otros más complejos. No obstante, en experimentos realizados se muestra una buena correlación entre F.PHY y F.BIO, (Martínez et al., 2006). Conesa y col. (2009) también han encontrado una buena correlación entre F.PHY y F.BIO para microorganismos esporulados, independientemente de la velocidad de calentamiento y enfriamiento. Sin embargo la bondad de la correlación dependía de la velocidad de calentamiento y enfriamiento en el caso de las células vegetativas.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Actualmente el tratamiento térmico de alimentos es aún el método más utilizado para la conservación de los mismos. La esterilización de un alimento por calor persigue su estabilidad, no su esterilidad absoluta, no sólo por razones económicas, sino también por la excesiva degradación que experimentaría la calidad organoléptica y nutricional del producto.

En los últimos años, la demanda del consumidor de productos con mejores características nutricionales y organolépticas ha hecho que la tecnología de los alimentos se vea en la necesidad de estudiar nuevas formas de ofrecer productos con las características que se demandan y optimizar los procesos ya existentes, cumpliendo además con las medidas en cuanto a seguridad alimentaria se refiere, para no poner en riesgo la salud del consumidor.

En lo relativo a la optimización de los procesos ya existentes, la cuantificación del impacto del tratamiento térmico que ha recibido un alimento en términos de seguridad y

calidad es esencial. A esta cuantificación del tratamiento térmico se le llama validación del proceso, y consiste en evaluar si el tratamiento térmico ha sido aplicado correctamente mediante métodos que permitan obtener datos cuantitativos en relación a su intensidad.

Actualmente se utilizan dos métodos para evaluar el impacto del tratamiento térmico, el método *in situ*, que consiste en la evaluación de uno o varios índices de calidad y seguridad del alimento antes y después del tratamiento térmico, y los métodos físico-matemáticos, los cuales determinan la evolución tiempo-temperatura del alimento. Mientras que el primer método consume tiempo y está limitado por los problemas de límites de detección, el segundo método requiere el registro de la temperatura de proceso, lo cual es a veces difícil y otras imposible. Para superar estas limitaciones son numerosos los autores que proponen como alternativa a estos dos métodos, el uso de integradores tiempo-temperatura (ITTs) como método rápido, fácil y correcto para evaluar el impacto del tratamiento térmico.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en la presente Tesis Doctoral se plantea como objetivo final el desarrollo de una metodología de validación biológica del tratamiento térmico de alimentos, basada en el empleo de ITTs, que sea aplicable a equipos industriales.

Para la realización de este objetivo se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Selección de los microorganismos adecuados para la fabricación de ITTs que serán utilizados en la validación biológica del procesado térmico de alimentos ácidos y de baja acidez.
- Estudio de la termorresistencia de los microorganismos seleccionados, en un termorresistómetro, en las condiciones habituales de procesado de alimentos.
- Validación física de los tratamientos térmicos industriales aplicados a un alimento ácido y otro de baja acidez en un reactor prototipo mediante el uso de termopares.
- Validación biológica de estos tratamientos mediante el uso de los integradores tiempo-temperatura y comparación de los resultados con los obtenidos en un termorresistómetro.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos.

A lo largo de esta investigación se utilizaron los siguientes microorganismos:

- *Alicyclobacillus acidoterrestris* cepa DSM 3922, suministrada por la colección alemana de cultivos tipo (DSMZ).
- *Bacillus subtilis* cepa CECT 4522, suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).
- *Bacillus licheniformis* cepa CECT 4523, suministrada por la CECT.
- *Bacillus megaterium* cepa CECT 4313, que es la cepa tipo de esta especie, suministrada por la CECT.
- *Bacillus atrophaeus* cepa CECT 4071, suministrada por la CECT.

– *Bacillus subtilis* cepa AdHC1, suministrada por la colección de cultivos de Unilever Research Vlaardingen.

–*Bacillus sporothermodurans* cepa IC4, suministrada por la colección de cultivos de Unilever Research Vlaardingen. Zuijlen

3.2. Elaboración de suspensiones de esporos.

El medio de esporulación utilizado para *A. acidoterrestris* fue agar patata dextrosa (PDA; Scharlau Chemie, Barcelona, España). *Bacillus sporothermodurans* se esporuló en agar de esporulación de Campden (CSA; Brown y col., 1984) que contiene, por litro, 28 g de agar nutritivo (Scharlau Chemie), 0,1 g de MnSO_4 (Panreac, Barcelona, España), 0,056 g de CaCl_2 (Panreac) y 3 g de agar (Scharlau Chemie). Todos los demás microorganismos fueron esporulados en agar PCA (Scharlau Chemie), excepto *B. megaterium* que fue esporulado además de en PCA, en agar nutritivo fortificado (ANF) (agar nutritivo 28 g/L, agar 3 g/L, MnSO_4 0,1 g/L, CaCl_2 0,056 g/L) para ver la influencia del medio de cultivo en la termorresistencia.

Cada placa Petri fue inoculada con 0,2 mL de un cultivo incubado durante 24 horas a 37°C en caldo nutritivo, excepto *B. sporothermodurans* que se incubó en una disolución de NaCl (Panreac) al 0,85% y *A. acidoterrestris* que fue incubado en medio de crecimiento de *Alicyclobacillus acidocaldarius* (AAM) de pH 5, que contiene, por litro, 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Panreac), 0,5 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Iberlab, Cartagena, España), 0,25 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac), 0,6 g de KH_2PO_4 (Panreac), 1 g de extracto de levadura (Scharlau Chemie) y 1 g de glucosa (Panreac). Estas placas se incubaron durante al menos 5 días a 37 °C hasta asegurar, mediante microscopía de contraste de fases (Leica DM LS, Wetzlar, Alemania), una tasa de esporulación de, al menos, el 80%. Además *B. megaterium* fue incubado a 48 °C para analizar la influencia de la temperatura de esporulación en la termorresistencia.

Los esporos se recogieron de las placas mediante arrastre, con una varilla estéril, con agua destilada. Después de la recogida, la suspensión se centrifugó 3 veces durante 15 min (cada una de ellas) a 4400 g, en una centrifuga (Heraeus Instruments, Hanau, Alemania), y se resuspendió en tampón McIlvaine estéril de pH 7.

La concentración final de esporos se evaluó por observación al microscopio (Leica DM LS) y usando una cámara de Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania), y se ajustó a 10^9 esporos/mL excepto en el caso de *B. sporothermodurans* que se ajustó a 10^7 esporos/mL. Tras esto los esporos se mantuvieron entre 0 y 5°C excepto los esporos de *B. sporothermodurans* que se mantuvieron en congelación, hasta su uso, ya que estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la congelación de los esporos no afecta a su termorresistencia.

3.3. Mineralización de *Bacillus megaterium* con manganeso y con calcio.

La mineralización con manganeso y con calcio se realizó centrifugando la suspensión de esporos y resuspendiéndola en una solución 0,5 M de sulfato de manganeso y una solución 0,5 M de cloruro de calcio respectivamente y ajustando en ambos casos a pH 8 con hidróxido sódico (Panreac). Estas suspensiones se incuban durante 72 horas a 37°C para conseguir la mineralización de los esporos (Marquis y col, 1981).

3.4. El termorresistómetro mastía.

Las determinaciones de termorresistencia fueron llevadas a cabo en un termorresistómetro Mastía (Conesa y col, 2009), cuyo esquema se muestra en la Figura 3.1. Este termorresistómetro es una modificación del termorresistómetro TR-SC (Condón y col., 1993). Posee un autómata programable (B), conectado a la resistencia de 2 kW (2) y al sistema de enfriamiento, consistente en un serpentín (1) por el que circula agua procedente de un baño de agua refrigerada, para controlar la temperatura dentro del vaso principal.

El autómata se programa desde una pantalla táctil (C), permitiendo de esta manera la comunicación del propio autómata con el ordenador (D) provisto de software adecuado que permite programar y registrar perfiles de temperatura.

El vaso de calentamiento (E) es de acero inoxidable y tiene un diámetro exterior de 8.5x12 cm. Este vaso está cerrado por una tapa provista de una junta tórica (F),

atravesada por un eje de agitación, provisto con una hélice (3) y 8 puertos con cierres roscados para: la fuente de presión (N_2) (G); la inyección del inóculo a través de un septo de cromatografía; el tubo de recogida de muestra (4); un termopar (5) para monitorizar la temperatura durante el tratamiento; dos puertos para los brazos de la resistencia (2) y otros dos para los brazos del serpentín de refrigeración (1). Dentro del vaso se encuentra una pantalla deflectora para mejorar la turbulencia.

El vaso principal se encuentra presurizado a través de un manómetro (6) conectado con la fuente de presión (G) que permite la extracción de muestras cuando la presión es muy baja (temperaturas inferiores a $100^{\circ}C$) o cuando el medio es demasiado viscoso. Para vencer la presión cuando los microorganismos son inyectados en el vaso, se utiliza una jeringuilla Hamilton (H). El eje de agitación está accionado por un motor (I), conectado con el autómata (B). El control de la temperatura en el interior del vaso es realizado por el autómata, mediante el PID (Proporcional Integral Derivativo) (J) conectado a la resistencia (2), a una válvula solenoide (8) que regula el flujo de agua a través del serpentín de refrigeración (1), y a la Pt100 (5). Cuando el PID detecta que la temperatura es inferior a la seleccionada el autómata activa la resistencia (2); cuando la temperatura supera a la programada, el autómata actúa sobre la válvula solenoide (8) activando el serpentín (1) para controlar el flujo de agua fría.

Figura 3.1. Diagrama de un termoresistómetro Mastía. (A) Agua de enfriamiento. (B) Autómata programable. (C) Pantalla táctil. (D) Ordenador. (E) Vaso principal. (F) Tapa. (G) Fuente de presión (N_2). (H) Jeringuilla Hamilton. (I) Motor de agitación. (J) PID. (1) Serpentín de refrigeración; (2) Resistencia; (3) Hélice; (4) Tubo de extracción de muestra; (5) Pt100; (6) Manómetro; (7) Válvula solenoide (8) Válvula solenoide del sistema de enfriamiento.

El termorresistómetro puede ser programado para trabajar en modo isotérmico, en modo no isotérmico con incrementos o descensos regulares de la temperatura e incluso en modos más complejos, simulando tratamientos industriales y combinando fases de calentamiento, mantenimiento y enfriamiento.

3.5. Determinaciones de termorresistencia de microorganismos en el termorresistómetro.

En modo isotérmico, una vez el vaso estaba lleno con el medio de calentamiento y la temperatura de tratamiento estabilizada, se inoculaban 0,2 mL de la suspensión de microorganismos y se recogían las muestras en tubos estériles a los tiempos previamente determinados. Cada muestra era inmediatamente enfriada y procesada, realizándose las diluciones apropiadas en agua de peptona tamponada (APT; Scharlau Chemie), a partir de las cuales se sembraron placas Petri del medio de cultivo adecuado para cada microorganismo y se incubaron las temperaturas y tiempos correspondientes.

Como medio de calentamiento se usó tampón McIlvaine de pH 3,5 y zumo de mandarina (Don Simón, Huelva, España), de pH 3,5 para la determinación de la resistencia de microorganismos en medio ácido, mientras que para la determinación de la termorresistencia en medio de baja acidez se utilizó tampón McIlvaine de pH 7 y una disolución de almidón (Colflo 67, National Starch, Manchester, Inglaterra) de pH 6,7 al 3,5%.

Para el estudio de la termorresistencia de *A. acidoterrestris* bajo condiciones no isotermicas, el termorresistómetro se programó simulando el tratamiento térmico industrial aplicado a las vesículas de mandarina en el reactor prototipo. El perfil de temperatura consistió en un calentamiento a 27,5°C/min desde 30°C hasta 90°C, seguido de otro a 9°C/min de 90°C hasta 93°C, una etapa de mantenimiento durante 2 min a 93°C y un enfriamiento a 10°C/min de 93°C a 63°C seguido de otro a 5°C/min de 63°C a 40°C.

Para el estudio de la termorresistencia de *B. sporothermodurans* bajo condiciones no isotérmicas, el termorresistómetro se programó simulando el tratamiento térmico industrial aplicado a una crema de verduras. Este perfil de temperaturas consistió en un calentamiento a 11,5°C/min desde 30°C hasta 120°C, seguido de otro a 3°C/min de

120°C a 121°C, un mantenimiento durante 4 min a 121°C y un enfriamiento a 6,6°C/min de 121°C a 70°C seguido de otro a 5,5°C/min de 70°C a 40°C.

En modo no isotérmico una vez estabilizada la temperatura inicial, se inoculaban 0,2 mL de la suspensión de microorganismos y se recogían las muestras en tubos estériles a determinados tiempos y temperaturas. Las muestras se procesaban tal y como se ha descrito en modo isotérmico.

3.6. Recuento de supervivientes.

El recuento de formas viables se realizó a partir de placas sembradas por duplicado en PCA, excepto para *A. acidoterrestris* que fue sembrado en PDA y *B. sporothermodurans* que fue sembrado en agar infusión de cerebro y corazón (BHIA; Scharlau Chemie), de cada una de las diluciones adecuadas en APT. Las placas se incubaron durante 24h a 37°C para todos los microorganismos, excepto *B. sporothermodurans* que fue incubado durante 48h a 37°C.

3.7. Reactor prototipo para la industria alimentaria.

El T-sensation® diseñado por HRS Spiratube, S.L (Murcia, España) es un reactor que permite pasteurizar o esterilizar diferentes productos y, conectado a una llenadora aséptica, puede llenar bolsas asépticas en caliente o refrigerado.

Este reactor de 40 L de capacidad (figura 3.2) es un intercambiador de calor de superficie rascada con un área muy grande de intercambio, lo cual permite someter al producto a elevadas temperaturas durante un periodo de tiempo corto. De esta forma se puede optimizar el tratamiento térmico, asegurando que se obtienen todos los efectos deseados de éste, a la vez que se minimizan los efectos indeseables (pérdidas de propiedades organolépticas y/o nutritivas). La gran área de intercambio de calor se consigue gracias a que el interior del reactor se encuentra compartimentado mediante la inclusión de paredes acondicionadas térmicamente (1; fig. 3.2B) que se disponen huecas para que por su interior discurra el fluido de servicio, el cual transmite calor o frío hacia el interior del reactor. Además dispone de un encamisado (2; fig. 3.2D) por el que también circula el fluido de servicio. En el calentamiento el fluido de servicio es vapor o

agua sobrecalentada, según el modelo, y en el enfriamiento agua procedente de una torre de refrigeración. El reactor puede ser presurizado hasta 200 kPa, permitiendo el calentamiento del producto por encima de 100°C, y dispone de un manómetro para el control de la presión en su interior. Entre las paredes se sitúan las palas rotatorias (3; fig. 3.2A) que recogen el producto desde la parte inferior de la carcasa y lo llevan, arrastrándolo entre las dos paredes, provocando el calentamiento o enfriamiento del producto, según va entrando en contacto con las paredes. Para evitar que ese producto quede pegado a las paredes, las palas rozan constantemente con las paredes acondicionadas térmicamente, mediante un sistema de dispositivos rascadores sujetos al brazo central de cada pala a través de soportes.

Exteriormente se encuentra el motor reductor (4), a cuya salida se sitúa el eje (5) que discurre a lo largo del reactor y que será el portador de las palas rotatorias que mezclan el producto. Este motor lleva un variador de frecuencia que permita controlar la velocidad de giro del eje y por tanto de las palas. La entrada y salida de producto están colocadas en la pared superior e inferior de la máquina respectivamente (figura 3.2C).

Este reactor prototipo puede utilizar vapor o agua sobrecalentada, según el modelo, como medio transmisor de calor. En este estudio se han utilizado ambos modelos, por lo que llamaremos reactor vapor al que utiliza vapor como fluido de calentamiento y reactor agua al que utiliza agua sobrecalentada como fluido calefactor. En el reactor vapor, la línea de vapor dispone de un filtro de vapor, una válvula de interrupción manual, una válvula manoreductora y un manómetro de vapor. Asimismo, para evitar que haya vapor en la línea de condensados, existe un purgador tipo boya. El reactor agua dispone de un circuito de agua cerrado que se calienta y enfría por medio de un intercambiador de calor de placas en contracorriente. Como fluido calefactor de este intercambiador se utiliza vapor sobresaturado y como fluido refrigerante agua de torre de enfriamiento.

El equipo dispone de un registrador de temperatura (Endress & Hauser, Barcelona, España) conectado a dos sondas de temperatura, situadas una en la pared delantera y otra en la pared trasera del equipo, las cuales registran la temperatura durante todo el proceso. Estas sondas no se encuentran en contacto con el alimento.

El tratamiento del producto en un proceso en discontinuo. Este consiste en:

- Introducir el producto en el interior del recinto cerrado del reactor.

- Girar continuamente el eje portador de las palas.
- Calentar el producto hasta la temperatura deseada, mantenerlo a esa temperatura el tiempo establecido y enfriarlo.
- Para retirar el producto, se abre la válvula de salida y el producto sale por gravedad.

Figura 3.2. Reactor T-sensation. A. Agitador-rascador. B. Sección de las paredes acondicionadas térmicamente. C. Montaje del cuerpo. D. Sección del equipo. 1. Paredes internas, acondicionadas térmicamente; 2. Encamisado externo; 3. Palas rotatorias; 4. Motor reductor; 5. Eje.

3.8. Elaboración de integradores tiempo-temperatura.

Los integradores se elaboraron a base de alginato hidratado como soporte, según la metodología descrita por Ocio y col. (1997). Se realizó una mezcla de alginato (2%; Safoni Bio-industries, Barcelona, España) con agua destilada (24% del volumen total) para rehidratar el alginato, y se mantuvo durante un tiempo de 12 a 16 horas en refrigeración. Pasado este tiempo, la mezcla fue esterilizada en el autoclave a 121°C durante 20 minutos. Una vez fría y bajo condiciones de esterilidad, en la cabina de seguridad biológica (Telstar Bio-II-A, Terrasa, España), la mezcla se agita con un aspa estéril durante 10-20 min mediante un agitador de hélice (RW 20 Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, Alemania). Posteriormente se le añadió un 1% de suspensión de esporos de *A. acidoterrestris* (10^9 UFC/mL) a la mezcla y un 72,6% de agua destilada estéril, en el caso de la elaboración de ITTs de *A. acidoterrestris*, y un 3,3% de suspensión de esporos de *B. sporothermodurans* (10^7 UFC/mL) y un 70,7% de agua destilada estéril, en el caso de la elaboración de ITTs de *B. sporothermodurans*. Una vez añadida la suspensión del microorganismo, se añadía un 0,4% de polvo de carbón estéril para dar color negro a las partículas y se agitaba vigorosamente durante 20-30 min. En experimentos previos se había demostrado que el polvo de carbón estéril no afectaba a la viabilidad ni a la germinación de los esporos bacterianos.

La mezcla bien homogenizada se dejaba caer, gota a gota con la ayuda de una jeringuilla estéril, sobre una disolución estéril de cloruro cálcico (Panreac) al 2%, formándose así partículas esféricas de aproximadamente 3 mm que, al contacto con el calcio, se endurecían. Después de 2 h los ITTs fueron transferidos a botes de cristal que también contenían una disolución estéril de cloruro cálcico al 2%, y fueron almacenados a 4°C hasta su utilización.

Mediante recuento, se determinó el número medio de esporos en los integradores. Para los integradores inoculados con esporos de *A. acidoterrestris* el número medio en cada ITT fue de $4,6 \times 10^4$. Para los integradores inoculados con esporos de *B. sporothermodurans* el número medio fue de $2,7 \times 10^3$.

3.9. Validación con integradores tiempo-temperatura a escala laboratorio.

La validación con ITTs a escala laboratorio fue realizada usando el termorresistómetro Mastia anteriormente descrito. Para esta validación se llenó el vaso del termorresistómetro con 350 mL del medio de calentamiento y se introdujeron los ITTs que contenían los microorganismos. El vaso se cerraba y presurizaba. Posteriormente se programaba el termorresistómetro con el perfil de temperatura correspondiente, anteriormente descrito, simulando el tratamiento térmico industrial aplicado al producto en cuestión.

En el caso de la validación en un alimento ácido, el medio de calentamiento utilizado fue zumo de mandarina y en el caso de la validación en un alimento de baja acidez el medio de calentamiento fue una disolución de almidón al 3,5%.

3.10. Validación con integradores tiempo-temperatura a escala planta piloto.

Antes de introducir los integradores con esporos en el reactor, se probaron integradores sin inocular para observar el comportamiento de los mismos en el equipo con los dos productos, vesículas de mandarina y almidón, con el fin de realizar un protocolo de trabajo adecuado. Estos integradores fueron elaborados tal y como se ha descrito en el apartado 3.8, pero sin añadir microorganismos. Se estudió la forma más conveniente de introducir los ITTs y recogerlos para evitar su contaminación con otros microorganismos, su distribución por el equipo y otros parámetros de proceso como los perfiles de temperatura del equipo aplicados a cada alimento y la velocidad de agitación.

3.10.1. Características de la prueba con vesículas de mandarina.

Para la validación del equipo con un alimento ácido, como son las vesículas de mandarina (pH 3,5), se llenaba el equipo con 30 kg de producto, se introducían los ITTs distribuidos en los espacios entre las paredes térmicas, se ponía en marcha el agitador con una velocidad suave, 13 rpm, para homogenizar la mezcla pero no romper la

estructura de las vesículas ni de los integradores, y se cerraba el equipo. A continuación se abría la válvula del vapor para dar comienzo al calentamiento y, una vez alcanzados los 93°C, se mantenía la temperatura durante 2 min y se procedía al enfriamiento hasta 40°C. Una vez frío, el producto se descargaba y se examinaban pequeñas cantidades de producto, recogiendo los ITTs con unas pinzas estériles y depositándolos en una placa Petri.

3.10.2. Características de la prueba con almidón.

Para la validación del equipo con un alimento de baja acidez se utilizó un simulador de crema de verduras, consistente en una disolución de almidón (3%) con un pH de 6,7 (García, 2006), al que se aplicó un tratamiento térmico de esterilización de alimentos de baja acidez de 4 minutos a 121°C tal y como recomienda la Food and Drug Administration.

Para realizar la validación, el equipo se llenaba y se cerraba de igual forma como se ha descrito en el apartado anterior. En este caso el control de la temperatura se realizó en función de la presión alcanzada en el interior del equipo, de modo que se asegura una temperatura de 120°C cuando la presión en el interior del reactor es de 100 kPa y de 121°C con una presión interior de 105 kPa. Una vez alcanzada la presión correspondiente se mantenía durante 4 minutos y, transcurrido este tiempo, se procedía al enfriamiento del producto hasta 40°C. Una vez frío, el producto se descargaba y se hacía pasar por un tamiz para la recuperación de los ITTs, los cuales se recogían con unas pinzas estériles y se depositaban en una placa Petri para el posterior cálculo del número de microorganismos supervivientes.

3.11. Cálculo del número de microorganismos supervivientes.

Una vez finalizado el proceso de validación, tanto en el termorresistómetro como en el reactor prototipo, los ITTs depositados en placas Petri, eran llevados a tubos estériles que contenían 1 mL de citrato sodico al 2% (Panreac) y disueltos por agitación a 2500 rpm (IKA® Werke VX2 Taquara, Brasil). A continuación se realizaban las diluciones adecuadas y se sembraban en placas utilizando como medio de cultivo PDA en el caso

de los ITTs que contenían *A. acidoterrestris* y BHIA en el caso de los que contenían *B. sporothermodurans*. Los recuentos se realizaron tras incubación a 37°C durante 24h en el caso de *A. acidoterrestris* y 48h en el caso de *B. sporothermodurans*.

3.12. Análisis de datos.

3.12.1. Cálculo de los valores D y z en condiciones isotérmicas.

Los microorganismos investigados mostraron, a excepción de *B. sporothermodurans*, cinéticas logarítmicas de destrucción cuando fueron sometidos a condiciones isotérmicas de tratamiento. En estos casos se empleó el clásico modelo lineal (Bigelow, 1921) para calcular los tiempos de reducción decimal (valores D_T) como la inversa negativa de la pendiente de la línea de regresión lineal obtenida a partir de los valores de la porción recta de la curva de supervivencia. Sólo se ha trabajado con curvas de supervivencia en las que hubiese al menos una disminución de un ciclo logarítmico y con al menos 4 puntos en la parte que se ajustaba a una cinética de primer orden.

Los valores z se calcularon como la inversa negativa de la regresión lineal resultante de enfrentar los valores del logaritmo de D_T frente a las correspondientes temperaturas de tratamiento (curvas de termodestrucción o TDT). La dependencia de los valores D_T con la temperatura puede ser descrita matemáticamente mediante la ecuación 3.1.

$$D_T = \frac{D_{T_{ref}}}{10^{\left(\frac{T-T_{ref}}{z}\right)}} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

donde D_T (min) es el valor D a la temperatura T (°C), $D_{T_{ref}}$ (min) el valor D a la temperatura T_{ref} (°C) y z (°C) representa el valor z del microorganismo.

3.12.2. Modelo de Weibull.

Las gráficas de supervivencia de *B. sporothermodurans* mostraron desviaciones de la linealidad en forma de hombro de manera consistente. Este efecto, observado ya con anterioridad por otros autores (van Zuijlen y col, 2010), había llevado a dichos autores a

aplicar, con éxito, los modelos de Geeraerd y de Weibull como alternativas a la tradicional cinética de primer orden. En esta investigación también se aplicaron estos mismos modelos no lineales para ajustar las gráficas de supervivencia de este microorganismo, en lugar de la cinética logarítmica.

Se empleó la ecuación propuesta por Mafart y col. (2002) de la función de supervivencia de la distribución de frecuencias de Weibull (ecuación 1.9), reproducida aquí para facilitar la lectura de este capítulo). Los parámetros del modelo fueron estimados con la herramienta Solver de Excel (Microsoft).

$$\text{Log}_{10}S = -\left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (\text{Ec. 1.9})$$

Siguiendo el modelo descrito por Couvert y col. (2005) se empleó un mismo valor del parámetro p para ajustar todas las gráficas de supervivencia que se realizaron de *B. sporothermodurans* en el mismo medio de calentamiento.

Al igual que los valores D convencionales, la dependencia de los valores δ con la temperatura también puede ser descrita con el modelo clásico de Bigelow tal y como se expresa en la ecuación 3.2 (Mafart y col., 2002).

$$\delta_T = \frac{\delta_{\text{ref}}}{10^{\left(\frac{T-T_{\text{ref}}}{z}\right)}} \quad (\text{Ec. 3.2})$$

donde los parámetros T_{ref} (°C) y z (°C) tienen el mismo significado que en la ecuación 3.1 y δ_{ref} (min) es el tiempo para la primera reducción decimal a la temperatura de referencia T_{ref} (°C).

3.12.3. Modelo de Geeraerd.

Se empleó la transformación logarítmica propuesta por Valdramidis y col. (2005) del modelo dinámico de Geeraerd y col. (2000). Los parámetros del modelo fueron estimados con el programa GInaFIT, creado por los mismos autores.

Como no se observaron colas en las gráficas de supervivencia, sólo fueron considerados los efectos del hombro y de la cinética logarítmica. En este caso, el modelo de Geeraerd puede ser descrito mediante la siguiente ecuación (Geeraerd y col., 2000).

$$\text{Log}_{10} S = -\left(\frac{k_{\max} t}{\ln 10}\right) + \log \frac{e^{k_{\max} Sl}}{1 + (e^{k_{\max} Sl} - 1)(e^{-k_{\max} t})} \quad (\text{Ec. 3.3})$$

Donde S representa la fracción de supervivientes a tiempo t , es decir N/N_0 , $k_{\max}$ (min^{-1}) es la velocidad de inactivación específica y Sl (min) describe la longitud del hombro.

3.12.4. Predicción del número de supervivientes en condiciones no isotérmicas.

En condiciones no isotérmicas, los recuentos experimentales obtenidos se compararon con los recuentos predichos a partir de los valores obtenidos en condiciones isotérmicas, ya fuera a partir de la aplicación del modelo lineal de Bigelow (D_T y z) o de los modelos no lineales de Weibull (δ , p y z) y Geeraerd (D_T , Sl y z).

En el caso de los modelos lineales, estas predicciones se basaron en los cálculos de la letalidad de cada tratamiento, aplicando el método general de cálculo (Stumbo, 1973). Este método asume que los tratamientos no isotérmicos están compuestos por sucesivos tratamientos isotérmicos de corta duración, cada uno a diferente temperatura. Para cada uno de estos tratamientos se calcula su equivalente letal a la temperatura de referencia, T_{ref} . La suma de los equivalentes letales de todos los intervalos es igual al tiempo total de tratamiento a la temperatura de referencia o, lo que es lo mismo, al factor de esterilización físico (F.PHY; ec. 1.13). Cuando se toman intervalos finitos en lugar de diferenciales de tiempo, la ec. 1.13 se puede expresar como (ec. 3.4).

$$F_{T_{ref}}^z = \sum 10^{((T - T_{ref})/z)} \times \Delta t \quad (\text{Ec. 3.4})$$

Donde $F_{T_{ref}}^z$ es el tiempo de tratamiento (min) a la temperatura de referencia T_{ref} para un microorganismo con un valor z ($^{\circ}\text{C}$) determinado y Δt es el intervalo de tiempo para el cual se asume que la temperatura es constante. En nuestros cálculos, el intervalo de tiempo Δt fué tal que la temperatura siempre cambiara en menos de 1°C en intervalos consecutivos.

El tiempo total de tratamiento calculado en la ecuación 3.4, $F_{T_{ref}}^z$, es sustituido en la ecuación 1.11 (reproducida a continuación), que conduce al cálculo del factor de esterilización biológico (F.BIO), para poder predecir el número de microorganismos supervivientes teórico. De este modo, si además de calcular el tiempo total de tratamiento, se calcula el valor $F_{T_{ref}}^z$ para los distintos instantes del tratamiento térmico, se puede obtener una predicción del número de supervivientes en los distintos tiempos de tratamiento.

$$F_{T_{ref}}^z = D_{T_{ref}} \times (\log N_0 - \log N) \quad (\text{Ec. 1.11})$$

Donde $D_{T_{ref}}$ es el tiempo de reducción decimal (min) a la temperatura T_{ref} (°C), N_0 es el número de microorganismos a tiempo 0 y N el número de microorganismos tras un tiempo de tratamiento.

En el caso de *B. sporothermodurans*, que sigue una cinética de destrucción térmica no lineal, cuando se empleó el modelo de Weibull para describir la inactivación en condiciones isotérmicas, las predicciones de supervivientes en condiciones no isotérmicas se basaron en la sustitución del factor esterilización físico (F.PHY; ec. 3.4) en la ecuación propuesta por Mafart y col. (2002) para el cálculo del factor de esterilización biológico ante cinéticas de inactivación que se ajustan al modelo de Weibull (ec. 1.12; reproducida a continuación):

$$F_{T_{ref}}^z = \delta_{T_{ref}} \times (\log N_0 - \log N)^{1/p} \quad (\text{Ec. 1.12})$$

Donde $\delta_{T_{ref}}$ es el parámetro de escala a la temperatura de referencia T_{ref} (°C), y p es el parámetro de forma.

Cuando se empleó el modelo de Geeraerd para describir la inactivación en condiciones isotérmicas, las predicciones de supervivientes en condiciones no isotérmicas se basaron en la sustitución del factor esterilización físico (F.PHY; ec. 3.4) en la ecuación 3.3, considerando que, en realidad, los valores $F_{T_{ref}}^z$ calculados para los distintos instantes del tratamiento no isotérmico mediante la ecuación 3.4, equivalen a tiempos de tratamiento a la temperatura de referencia elegida, es decir al parámetro t de la ecuación 3.3.

3.12.5. Análisis estadístico.

Los cálculos estadísticos, como las regresiones lineales de los valores D y z, con sus correspondientes pendientes, los coeficientes de correlación (r_o) y los intervalos de confianza para el 95%, a que dieron lugar, se realizaron usando el programa Microsoft® Excel 2000 para Windows®.

Las regresiones no lineales del modelo de Weibull se ajustaron usando la herramienta Solver Excel. Las regresiones no lineales del modelo de Geeraerd, se realizaron usando la herramienta GInaFIT (Geeraerd y col., 2005) para Excel. Los valores del error cuadrático medio (RMSE) de dichas regresiones también se calcularon con Excel.

Los gráficos fueron realizados con el programa SigmaPlot Graph.

3.13. Funciones de distribución.

Los datos correspondientes a la supervivencia de esporos en los ITTs después de su procesado en el reactor prototipo se ajustaron a varias funciones de distribución utilizando el programa @RISK 4.5.2 Professional Edition (Palisade Corporation, Newfield, New York, USA). Las distribuciones fueron ordenadas de acuerdo a los valores de bondad del ajuste de los parámetros estadísticos χ^2 , Anderson-Darling (A – D) y Kolmogorov-Smirnov (K – S) (BestFit Users Guide, Palisade Corporation, 2002). χ^2 es un parámetro de bondad de ajuste genérico, mientras que el A – D pone más énfasis en las colas de la distribución y el K – S en los valores próximos a la mediana. El valor del parámetro se expresa como un valor p , que indica la probabilidad de que un grupo de datos tomado aleatoriamente de la hipotética distribución sea igual o mayor que el grupo de datos analizado. Conforme el valor p se acerca a 0 se reduce la probabilidad de que la distribución seleccionada haya generado el grupo de datos original (Francois y col., 2005).

4. RESULTADOS

**4.1. CAPITULO I: “Selección de un microorganismo
adecuado para la validación biológica de tratamientos
térmicos aplicados a alimentos ácidos.”**

Una de las primeras fases para el desarrollo de un ITT que va a ser utilizado en la validación de un determinado tratamiento térmico es la selección del microorganismo a emplear como elemento sensor del ITT. Esta selección consiste en encontrar un microorganismo con una termorresistencia constante y adecuada, ya que debe ser relativamente resistente al tratamiento térmico para poder determinar su grado de inactivación en el elemento sensor y así determinar el impacto del tratamiento térmico en el alimento.

Antes de proceder a la selección de los microorganismos adecuados para la validación biológica de los tratamientos térmicos se realizó una revisión bibliográfica, determinando cuales podían ser los más idóneos. En la bibliografía es fácil encontrar la

termorresistencia de cualquier microorganismo, sin embargo, la multitud de factores que le afectan hacen de ella una característica muy variable, dentro incluso de una misma especie microbiana (Stumbo, 1973). Por este motivo, una vez determinados los microorganismos a priori más adecuados, es necesario verificar experimentalmente esta idoneidad en las condiciones de nuestra investigación.

Los alimentos ácidos ($\text{pH} < 4,6$) se esterilizan habitualmente con temperaturas por debajo de 100°C (Martínez y col., 2006). Productos acidificados con valores de pH entre 4 y 4,5 reciben normalmente tratamientos térmicos con el fin de alcanzar niveles de riesgo aceptables para evitar la alteración causada por *B. coagulans*. Para pH inferiores a 4, los alimentos se han considerado tradicionalmente exentos de alteración microbiana causada por microorganismos esporulados. Sin embargo en los últimos años, se han encontrado alteraciones microbianas en zumos de frutas tratados térmicamente, siendo el microorganismo responsable una bacteria acidofílica del género *Alicyclobacillus*, llamada *A. acidoterrestris*, capaz de crecer a pH 2,5 (Wisse y Parish, 1998; Steyn y col., 2011).

Hasta la aparición de este microorganismo, los tratamientos a temperaturas inferiores a 100°C se consideraban suficientes para garantizar la estabilidad microbiológica de estos alimentos durante su vida útil. En el caso de las vesículas de mandarina, utilizadas en esta tesis como ejemplo de alimento ácido, el tratamiento industrial que se aplica es de $93,3^{\circ}\text{C}$ durante 2 minutos y posterior enfriamiento. El microorganismo sensor debería tener una termorresistencia adecuada a este tratamiento y, teniendo en cuenta que las fases de calentamiento y enfriamiento también contribuyen a la letalidad del mismo, debería producirse cierto grado de inactivación en la población inicial. Por otro lado, la destrucción microbiana no puede ser total, ya que para poder cuantificar el efecto letal del tratamiento debe haber microorganismos supervivientes al finalizar el mismo. Así, teniendo en cuenta que el número inicial de microorganismos se sitúa en torno a 10^6 UFC/mL en el ITT, el valor D_{93} debería estar comprendido entre 0,5 y 5 minutos aproximadamente. Estos valores representarían los límites de destrucción y supervivencia tras el tratamiento térmico respectivamente.

Diversos autores (Stumbo, 1973; Condón y Sala, 1992; Palop y col., 1996b) han señalado la importancia que tiene en la termorresistencia microbiana el medio en el que

se realiza el tratamiento térmico. De ahí, la conveniencia de realizar los estudios de resistencia al calor en el mismo medio de calentamiento en el que posteriormente se va a aplicar el tratamiento industrial. Desafortunadamente, en la revisión bibliográfica realizada no se ha encontrado ninguna referencia sobre la termorresistencia de microorganismos esporulados ni en vesículas, ni siquiera en zumo de mandarina. La ausencia de datos bibliográficos está posiblemente relacionada con la incapacidad ya comentada de los microorganismos esporulados del género *Bacillus* de crecer en alimentos ácidos.

Así, ante la ausencia de datos de termorresistencia en mandarina, se prestó especial atención al pH del medio. El pH del medio de calentamiento tiene una gran influencia en la termorresistencia de las bacterias, hasta el punto que es considerado el factor más importante que determina la termorresistencia de un microorganismo. La influencia del pH del medio de calentamiento ha sido ampliamente investigada. Para la mayoría de investigadores, los microorganismos muestran su máximo valor de termorresistencia a pH neutro (Cerny, 1980) y una acidificación del medio permite disminuir la termorresistencia de los géneros *Bacillus* (Lynch y Potter, 1988, Rodrigo y col. 1990, Condon y Sala, 1992, Palop y col, 1999c) y *Clostridium* (Blocher y Busta, 1983, Brown y Thorpe, 1979, Silla y col., 1993, Ocio y col., 1994), como también de las ascosporas fúngicas (Beuchat, 1988) y de células vegetativas de bacterias (Pagan y col., 1999, Mañas y col., 2003).

Las vesículas de mandarina tienen un pH de 3,5. Así pues, el microorganismo debería tener los valores D_{93} antes mencionados en un medio ácido, de pH 3,5. Sin embargo, dada la ya comentada inhibición del crecimiento de los microorganismos del género *Bacillus* a pHs ácidos, tampoco se han encontrado estudios acerca del efecto del pH en la termorresistencia de microorganismos esporulados de este género a valores de pH inferiores a 4.

En consecuencia, la selección se centró en las cepas disponibles en la Universidad Politécnica de Cartagena y se realizó en base a microorganismos de los que se conocía su termorresistencia a valores de pH próximos a 3,5, y/o que se preveía que podían presentar una resistencia al calor adecuada al tratamiento que se iba a aplicar.

Asimismo, se trató de cubrir todo el rango de valores de termorresistencia dentro del margen establecido (D_{93} entre 0,5 y 5 a pH 3,5). Los microorganismos seleccionados se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Microorganismos seleccionados para la validación del tratamiento térmico aplicado a alimentos ácidos

Microorganismo	Medio de calentamiento	Temperatura (°C)	D_T (min)	Referencia bibliográfica
<i>A. acidoterrestris</i> DSM 3922	Zumo de naranja	95	7,4	Conesa y col. 2009
<i>B. atrophaeus</i> CECT 4071	Tampón pH 7	90	aprox. 15	Raso y col. 1998
<i>B. licheniformis</i> CECT 4523	Tampón pH 4	96	0,26	Palop y col. 1996b
<i>B. megaterium</i> CECT 4313	Tampón pH 7	90	aprox. 25	Periago y col. 2006
<i>B. subtilis</i> AdHC1	Agua destilada	100	6,3	Conesa y col. 2003
<i>B. subtilis</i> CECT 4522	Puré de espárragos a pH 4	93	0,45	Palop y col. 1996a

4.1.1. Estudio comparativo de la termorresistencia a pH 3,5 y 95°C en distintas especies del género *Bacillus* y *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

La figura 4.1 muestra los resultados obtenidos en el estudio comparativo realizado sobre la termorresistencia a 95°C en tampón de pH 3,5 de las especies de los géneros *Bacillus* y *Alicyclobacillus* seleccionadas como representativas de distintos grados de resistencia al calor. En la tabla 4.2 figuran los correspondientes valores D_{95} , intervalos de confianza y coeficientes de correlación.

Figura 4.1. Curvas de supervivencia a 95°C en tampón McIlvaine de pH 3,5, de *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* CECT 4522, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus subtilis* AdHC1 y *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Tabla 4.2. Valores D_T , intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación (r_0), obtenidos en tampón McIlvaine de pH 3,5, a 95°C para esporos de *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* AdHC1, *subtilis* CECT 4522, *atrophaeus*, *licheniformis* y *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Especie	D_{95}	I.C.	I.C.	r_0
<i>B. subtilis</i> AdHC1	8,58	7,84	9,46	0,99
<i>B. subtilis</i> CECT 4522	7,36	5,99	9,56	0,97
<i>A. acidoterrestris</i> DSM 3922	1,96	1,51	2,79	0,98
<i>B. atrophaeus</i> CECT 4071	1,58	1,26	2,13	0,99
<i>B. licheniformis</i> CECT 4523	0,86	0,72	1,07	0,99
<i>B. megaterium</i> CECT 4313	0,61	0,49	0,83	0,99

Los valores de termorresistencia de estos microorganismos en tampón McIlvaine de pH 3,5 a 95°C estuvieron comprendidos entre los 0,61 min de *B. megaterium* y los 8,58 min de *B. subtilis* AdHC1.

Las dos cepas de *B. subtilis* mostraron la termorresistencia más elevada, con valores D_{95} de 8,58 (AdHC1) y 7,36 min (CECT 4522). No se encontraron diferencias significativas entre estos dos valores. Sin embargo, estos dos microorganismos si que fueron netamente más termorresistentes que el resto de microorganismos investigados. *B. subtilis atrophaeus* y *A. acidoterrestris* presentaron valores D_{95} de 1,58 y 1,96 min respectivamente, que tampoco mostraron diferencias significativas entre si. Finalmente, *B. licheniformis* y *B. megaterium* fueron los microorganismos menos termorresistentes en tampón McIlvaine de pH 3,5, con valores D_{95} de 0,86 y 0,61 min respectivamente. Estos valores tampoco fueron significativamente diferentes entre si, tal y como se muestra en la tabla 4.2.

Así, entre los microorganismos investigados, se pueden considerar tres grupos en relación con su termorresistencia a 95°C en tampón de pH 3,5: uno de termorresistencia alta (D_{95} superior a 7 min) integrado por *B. subtilis* AdHC1 y *B. subtilis* CECT 4522; otro de termorresistencia media (D_{95} entre 1,5 y 2 min) integrado por *B. atrophaeus* y *A. acidoterrestris*; y otro de termorresistencia baja (D_{95} inferior a 1 min) integrado por *B. licheniformis* y *B. megaterium*. Según lo expuesto anteriormente en el apartado 4.1. y aunque la temperatura de referencia empleada era ligeramente más baja (93°C), cualquiera de los microorganismos de los grupos que presentan termorresistencia intermedia o baja podría servir para la validación biológica de alimentos ácidos.

Resulta difícil la comparación de estos valores de termorresistencia con los obtenidos por otros autores, ya que al ser microorganismos que normalmente no crecen a estos valores de pH, no existen, salvo para *A. acidoterrestris*, referencias bibliográficas de estudios de termorresistencia para estos microorganismos a pH tan bajo a temperaturas de pasteurización.

El valor de termorresistencia obtenido para *B. subtilis* AdHC1 fue el más elevado de todos (D_{95} = 8,58 min). No existe mucha información acerca de la resistencia al calor de este microorganismo. Tan solo los datos publicados por Conesa y col. (2003) en agua destilada (D_{100} = 6,3 min) son comparables hasta cierto punto, ya que las temperaturas son distintas y también los medios son distintos. Sorprende, no obstante, que sea el microorganismo más termorresistente a este pH de todos los investigados, si bien es de

destacar el hecho de que es un microorganismo que tolera el pH ácido y es capaz de crecer y alterar alimentos ácidos (Cazemier y col., 2001).

El valor D_{95} obtenido para *B. subtilis* CECT 4522 ($D_{95} = 7,36$ min) es muy superior al obtenido por Palop y col (1996a) para la misma cepa de este microorganismo (anteriormente encuadrada dentro de la especie *B. coagulans*) y esporulada a una temperatura similar ($D_{92,9} = 0,45$ min en puré de espárragos acidificados hasta pH 4 con ácido láctico; temperatura de esporulación: 35°C). Estos autores obtuvieron, para la misma cepa pero esporulada a una temperatura notablemente más elevada (52°C), una termorresistencia mucho más parecida a la de nuestra cepa ($D_{92,9} = 5,5$ min en puré de espárragos acidificados hasta pH 4 con ácido acético). Años más tarde, estos mismos autores (Palop y col., 1999c) obtuvieron para este mismo microorganismo, esporulado a 52°C un valor D_{95} de 4,73 min en zumo de tomate a pH 4, y en tampón McIlvaine de pH 4 un valor D_{95} de 14,9 min, calculados ambos valores D_{95} extrapolando los datos publicados en el artículo. Todos estos datos ponen de manifiesto la influencia de los numerosos factores que afectan a la termorresistencia. El pH y el tipo de medio de calentamiento parecen tener una mayor importancia, pero incluso el acidificante empleado (Palop y col., 1996a) y la temperatura de esporulación (Sala y col., 1995) pueden ejercer una cierta influencia. Así, la acidificación del medio de calentamiento disminuía la termorresistencia de *B.* este microorganismo (Palop y col., 1999c), si bien este descenso era menor que el observado en otras especies de los generos *Bacillus* y *Clostridium*. No obstante, el medio de calentamiento también tenía un efecto en la termorresistencia de este microorganismo, siendo menos termorresistente en alimentos que en un tampón del mismo pH que éstos (Palop y col., 1999c).

El valor D_{95} obtenido para *A. acidoterrestris* ($D_{95} = 1,96$ min) está dentro del rango de valores de termorresistencia obtenido para este microorganismo en distintos medios por otros autores (Baumgart y col., 1997; Walls, 1997; Silva y Gibbs, 2001; Conesa y col., 2009; Steyn y col., 2011). Dicho valor es menor que el obtenido por Baumgart y col. (1997) que encontraron un valor D_{95} de 5,1 min en néctar de fruta a pH 3,5, pero mayor que el obtenido por Walls (1997), que obtuvo un valor D_{95} de 1 min en zumo de frutos rojos a pH 3,5. *A. acidoterrestris* tiene, además del amplio rango de pH de crecimiento (2,5 a 6), un rango de temperaturas de crecimiento de 25 a 60 °C, por ello es

generalmente el causante de la contaminación de bebidas ácidas (Pettipher y col., 1997, Splittstoesser y col., 1998, Durak y col., 2010, Wisse y Parish, 1998).

En el caso de *B. atrophaeus* tampoco existen apenas datos sobre su termorresistencia. El valor obtenido ($D_{95} = 1,58$ min) es ligeramente inferior al encontrado por Raso y col. (1998), que obtuvieron un valor D_{95} de 2,6 min, pero en agua destilada (calculado a partir de la extrapolación de datos publicados en el artículo), en el que figuraba con su antigua denominación, *B. subtilis* var. *niger*).

El valor de termorresistencia encontrado para *B. licheniformis* ($D_{95} = 0,86$ min) es más alto que el obtenido por Palop y col. (1996b), en tampón de pH 4 ($D_{96} = 0,26$ min). Si bien estos valores D no son directamente comparables al haberse obtenido a temperaturas de tratamiento distintas, el aumento de la termorresistencia encontrado en nuestro caso no parece justificable, máxime teniendo en cuenta el profundo efecto del pH en la termorresistencia de este microorganismo, al menos en el rango de 4 a 7 (Palop y col, 1996b), en el que la relación entre logaritmo del valor D_{99} y el pH del medio parecía ser lineal. Muchos autores han encontrado diferentes relaciones entre el valor D y el pH del medio de calentamiento, corroborando la relación lineal observada por Palop y col (1996b) con *B. licheniformis*. Entre otros, Cerny (1980) con *B. subtilis* y *Bacillus stearothermophilus*, Mazas y col. (1998) con *B. cereus* o Fernández y col. (1996) con *B. stearothermophilus* y *C. sporogenes*. Otros autores encontraron un intervalo de pH donde es más acusado el descenso de la termorresistencia, como por ejemplo Montville y Sapers (1981) encontraron que el rango más eficaz era de 4,4 a 5, mientras que Xezones y Hutchings (1965) y Cook y Gilbert (1968) situaron este rango entre 5 y 6. El rango de menor influencia es normalmente el situado en valores de pH cercanos a la neutralidad. Mafart y col (2001) compararon distintos modelos creados para describir el efecto del pH en la termorresistencia a los que ajustaban los resultados obtenidos por otros autores con *B. stearothermophilus*, *C. botulinum* y *C. sporogenes*, concluyendo que los modelos lineales se ajustaban mejor a temperaturas bajas de calentamiento y pH bajos, mientras que los cuadráticos se ajustan mejor a temperaturas altas y valores medios de pH. Palop y col (1996b) observaron, además, que la influencia del medio de calentamiento en la termorresistencia de *B. licheniformis* se debía exclusivamente al pH y no estaba determinada por el tipo de medio, pues encontraron que la termorresistencia en tomate y espárragos, acidificados ambos hasta pH 4, fue prácticamente la misma que

en tampón McIlvaine al mismo pH. No obstante pequeñas diferencias en la termorresistencia de distintas suspensiones de esporos de una misma cepa son habituales (Van Zuijlen y col., 2010).

Finalmente, el valor D_{95} obtenido para *B. megaterium*, (D_{95} 0,65 min), es similar al encontrado por Nakayama y col. (1996), que encontraron un valor D_{95} de 0,8 min en agua destilada.

4.1.2. Estudio comparativo de la termorresistencia a pH 3,5 y en condiciones no isotérmicas en distintas especies del género *Bacillus* y *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

En base a los resultados obtenidos, se realizaron los experimentos consistentes en aplicar el perfil de temperaturas del tratamiento térmico industrial de vesículas de mandarina a un microorganismo de cada uno de estos tres grupos en tampón McIlvaine de pH 3,5: *B. subtilis* AdHC1 por ser el más termorresistente, *A. acidoterrestris* por presentar una termorresistencia intermedia y *B. megaterium* por ser el microorganismo menos termorresistente. La figura 4.2 muestra los resultados obtenidos.

Figura 4.2 Perfil de temperatura y curvas de supervivencia de *Bacillus subtilis* AdHC1, *Bacillus megaterium* y *Alicyclobacillus acidoterrestris* sometidos a este tratamiento en tampón McIlvaine de pH 3.5.

En la figura 4.2 se observa que el tratamiento térmico industrial aplicado a las vesículas de mandarina, prácticamente no afecta al recuento de supervivientes de *Bacillus subtilis* AdHC1. Por lo tanto, este microorganismo no resultaba adecuado para la validación de dicho tratamiento térmico, por presentar una termorresistencia demasiado elevada, tal y como ya se había postulado en el apartado anterior. Dado que la termorresistencia de *B. subtilis* CECT 4522 no resultó significativamente diferente de la de *B. subtilis* AdHC1, tampoco parece apropiado para evaluar el tratamiento térmico aplicado a las vesículas de mandarina.

El tratamiento térmico que se aplica industrialmente a las vesículas de mandarina redujo en aproximadamente un ciclo logarítmico los recuentos de *A. acidoterrestris*. Si bien esta reducción puede considerarse adecuada para la validación del tratamiento térmico, inicialmente el microorganismo fue descartado, en pos de encontrar un microorganismo que mostrara una reducción más acusada en el número de supervivientes, con la que valorar de una manera más adecuada la intensidad del tratamiento térmico aplicado.

Los recuentos de *B. megaterium* se redujeron de forma considerable al aplicar el tratamiento térmico, alcanzándose cuatro ciclos logarítmicos de inactivación al final de la fase de calentamiento y en torno a seis al final del tratamiento térmico. Un microorganismo adecuado para validar un tratamiento térmico industrial debería mostrar una variación del log UFC/mL inicial y final apreciable fácilmente (van Zuijlen y col., 2010). En este sentido, *B. megaterium* se mostraba como idóneo por la drástica reducción de los recuentos conseguida. No obstante, esta reducción estaba muy cercana al límite máximo admisible ya que, teniendo en cuenta un número inicial de 10^6 esporos en cada ITT, se corría el riesgo de quedarse sin supervivientes por lo que no se podría cuantificar la intensidad del tratamiento aplicado. Dado que se conoce desde hace tiempo que resulta relativamente sencillo modificar la resistencia al calor de esporos bacterianos (Slepecky y Foster 1959; Lechowich y Ordal, 1962; Bender y Marquis 1985; Palop y col, 1999a), se procedió a realizar distintos experimentos con objeto de aumentar su termorresistencia y de explorar las posibilidades de su empleo para la validación del tratamiento térmico que se aplica a los alimentos ácidos. Estos experimentos se detallan en los apartados siguientes.

4.1.3. Influencia de las condiciones de esporulación en la termorresistencia de *B. megaterium*.

Como ya se ha dicho en el apartado 1.2.3 de antecedentes, y en este mismo capítulo, la temperatura de esporulación, es uno de los factores que en mayor medida determina la resistencia al calor de los microorganismos esporulados. Los esporos bacterianos son normalmente más termorresistentes cuando son esporulados a mayor temperatura (Palop y col. 1999b). Además Sala y col. (1995) observaron con esporos de *B. subtilis*, que cuando la esporulación se realizaba a mayor temperatura el efecto del pH del medio de calentamiento disminuía a temperaturas de tratamiento elevadas.

Para aumentar la termorresistencia de *B. megaterium* se realizó la esporulación en dos medios distintos: agar PCA empleando como medio de referencia y agar nutritivo fortificado (ANF) empleado habitualmente como medio para producir suspensiones de esporos abundantes y de termorresistencia elevada (Mazas y col. 1995). Se realizaron esporulaciones a dos temperaturas distintas, 37°C y 48°C en ambos medios, para así ver, tanto la influencia de la temperatura de esporulación, como el efecto del medio de esporulación en la termorresistencia. Con estas suspensiones se realizaron tratamientos isotérmicos a 95°C en tampón McIlvaine de pH 3,5 para obtener los tiempos de reducción decimal y poder compararlos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.3 y en la tabla 4.3.

Figura 4.3. Curvas de supervivencia a 95°C en tampón McIlvaine de pH 3.5, de *Bacillus megaterium* esporulado en agar ANF y en agar PCA a 37°C y a 48°C.

Tabla 4.3. Valores D_T , intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación (r_0), obtenidos para *Bacillus megaterium* esporulado en agar PCA y en agar nutritivo a 37°C y a 48°C.

T^a esporulación.(°C)	Medio esporulación.	D_T	I.C. 95%-	I.C. 95%+	r_0
37	ANF	0,67	0,58	0,84	0,991
48	ANF	0,62	0,44	1,01	0,978
37	PCA	0,61	0,49	0,83	0,989
48	PCA	0,77	0,20	0,95	0,990

No se han encontrado diferencias significativas entre los valores obtenidos a 37 o a 48°C en ninguno de los dos medios de esporulación investigados. En ambos casos, tanto en agar PCA como en agar ANF los intervalos de confianza al 95% para ambas temperaturas se solapan, como se puede observar en la tabla 4.3, lo que indica que, a diferencia de lo que ocurre con otros microorganismos (Palop y col, 1999a), la termorresistencia de esta cepa de *B. megaterium* no está influenciada por la temperatura de esporulación, al menos a las temperaturas investigadas.

Esta ausencia de efecto podría ser debida bien a una característica específica de *B. megaterium*, que fuese genéticamente insensible a la temperatura de esporulación. No obstante Khoury y col. (1987) publicaron un incremento de 2,9 veces el valor D_{75} de otra cepa de *B. megaterium* (la cepa ATCC 19213) al aumentar su temperatura de esporulación de 20 a 45°C, por lo que esta hipótesis es poco probable. Otra posible explicación es que el aumento de termorresistencia que se produce al realizarse la mayor temperatura se pierda, ya que al tratarlos en medio ácido se desmineralizan. Es decir, nuestros esporos de *B. megaterium* esporulados a 48°C serían más resistentes al calor que los esporulados a 37°C, en un medio de pH neutro, pero en un medio ácido se produciría una desmineralización simultánea al tratamiento térmico que sería más acusada en esos esporos más resistentes al calor, que llegarían a igualar su termorresistencia con la de los esporos obtenidos a una temperatura de esporulación inferior. De hecho Palop y col., (1999b) encontraron que las diferencias de termorresistencia de los esporos de *B. subtilis* esporulados a 32 y a 52°C (de hasta 10 veces) se reducían hasta prácticamente desaparecer cuando los esporos desmineralizados se trataban térmicamente en un medio de pH ácido.

En cuanto al medio de esporulación, tampoco se han encontrado diferencias significativas entre los valores obtenidos en agar PCA o agar ANF a ninguna de las dos temperaturas de esporulación investigadas. Si bien, también está bien documentada la influencia del medio de esporulación en la termorresistencia bacteriana, incluso en esporos de esta misma especie (Slepecky y Foster, 1959), la misma hipótesis de la desmineralización en medio ácido explicaría la ausencia de efecto del medio de esporulación.

4.1.4. Influencia de un tratamiento de mineralización en la termorresistencia de *Bacillus megaterium*.

Como ya se ha comentado en el apartado 1.2.3 de antecedentes, los fosfatos y tipo de minerales existentes en el medio de esporulación determinan el grado y tipo de mineralización de los esporos maduros que, a su vez, determinará su termorresistencia (Slepecky y Foster, 1959). Los minerales estabilizan las proteínas y otras estructuras sensibles al calor. El calcio es normalmente el componente mineral más importante de

los esporos bacterianos, y ha sido relacionado frecuentemente con la termorresistencia bacteriana, (Murrell y Warth, 1965).

Para aumentar la termorresistencia de *Bacillus megaterium* se aplicaron distintos tratamientos de mineralización a la suspensión de microorganismos esporulada en agar ANF a 37°C, según los métodos descritos en el apartado 3.4 de materiales y métodos.

Con las suspensiones mineralizadas con calcio y manganeso se realizó un ensayo de termorresistencia a 95°C, del cual se obtuvieron los resultados que se muestran en la figura 4.4 y tabla 4.4.

Figura 4.4. Curva de supervivencia a 95°C en tampón McIlvaine de pH 3.5, de *Bacillus megaterium* mineralizado con calcio, con manganeso, y sin mineralizar.

Tabla 4.4. Valores D_T , intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación (r_0), obtenidos en tampón McIlvaine de pH 3,5, a 95°C para esporos de *Bacillus megaterium*, mineralizados con calcio y con manganeso.

Mineral	D_T	I.C. 95%-	I.C. 95%+	r_0
Ca	0,75	0,58	1,07	0,986
Mn	0,69	0,59	0,84	0,990
Sin mineral	0,61	0,49	0,83	0,979

Tampoco en este caso se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos con ninguna de las suspensiones nativas o mineralizadas. Los intervalos de confianza se solapan en los tres casos, con lo que se puede concluir que los tratamientos de mineralización previos al tratamiento térmico no afectan a la termorresistencia de *B. megaterium* o, al igual que antes, que el efecto conseguido con la mineralización se pierde por efecto del pH del medio de calentamiento. Esta ausencia de efecto también se ha descrito para *A. acidoterrestris*, cuya termorresistencia no se ve afectada por la desmineralización ni por la remineralización de los esporos, (Yamakazi y col., 1997b), si bien estos autores también realizaron las determinaciones de termorresistencia en medios ácidos.

Una vez obtenida la termorresistencia a pH 3,5 de *B. megaterium* ($D_{95}=0,61$ min) , visto que ni la temperatura (fig. 4.3 y tabla 4.3), ni el medio de esporulación (fig. 4.3 y tabla 4.3) ni los tratamientos de mineralización previos al tratamiento térmico (fig. 4.4 y tabla 4.4) aumentan de manera significativa su termorresistencia en medio ácido, y comprobado mediante la realización del perfil de temperatura (fig. 4.2) que no es adecuado para validar el tratamiento térmico de vesículas, por sufrir una inactivación demasiado elevada al final del tratamiento se descartó definitivamente este microorganismo y se consideró otro de termorresistencia intermedia, *A. acidoterrestris*.

4.2. CAPITULO II: “Validación del tratamiento térmico con *Alicyclobacillus acidoterrestris* aplicado a un alimento ácido en el reactor prototipo T-sensation”

Los resultados recogidos en este capítulo han sido publicados en “Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under conditions simulating industrial heating processes of tangerine vesicles and its use in time temperature integrators”. López, M. D., García, P., Muñoz-Cuevas, M., Fernández, P.S., Palop, A. (2011). European Food Research Technology. 232:821–827.

4.2.1. Efecto del medio de calentamiento en la termorresistencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Las tablas 4.5 y 4.6 muestran los valores D_T obtenidos en tampón McIlvaine pH 3,5 y zumo de mandarina, respectivamente bajo condiciones isotérmicas con sus correspondientes intervalos de confianza para el 95% y los coeficientes de correlación (r_0). La figura 4.5 muestra la curva de supervivencia de *A. acidoterrestris* obtenida bajo condiciones isotérmicas a 105°C en tampón McIlvaine de pH 3,5 y en zumo de mandarina.

Tabla 4.5. Valores D_T , intervalos de confianza para el 95%, y coeficientes de correlación (r_0) obtenidos en tampón McIlvaine de pH 3,5 para *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Temperatura (°C)	D_T (min)	IC 95%-	IC 95%+	r_0
90,0	6,0	5,6	6,5	>0,999
95,0	2,2	1,9	2,7	0,995
100,0	0,83	0,71	1,00	0,996
105,0	0,34	0,28	0,44	0,987

Tabla 4.6 Valores D_T , intervalos de confianza para el 95% y coeficientes (r_0) obtenidos en zumo de mandarina para *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Temperatura (°C)	D (min)	I.C. 95%-	I.C 95%+	r_0
90.0	15	14	16	0,996
95.0	6,2	5,8	6,8	0,994
100.0	2,1	2,0	2,2	>0,999
105.0	0,63	0,55	0,73	0,994

Figura 4.5. Curvas de supervivencia de *Alicyclobacillus acidoterrestris* a 105°C en tampón McIlvaine pH 3,5 y en zumo de mandarina.

Figura 4.6. Gráficas de termodestrucción de *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenidas bajo condiciones isotérmicas en tampón McIlvaine de pH 3,5 y en zumo de mandarina.

Tabla 4.7. Valores z , intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación (r_0) obtenidos en zumo de mandarina y en tampón McIlvaine de pH 3,5, para *Alicyclobacillus acidoterrestris*.

Medio de calentamiento	z (°C)	I.C. 95%-	I.C. 95%+	r_0
Tampón pH 3,5	12,0 °C	11,2	13,0	0,999
Zumo mandarina	10,8°C	9,0	13,7	0,997

Todas las curvas de supervivencia de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenidas bajo condiciones isotérmicas presentaron coeficientes de correlación mayores de 0,98 (tablas 4.5 y 4.6) indicando que siguen cinéticas de primer orden, tanto en tampón McIlvaine como en zumo de mandarina, no mostrando hombros ni colas, como se puede observar en la figura 4.5. Curvas similares fueron obtenidas para las otras temperaturas. Esta linealidad ha sido también observada por otros autores como Pontius y col. 1998; Previdi y col. (1997) y Silva y col. (1999, 2001).

La figura 4.6 muestra las curvas de termodestrucción (TDT) obtenidas en tampón de pH 3,5 y en zumo de mandarina. La tabla 4.7 muestra los valores z obtenidos en tampón McIlvaine de pH 3,5 y en zumo de mandarina, sus correspondientes intervalos de confianza para el 95% y los coeficientes de correlación (r_0).

Tanto en las tablas 4.5 y 4.6, como en las figuras 4.5 y 4.6 se puede observar que la termorresistencia de *A.acidoterrestris* fue más alta en zumo de mandarina que en tampón de pH 3,5, tal y como muestran los valores D_{105} de 0,63 y 0,34 obtenidos respectivamente. Estas diferencias se mantuvieron constantes a todas las temperaturas investigadas, no encontrándose diferencias significativas entre los valores z , como se puede observar en la tabla 4.7.

Los valores de D y z concuerdan con los valores obtenidos por diferentes autores para este microorganismo en un medio de pH similar (Ceviz y col., 2009; Eiroa y col., 1999; Komitopoulou y col. 1999; Pontius y col., 1998; Silva y Gibbs, 2001; Silva y col., 1999; Splittstoesser y col., 1998). Bahçeci y Acar (2007) obtuvieron unos valores de D_{90} y D_{100} de 6,5 y 0,4 min respectivamente, en tampón McIlvaine pH 3,5 para este microorganismo, los cuales son muy similares a los valores D obtenidos en nuestros ensayos (Tabla 4.5), aunque el valor z obtenido por Bahçeci y Acar (2007) fue de 8,4 °C en este medio, el cual es significativamente menor que el encontrado en nuestros ensayos (12,0 °C). Silva y Gibbs (2001) encontraron que los valores $D_{95\text{ }^{\circ}\text{C}}$ de *A. acidoterrestris* en distintos zumos podrían ir desde 0,06 a 5,3 min y los valores z desde 7,2 °C en zumo de frambuesa con un pH de 3,5 a 12,9 °C en zumo de naranja con un pH de 3,9, rango en el cual estarían nuestros valores obtenidos de z . Los datos recientemente publicados para la misma cepa de *A.acidoterrestris* DSM 3922, pero obtenida en zumo de naranja (Conesa y col., 2009), muestran valores de termorresistencia similares a los obtenidos en zumo de mandarina en nuestros ensayos (Tabla 4.6).

La termorresistencia de *A. acidoterrestris* fue entre un 35% y 55% mas alta en zumo de mandarina que en tampón, dependiendo de la temperatura de tratamiento (Tablas 4.5 y 4.6). Baheçeci y Acar, (2007), también publicaron para este microorganismo valores

D más altos en zumo de manzana que en tampón de pH similar al de nuestro estudio. Además existe abundante bibliografía donde se muestra que la termorresistencia de distintos microorganismos en alimentos es diferente de la termorresistencia que muestran en tampón al mismo pH (Cameron y col. 1980; Ocio y col., 1994). Probablemente esto se debe a que los nutrientes presentes en el alimento actúan protegiendo a los esporos bacterianos contra el calor (Palop y col., 1999b).

4.2.2. Termorresistencia de *A. acidoterrestris* bajo condiciones no isotérmicas.

La figura 4.7 muestra las curvas de supervivencia obtenidas en tampón McIlvaine pH 3.5 (Fig. 4.7A) y en zumo de mandarina (Fig 4.7B) en condiciones no isotérmicas. También se muestra el perfil de temperatura y el correspondiente nivel de inactivación estimado a partir de la ecuación 1.11 con los valores z obtenidos bajo condiciones isotérmicas. El perfil de temperatura aplicado en el termorresistómetro reproduce el tratamiento térmico aplicado en el reactor prototipo a escala piloto, para la pasteurización de vesículas de mandarina.

En ambos medios se observó un cierto grado de reducción del número de supervivientes de esporos de *A. acidoterrestris* al final del tratamiento térmico, el cual fue más alto que el estimado en tampón y más bajo que el estimado en zumo de mandarina. *A. acidoterrestris* mostró de nuevo, bajo condiciones no isotérmicas, una termoresistencia más alta en zumo de mandarina que en tampón ya que la destrucción fue de menos de un ciclo logarítmico en zumo de mandarina (0,79 ciclos logarítmicos) y de 1,25 ciclos logarítmicos en tampón. Es decir, de nuevo se muestra que la termorresistencia en zumo de mandarina es un 36,8% más alta que en tampón, tal y como se había determinado en condiciones isotérmicas. Este hecho refuerza la hipótesis de que el zumo de mandarina ejerce un efecto protector en la termorresistencia de este microorganismo cuando se compara con la termorresistencia obtenida en tampón del mismo pH. Este efecto protector se mantiene con porcentajes similares incluso bajo condiciones no isotérmicas, donde cabría esperar una mayor variabilidad de los resultados.

Figura 4.7. Perfiles de temperatura y curvas de supervivencia de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* obtenidas aplicando el tratamiento térmico industrial en el termorresistómetro, junto con la curva de supervivencia teórica. **A.** Tratamiento térmico aplicado en tampón McIlvaine pH 3,5. **B.** Tratamiento térmico aplicado en zumo de mandarina.

La inactivación de los esporos bajo condiciones no isotérmicas fue estimada utilizando los valores de termorresistencia obtenidos bajo condiciones isotérmicas, con una desviación de menos de medio ciclo logarítmico entre dos datos experimentales y los estimados, para casi todos los tiempos de tratamiento y en ambos medios de calentamiento (Fig 4.7), excepto para los dos últimos puntos en tampón como medio de calentamiento (Fig 4.7A).

Además la mayor parte de los valores experimentales estuvieron por debajo de los valores predichos, es decir, hubo más inactivación de lo esperado, o lo que es lo mismo, los errores se cometieron en el “lado seguro”, especialmente cuando se empleó zumo de mandarina.

4.2.3. Validación del tratamiento térmico a escala laboratorio y a escala planta piloto.

La Tabla 4.8 muestra los valores logarítmicos medios, máximos y mínimos del número inicial de esporos de *A. acidoterrestris* presentes en cada ITT y del número de esporos supervivientes presentes en cada ITT después del tratamiento industrial aplicado a los ITTs en el termorresistómetro utilizando como medio de calentamiento zumo de mandarina y en el reactor prototipo a escala piloto, T-sensation, en vesículas de mandarina, con sus correspondientes desviaciones estandar y coeficientes de variación.

Tabla 4.8. Logaritmo de los recuentos de número de esporos de *Alicyclobacillus acidoterrestris* presentes en los ITTs antes y después del tratamiento térmico aplicado en el termorresistómetro y en el reactor prototipo a escala piloto.

Equipo	Media	Máximo	Mínimo	Desviación estandar	Coefficiente de variación (%)
Inicial	4,66	4,96	4,37	0,19	4,09
Termoresistometro	3,99	4,09	3,92	0,09	2,21
Reactor prueba 1	3,85	4,38	3,38	0,24	6,21
Reactor prueba 2	3,74	4,21	2,97	0,30	8,04
Reactor prueba 3	3,76	4,09	3,34	0,18	4,94

Los coeficientes de variación de los recuentos fueron inferiores al 10% en todos los casos. Se trata de valores pequeños, que se justifican por la variabilidad inherente a los recuentos microbiológicos. En el caso de los recuentos correspondientes al número inicial de esporos en los ITTs, la dispersión de los datos podría deberse, además, a pequeñas diferencias en el número de esporos en los distintos ITTs. Dado que los coeficientes de variación correspondientes al número de supervivientes en los ITTs tras los distintos tratamientos térmicos tienen valores similares, los mismos argumentos son válidos en estos casos y no parecen deberse, en ningún, caso a que los tratamientos térmicos aplicados sean poco homogéneos, ya que en tal caso, la dispersión hubiese sido aun mayor.

Así pues, la diferencia entre el logaritmo del número inicial de esporos presente en el ITT y el número de supervivientes tras el tratamiento térmico, permite calcular, a partir de la ecuación 1.11, el valor F biológico aplicado en cada caso. Este valor, junto con los valores F físicos estimados a partir de las sondas de temperatura, se muestran en la tabla 4.9

Tabla 4.9. Valores F biológicos medios y valores F físicos determinados con las sondas de temperatura en los tratamientos térmicos aplicados en el termorresistómetro y en el reactor prototipo a escala piloto.

Equipo	F biológico medio	F físico sonda 1	F físico sonda 2
Termoresistometro	5,83	5,33	
Reactor prueba 1	7,07	4,65	3,37
Reactor prueba 2	8,07	5,65	7,61
Reactor prueba 3	7,85	5,63	4,21

Destaca, en primer lugar que, cuando el mismo perfil de temperatura anterior fue aplicado a los ITTs en el termorresistómetro utilizando zumo de mandarina como medio de calentamiento, se obtuvo una inactivación similar (0,67 ciclos logarítmicos, tabla 4.8) a la obtenida en los ensayos anteriores realizados bajo condiciones no isotérmicas, con los esporos libres (0,79 ciclos logarítmicos, fig. 4.7 B), lo cual indica que la inactivación de los esporos se produce de manera similar, independientemente de que estén libres o en los ITTs. Ambos valores son, además, muy próximos a los 0,66 ciclos logarítmicos que se predicen a partir de la ecuación 1.11, empleando un valor D_{93} de 8,7 min.

Los datos registrados del perfil de temperatura aplicado en el termorresistómetro, permitieron calcular un valor del factor de esterilización físico $F_{93}^{10,8}$ de 5,33 min (tabla 4.9, frente a un factor de esterilización biológico de 5,83 min. calculado a partir de la ecuación 1.11. Este resultado corrobora la adecuación de este microorganismo para la validación de tratamientos térmicos en alimentos ácidos.

Cuando los ITTs fueron introducidos en el reactor T-sensation para estimar la intensidad del tratamiento térmico industrial aplicado a las vesículas de mandarina en el reactor prototipo T-sensation, los resultados mostraron niveles de letalidad similares a los obtenidos en el termorresistómetro (Tabla 4.8) y a los valores de inactivación

estimados utilizando las ecuaciones 1.11 y 1.13 del apartado de antecedentes. No se encontraron diferencias significativas entre los valores obtenidos en las tres repeticiones realizadas en el reactor, ni tampoco con los valores obtenidos en el termorresistómetro. Los factores de esterilización biológicos medios fueron de 7,0, 8,0 y 7,8 minutos (Tabla 4.9) para las tres pruebas realizadas en el T-sensation, frente a los factores de esterilización físicos obtenidos 4,65, 5,65 y 5,63 minutos (sonda 1; tabla 4.9), lo cual indica un sobreprocesado del producto. Estas diferencias son posiblemente debidas a que, debido a su propio diseño, no es posible situar sondas de temperatura en el interior del equipo, en contacto con el alimento, y la determinación del factor de esterilización físico se basa en determinaciones de temperatura obtenidas con sondas situadas en la pared del equipo. La dificultad de controlar la temperatura de los tratamientos térmicos con estas sondas, hace difícil la reproducibilidad de los ensayos, como se puede observar en la gráfica 4.9, donde se muestran los perfiles de temperatura en cada una de las pruebas, de ahí también la variabilidad en los factores físicos obtenidos. Además, tanto la figura 4.8 como los factores de esterilización físicos obtenidos a partir de una segunda sonda situada en otro punto de la pared del equipo, muestran diferencias notables en la estimación de la temperatura incluso en distintos puntos del equipo.

Figura 4.8. Perfiles de temperatura aplicados a los ITTs en el reactor vapor, simulando el tratamiento térmico industrial aplicado a las vesículas de mandarina.

Así pues, y en vista de la buena adecuación de este microorganismo (y, por ende, de los ITTs evaluados) para validar tratamientos térmicos en alimentos ácidos, se puede concluir que el tratamiento térmico que realmente se ha aplicado en el equipo ha sido más intenso de lo necesario y se podría reducir su intensidad ligeramente, con objeto de mejorar la calidad organoléptica y nutritiva de las vesículas de mandarina.

4.2.4. Ajuste de distribuciones a los datos de supervivientes en ITTs.

Los valores del numero de supervivientes obtenido en cada ITT después de las diferentes validaciones tanto en el termorresistómetro como en el reactor prototipo fueron ajustadas a diferentes distribuciones utilizando @RISK 4.5. La 4.10 muestra la bondad del ajuste de las distintas distribuciones estudiadas a los datos, en base a tres parámetros estadísticos distintos (γ^2 , A-D, Y K-S). Los valores de probabilidad (p) fueron generalmente mayores de 0,05, excepto en algunos casos en los que el nivel de significancia fue bajo o los datos no se ajustaron a la distribución.

La distribución logística y normal fueron las que mejor se ajustaron a los datos obtenidos del número de supervivientes presentes en cada ITT después de su tratamiento en el termorresistómetro y en cada una de las pruebas realizadas en el T-sensation. La distribución logística fue también la seleccionada para el numero de supervivientes de ITTs en la validación de un intercambiador de calor tubular (García, 2006). Esta distribución también fue la que mejor ajustaba la variabilidad de los datos obtenidos a las reducciones logarítmicas de células de *E.coli* expuestas a tratamientos de radiación UV en zumo de manzana (Duffy y col., 2000).

Tabla 4.10. Bondad del ajuste de distintas distribuciones a los diferentes datos obtenidos del logaritmo del número de supervivientes después de los tratamientos en el termorresistómetro y en en reactor prototipo a escala piloto.

Equipo	Distribution	test χ^2	test A – D	test K – S
Termorresistómetro	Beta general	0,739 ^a	NA ^a	> 0,1 ^a
	Logistic	0,739	> 0,25	> 0,1
	Normal	0,739	> 0,25	> 0,15
	Triang	0,739	NA	NA
	Weibull	0,739	NA	NA
Reactor prueba 1	Beta general	0,938	NA	NA
	Normal	0,938	> 0,25	> 0,15
	Logistic	0,938	> 0,25	> 0,1
	Triang	0,809	NA	NA
	Weibull	0,736	NA	NA
Reactor prueba 2	Triang	0,728	NA	NA
	Logistic	0,548	$0,025 \leq p \leq 0,05$	> 0,1
	Normal	0,187	< 0,005	$0,025 \leq p \leq 0,05$
	Beta general	0,019	NA	NA
Reactor prueba 3	Logistic	0,939	> 0,25	> 0,1
	Normal	0,939	> 0,25	> 0,15
	Weibull	0,939	NA	NA
	Triang	0,779	NA	NA
	Beta general	< 0,001	NA	NA

NA: No ajusta.

^a p -values of the χ^2 , Anderson-Darling (A-D) and Kolmogorov-Smirnov (K-S) tests

**4.3. CAPITULO III: “Validación del tratamiento térmico
con *Bacillus sporothermodurans* aplicado a un alimento de
baja acidez en el reactor prototipo T-sensation”.**

Para validar el tratamiento térmico de un producto de baja acidez, como es una crema de verduras, se seleccionó *B. sporothermodurans* como el microorganismo más idóneo en base a los datos bibliográficos que se relacionan a continuación y que lo sitúan como uno de los microorganismo más termorresistentes y adecuados para optimizar los procesos de esterilización de alimentos de baja acidez en una gran variedad de condiciones (van Zuijlen y col. 2010).

Huemer y col. (1998), en su estudio sobre la termorresistencia de tres cepas de *B. sporothermodurans*, concluyeron que este microorganismo presenta una excepcional termorresistencia a los procesos UHT, con valores D_{140} entre 3,4 y 7,9 s y un valor z de 13,1-14,2°C. Estos valores de termorresistencia son mucho más altos que los

encontrados por estos mismos autores para *G. stearothermophilus* ($D_{140}=0,9s$), que era anteriormente propuesto para este tipo de estudios.

Van Zuijlen y col. (2010) realizaron un estudio sobre como afectan las condiciones de esporulación a la termorresistencia de *B. sporothermodurans* IC4, en el que concluyeron que *B. sporothermodurans* es un microorganismo adecuado para evaluar y optimizar procesos de esterilización de alimentos porque sus esporos tienen una constante y adecuada termorresistencia, la cual puede llegar a ser máxima utilizando diferentes medios de esporulación. Por todo ello, concluyeron que estos esporos son más adecuados para la validación de procesos, que por ejemplo, los esporos de *G. stearothermophilus*, utilizados normalmente para este fin.

4.3.1 Termorresistencia de *Bacillus sporothermodurans* en condiciones isotérmicas.

La figura 4.9 muestra, a modo de ejemplo, las curvas de supervivencia de *B. sporothermodurans* obtenidas en tampón McIlvaine de pH 7 y en una solución de almidón al 3,5% de pH 6,7 a diferentes temperaturas.

Figura 4.9. Curvas de supervivencia de *Bacillus sporothermodurans* en tampón McIlvaine pH 7,0 a 130°C (A) y en solución de almidón al 3,5% de pH 6,7 a 125°C (B).

Se puede observar la presencia de hombros en ambas curvas de supervivencia, tanto en tampón como en almidón. Este comportamiento ha sido frecuentemente descrito por otros autores para esporos de alta termorresistencia (Le Jean y col., 1994; Palop y col., 1999b; Jagannath y col., 2005) y, en concreto, por van Zuijlen, y col. (2010), para este mismo microorganismo. Tradicionalmente solo la porción lineal de la curva se ha tenido en cuenta, pero estos autores propusieron los modelos de Weibull y de Geeraerd como alternativas no lineales a la cinética logarítmica clásica para describir este comportamiento.

4.3.2. Utilización de los modelos de Weibull y Geeraerd para describir el fenómeno de hombro en la inactivación por calor de los esporos de *B. sporothermodurans* sometidos a tratamientos isotérmicos de calentamiento.

La tabla 4.11 muestra los valores δ obtenidos para un p constante igual a 2,0 con el modelo de Weibull y los valores D y SI , que define la duración del hombro, obtenidos con el modelo de Geeraerd, en tampón McIlvaine de pH 7. Para ambos ajustes se muestran los valores RMSE, que es un estadístico que indica la diferencia entre los valores reales y los predichos con el modelo y, en definitiva, sirve para estimar la bondad del ajuste.

Tabla 4.11. Valores de termorresistencia obtenidos con los modelos de Weibull y Geeraerd para *Bacillus sporothermodurans* en tampón McIlvaine de pH 7.

Temperatura (°C)	Weibull ^a		Geeraerd		
	δ (min)	RMSE	D(min)	SI (min)	RMSE
115,0	11	0,2245	4,8	5,3	0,1060
120,0	2,7	0,3405	0,79	2,10	0,1939
125,0	0,56	0,0843	0,25	0,26	0,0257
130,0	0,11	0,1480	0,067	0,044	0,0711

^a p constante igual a 2,0

La tabla 4.12 muestra los valores δ obtenidos para un mismo valor de p ($p = 1,19$) con el modelo de Weibull y los valores D y SI obtenidos con el modelo de Geeraerd, en almidón. De nuevo en esta tabla se muestran los valores RMSE obtenidos.

Tabla 4.12. Valores de termorresistencia obtenidos con los modelos de Weibull y Geeraerd para *Bacillus. sporothermodurans* en almidón.

Temperatura (°C)	Weibull ^a		Geeraerd		
	δ (min)	RMSE	D(min)	SI (min)	RMSE
120,0	13	0,2830	6,9	6,9	0,2523
120,0	12	0,3065	9,2	4,9	0,2483
125,0	2,9	0,0993	2,7	0	0,0172
125,0	2,4	0,1318	1,7	0,87	0,1170
130,0	0,59	0,0926	0,41	0,19	0,0588
130,0	0,62	0,2780	0,68	0	0,1911
135,0	0,12	1,9355	0,085	0,055	0,0395
135,0	0,14	0,0209	0,11	0,066	< 0,0001

^a p constante igual a 1,19

En las tablas anteriores se puede observar que la termorresistencia de *B. sporothermodurans* fue notablemente más alta en almidón que en tampón McIlvaine de pH 7. Por ejemplo, el valor δ_{130} se redujo en más de 5 veces (de 0,62 a 0,11) al pasar de almidón a tampón (Tablas 4.11 y 4.12). Las diferencias en termorresistencia fueron similares independientemente del modelo usado y se mantuvieron a lo largo de todo el rango de temperaturas investigado.

Los valores δ y D obtenidos en tampón fueron ligeramente menores que los obtenidos por van Zuijlen y col. (2010) para este microorganismo en agua destilada. Como ya se ha comentado en el capítulo anterior, la composición del medio de calentamiento puede determinar la termorresistencia de los microorganismos esporulados. Diversos autores (Stumbo, 1973; Condón y Sala, 1992) han encontrado diferencias en la termorresistencia de los esporos bacterianos, que pueden ser atribuidas

únicamente a la composición del medio. Palop y col. (1999b), cuando observaron una mayor resistencia al calor en un alimento que en tampón del mismo pH, postularon que los nutrientes presentes en el medio podrían proteger a los esporos frente al calor. En este caso, quizás las sales del tampón podrían proteger en cierto modo a los esporos de *B. sporothermodurans*, al menos en comparación con la termorresistencia en agua destilada. La mayor resistencia al calor que se ha observado en solución de almidón podría estar relacionada, además, con la mayor viscosidad de este medio.

De acuerdo a los valores del RMSE, el modelo de Geeraerd ajustó mejor las curvas de supervivencia en condiciones isotérmicas que el modelo de Weibull (Tablas 4.11 y 4.12). No obstante, es de destacar el hecho de que se empleó un único valor del parámetro p para ajustar mediante el modelo de Weibull todas las curvas de supervivencia obtenidas en el mismo medio de calentamiento, es decir, se realizó un único ajuste de Weibull para todas las curvas de supervivencia obtenidas en el mismo medio, mientras que el ajuste de Geeraerd fue individual para cada curva. Es de esperar, entonces, que la bondad del ajuste sea mejor con el modelo de Geeraerd.

Las tablas 4.13 y 4.14 recogen los valores z obtenidos con los modelos de Weibull y Geeraerd, respectivamente, en tampón McIlvaine de pH 7 y almidón, así como sus correspondientes intervalos de confianza para el 95% y coeficientes de correlación (r_0). En el caso del modelo de Geeraerd, se ha calculado también el valor z para el parámetro Sl . La figura 4.10, muestra las curvas de termodestrucción de *B. sporothermodurans* en tampón y en solución de almidón obtenidas con los modelos de Weibull y de Geeraerd.

Tabla 4.13. Valores z de *Bacillus sporothermodurans* obtenidos con el modelo de Weibull en tampón y almidón.

Medio de calentamiento	$z(^{\circ}C)$	IC95%-	IC95%+	r_0
Tampón	7,49	6,72	8,47	0,998
Almidón	7,62	7,30	7,98	0,998

Tabla 4.14. Valores z de *Bacillus sporothermodurans* en tampón y almidón obtenidos con el modelo de Geeraerd.

Medio de calentamiento	$z(^{\circ}\text{C})$	IC95%-	IC95%+	r_0
Tampón	$z(D) 8,34$	6,38	12,04	0,989
	$z(SI) 6,87$	4,71	12,64	0,978
Almidón	$z(D) 7,90$	6,99	9,09	0,991
	$z(SI) 7,53$	6,50	8,96	0,987

Los parámetros z obtenidos en nuestro caso, tanto en tampón como en almidón, fueron similares a los obtenidos por van Zuijlen y col. (2010) para este mismo microorganismo, en agua destilada. No se encontraron diferencias significativas entre los valores z obtenidos en ambos medios de calentamiento (Tablas 4.13 y 4.14 y Fig. 4.10).

Figura 4.10. Gráficas de termodestrucción obtenidas bajo condiciones isotérmicas en tampón McIlvaine de pH 7 y en almidón para *Bacillus sporothermodurans*, con el modelo de Weibull (A) y con el modelo de Geeraerd Z(D) y Z(SI) (B).

Con el modelo de Geeraerd se ha encontrado una relación lineal bastante alta entre el logaritmo del valor SI y la temperatura en ambos medios de calentamiento (Fig. 4.10), la cual permite calcular un valor z para este parámetro ($r_0 > 0,97$; Tabla 4.14). Si

bien hubo curvas de supervivencia en almidón para las que no se observó un fenómeno de hombro apreciable (Tabla 4.12; $S_1 = 0$), y que no fueron incluidas en el ajuste, el valor z obtenido para la duración del hombro indica que ésta está íntimamente relacionada con la temperatura de tratamiento. Además, el hecho de que el valor z obtenido sea similar al obtenido para el valor D , indicaría una termodependencia similar.

4.3.3. Termorresistencia de *B. sporothermodurans* bajo condiciones no isotérmicas.

La Figura 4.11 muestra las curvas de supervivencia obtenidas en almidón en condiciones no isotérmicas, el perfil de temperatura y el correspondiente nivel de inactivación estimado a partir de los datos de termorresistencia obtenidos en condiciones isotérmicas mediante los modelos de Weibull y Geeraerd, utilizando como temperatura de referencia 120°C. El perfil de temperatura aplicado en el termorresistómetro reproduce el tratamiento térmico aplicado en el reactor prototipo a escala piloto T-Sensation, para la esterilización de una crema de verduras.

Figura 4.11. Perfil de temperatura y curvas de supervivencia de esporos de *Bacillus sporothermodurans* en solución de almidón obtenidas aplicando el tratamiento térmico industrial en el termorresistómetro, junto con la curva de supervivencia teórica obtenida aplicando el modelo de Weibull y el modelo de Geeraerd.

Ambos modelos fueron capaces de predecir los supervivientes al tratamiento no isotérmico con razonable precisión, si bien fue el modelo de Weibull el que mejor ajustó estos datos. La bondad de estos ajustes indica, una vez más, lo adecuado que resulta este microorganismo para la validación de procesos térmicos de alimentos de baja acidez (van Zuijlen y col., 2010). Ambos modelos predijeron, no obstante, valores de supervivientes mayores a los obtenidos experimentalmente.

La mejor bondad del ajuste obtenida con el modelo de Weibull, en comparación con el de Geeraerd, estaría posiblemente relacionada con el hecho de que todas las gráficas de supervivencia realizadas en condiciones isotérmicas en almidón fueron ajustadas juntas, empleando un mismo valor de p . Si bien esto mermó la bondad del ajuste en condiciones isotérmicas (tablas 4.11 y 4.12), ahora repercute en unas predicciones más precisas en condiciones no isotérmicas.

4.3.4. Validación del tratamiento térmico aplicado a un alimento de baja acidez a escala laboratorio y a escala planta piloto.

La Tabla 4.15 muestra los valores promedio, máximo y mínimo del logaritmo del número de supervivientes de esporos de *B. sporothermodurans* presentes en cada ITT después del tratamiento industrial aplicado a los ITTs en el termorresistómetro y en dos reactores prototipo T-sensation diferentes, uno que funciona con vapor y otro con agua sobrecalentada, empleando solución de almidón como medio de calentamiento, con sus correspondientes desviaciones estándar y coeficientes de variación. También se muestran los valores promedio, máximo y mínimo del número inicial de esporos presentes en los ITTs utilizados para la validación de estos dos equipos.

Tabla 4.15: Logaritmo del número de esporos de *Bacillus sporothermodurans* presentes en los ITTs antes y después del tratamiento térmico aplicado en el termorresistómetro y en el T-sensation.

Equipo	Media	Máximo	Mínimo	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Inicial	3,44	3,62	3,19	0,12	3,59
Termorresistómetro	2,85	3,00	2,45	0,17	5,87
Reactor vapor Prueba 1	1,92	2,33	1,60	0,17	8,67
Reactor vapor Prueba 2	1,99	2,19	1,76	0,11	5,42
Reactor vapor Prueba 3	2,13	2,41	1,87	0,13	6,25
Reactor agua Prueba 1	3,14	3,29	2,90	0,11	3,58
Reactor agua Prueba 2	3,28	3,50	3,12	0,10	3,05

De nuevo, tal y como ocurría en los ITTs de *A. acidoterrestris*, se observan unos coeficientes de variación de los logaritmos de los recuentos inferiores al 10% en todos los casos, atribuibles a la variabilidad inherente a los recuentos microbiológicos y a las pequeñas diferencias en el número de esporos presente en cada ITT e indicativos de que los tratamientos aplicados fueron homogéneos en todos los casos.

La tabla 4.16 muestra los factores de esterilización biológicos medios calculados a partir de la ecuación 1.12, empleando un valor δ_{120} de 11,99 min y un p de 1,19 para las pruebas realizadas en el termorresistómetro, en el reactor vapor y el reactor agua, así como los factores de esterilización físicos calculados a partir de los perfiles de temperatura en cada una de las pruebas (Fig. 4.12) y utilizando la ecuación 1.13 del apartado de antecedentes, con valor z igual a 7,62°C.

Tabla 4.16. Valores F biológicos medios y valores F físicos determinados con las sondas de temperatura en los tratamientos térmicos aplicados en el termorresistómetro y en el reactor prototipo a escala piloto.

Equipo	F biológico medio	F físico sonda 1	F físico sonda 2
Termorresistómetro	6,13	6,83	
Reactor Prueba 1	15,80	0,85	0,084
Reactor Prueba 2	15,10	1,10	0,14
Reactor Prueba 3	13,58	0,27	0,056
Reactor nuevo Prueba 1	3,08	2,65	2,62
Reactor nuevo Prueba 2	1,65	2,01	2,01

Se empleó únicamente el modelo de Weibull para estimar los factores de esterilización biológicos a partir de los recuentos de supervivientes en los ITTs, ya que este modelo predecía la inactivación microbiana en condiciones no isotérmicas mejor que el de Geeraerd (fig. 4.11).

Cuando los ITTs fueron utilizados para la validación del termorresistómetro utilizando almidón y aplicando el tratamiento térmico industrial aplicado a la crema de verduras, de 121°C, tuvo lugar una inactivación de esporos presentes en los ITTs (0,60 ciclos logarítmicos), similar a la obtenida en los ensayos de termorresistencia de *B. sporothermodurans* realizados bajo condiciones no isotérmicas con los esporos libres (0,82, fig. 4.11), lo cual indica que la inactivación de los esporos se produce de manera similar, independientemente de que estén libres o en los ITTs. Ambos valores son, además, muy próximos a los 0,54 ciclos logarítmicos que se predicen a partir de la ecuación 1.12, empleando un valor δ_{120} de 11,99 min y un p de 1,19.

Los datos registrados del perfil de temperatura aplicado en el termorresistómetro, permitieron calcular un valor del factor de esterilización físico $F_{120}^{7,62}$ de 6,83 min (tabla 4.16), frente a un factor de esterilización biológico de 6,13 min. calculado a partir de la

ecuación 1.12. Este resultado corrobora la adecuación de este microorganismo para la validación de tratamientos térmicos en alimentos de baja acidez.

Cuando los ITTs fueron introducidos en el primero de los reactores T-sensation para validar el tratamiento industrial aplicado a la crema de verduras a 121°C, los resultados mostraron niveles de letalidad muy superiores a los obtenidos en el termorresistómetro, no llegando a quedar microorganismos supervivientes en los ITTs tras el tratamiento térmico (datos no mostrados). Esto hacía inviable la validación y nos llevó a realizar la validación del equipo a 120°C, disminuyendo así la temperatura de tratamiento con el fin de obtener supervivientes en los ITTs.. Estos resultados, junto con los realizados en el reactor que funciona con agua sobrecalentada, también a 120°C, son los que se muestran en las tablas 4.15 (logaritmo del número de supervivientes) y 4.16 (factor F biológico derivado de estos recuentos).

Se encontraron diferencias significativas entre los datos obtenidos en ambos reactores y con los obtenidos en el termorresistómetro. Incluso las hubo entre los valores obtenidos de la tercera prueba realizada en el reactor vapor con respecto a las dos primeras. Estas diferencias se deben a la dificultad de reproducir tratamientos iguales en este equipo, como se muestra en la figura 4.21, debido a la dificultad de controlar la temperatura de producto, ya que las sondas de temperatura se sitúan en la pared del equipo y no en su interior.

Los factores biológicos obtenidos (15,80, 15,10 y 13,58, tabla 4.16) en las pruebas realizadas en el reactor vapor fueron muy superiores a los factores físicos calculados (0,85, 1,10, 0,27, tabla 4.16) indicando que, aun después de haber reducido la temperatura de tratamiento en 1°C, se había producido un intenso sobreprocesado del producto, debido de nuevo a la dificultad en la estimación de la temperatura en el interior del equipo.

Figura 4.21. Perfiles de temperatura aplicados a los ITTs en el reactor vapor y en el reactor agua, simulando el tratamiento térmico industrial aplicado a una sopa de verduras.

Para confirmar este sobreprocesado del producto en el reactor y comprobar si el no obtener microorganismos supervivientes al final del tratamiento a 121°C era problema del reactor o si por el contrario el problema estaba en los ITTs elaborados, se procedió a la realización de una prueba en otro prototipo de reactor que en lugar de utilizar vapor como fluido calefactor utiliza agua sobrecalentada (reactor agua), lo cual facilita el control de la temperatura. Ambas pruebas se realizaron a una temperatura de mantenimiento de 120°C. Los resultados obtenidos en las dos pruebas realizadas en este reactor se muestran en las dos últimas filas de la tabla 4.15, en la que se observan valores de inactivación inferiores a los obtenidos en el termorresistómetro, lo cual confirma el sobreprocesado del producto en el reactor vapor debido al difícil control de la temperatura del producto, cuando se utiliza vapor como medio calefactor en la camisa de calentamiento del reactor T-Sensation.

En las pruebas realizadas en este último reactor los factores de esterilización biológicos obtenidos fueron de 3,08 y 1,65 minutos para las dos pruebas realizadas. Estos valores son inferiores al obtenido en el termorresistómetro, lo cual era de esperar, ya que el tratamiento aplicado fue menos intenso. Además estos valores fueron mucho más parecidos a los factores de esterilización físicos correspondientes (2,65 y 2,01 minutos respectivamente) que en el caso del reactor vapor, indicativo de un control de la temperatura mucho más preciso en este reactor.

Estos resultados ponen de nuevo de manifiesto la utilidad de los ITTs microbiológicos para la validación de tratamientos térmicos, especialmente cuando la medida de la temperatura en el interior de los equipos es incierta.

4.3.5. Análisis estadístico.

Los valores del número de supervivientes obtenidos en cada ITT, después de las diferentes validaciones tanto en el termorresistómetro como en los dos reactores prototipo utilizados, fueron ajustadas a diferentes distribuciones utilizando @RISK 4.5. La tabla 4.17 muestra los valores de probabilidad (p) que proporciona el programa, los cuales fueron generalmente mayores de 0,05, excepto en algunos casos en los que el nivel de significancia fue bajo o los datos no se ajustaron a la distribución.

Tabla 4.17. Distribuciones que mejor se ajustan a los diferentes datos obtenidos del número de supervivientes después de los tratamientos en el termorresistómetro y en los reactores prototipo a escala piloto

Tratamiento	Distribution	χ^2 test	A – D test	K – S test
Termorresistómetro	Gamma	NA ^a	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Extreme value	0,386	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Lognormal	NA ^a	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Triangular	NA ^a	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Weibull	NA ^a	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
Reactor prueba 1	Gamma	0,457	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$

	Lognormal	0,313	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Logistic	0,457	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Triangular	0,066	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Normal	0,313	$\geq 0,1$	0,411
Reactor prueba 2	Lognormal	0,176	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Normal	0,178	$\geq 0,1$	0,329
	Gamma	0,177	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Uniforme	0,541	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
Reactor prueba 3	Normal	0,736	$\geq 0,1$	0,725
	Weibull	0,222	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Triangular	0,126	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Gamma	0,990	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Lognormal	0,990	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Uniforme	0,143	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
Reactor nuevo prueba 1	Normal	0,475	$\geq 0,1$	$\geq 0,125$
	Extreme value	0,475	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Gamma	0,475	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Lognormal	0,475	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Weibull	0,320	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
Reactor nuevo prueba 2	Normal	0,391	$\geq 0,1$	0,927
	Gamma	0,391	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Logística	0,392	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Lognormal	0,188	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Uniforme	0,188	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$
	Weibull	0,550	$\geq 0,1$	$\geq 0,1$

NA: No ajusta

Si bien estos resultados no muestran ninguna distribución que claramente ajuste mejor todos los datos que el resto, la distribución normal, que era una de las que mejor se ajustaban a los datos en el capítulo anterior, se repite en este caso en bastantes de los grupos de datos, como una de las que mejor ajusta. Esto es especialmente cierto en el reactor que funciona con agua sobrecalentada, que es el que aplicaría un tratamiento más adecuado a lo necesario.

5. CONCLUSIONES

1. **La termorresistencia de *Bacillus megaterium*, *Bacillus licheniformis* y de las dos cepas de *Bacillus subtilis* (AdHC1 y CECT 4522) no es adecuada para evaluar el tratamiento térmico que se aplica a los alimentos ácidos**, como vesículas de mandarina. *Bacillus megaterium* y *Bacillus licheniformis* han mostrado una termorresistencia demasiado baja a pH 3,5 (valores $D_{95} = 0,61$ min y $D_{95} = 0,86$ min respectivamente). Por el contrario, *Bacillus subtilis* AdHC1 y *Bacillus subtilis* CECT 4522 han mostrado una termorresistencia demasiado elevada a este pH (valores $D_{95}=8,58$ y $D_{95}=7,36$ min respectivamente).
2. **No se ha logrado incrementar la termorresistencia de *Bacillus megaterium* en medio ácido (pH 3,5)**. La termorresistencia de este microorganismo no se ve afectada ni por la temperatura ni por el medio de esporulación, ni por la aplicación de un tratamiento de mineralización con calcio o manganeso.
3. **La termorresistencia de *Bacillus atrophaeus* y especialmente de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, es adecuada para la validación biológica del tratamiento térmico industrial de alimentos ácidos** (valores $D_{95}=1,58$ min y $D_{95}=1,96$ min respectivamente en medio ácido, de pH=3,5). *Alicyclobacillus acidoterrestris* muestra además curvas de supervivencia lineales, sin hombros ni colas, y con resultados reproducibles y predecibles cuando se expone a condiciones isotérmicas a pH ácido.
4. ***Alicyclobacillus acidoterrestris* es entre un 35 y un 55% más termorresistente en zumo de mandarina que en tampón McIlvaine del mismo pH (3,5)** a todas las temperaturas de tratamiento investigadas, no observándose diferencias significativas entre los valores z obtenidos en ambos medios. Las diferencias en termorresistencia se mantuvieron en condiciones no isotérmicas de tratamiento.
5. **Cuando *Alicyclobacillus acidoterrestris* se expone a condiciones no isotérmicas, la letalidad de los tratamientos se puede predecir utilizando el modelo lineal tradicional (Bigelow)**. Por lo tanto es un microorganismo

apropiado para ser utilizado en la validación de tratamientos térmicos aplicados a los alimentos ácidos, tales como las vesículas de mandarina.

6. **La termorresistencia de *Bacillus sporothermodurans* es adecuada para la validación biológica del tratamiento térmico industrial de alimentos de baja acidez** (valor $D_{120}=0,79$ min en tampón de pH 7). *Bacillus sporothermodurans* muestra curvas de supervivencia con hombros persistentes cuando se expone a condiciones isotérmicas a pH neutro que, no obstante, son reproducibles y predecibles mediante el uso de modelos no lineales como el de Weibull o el de Geeraerd.
7. ***Bacillus sporothermodurans* es aproximadamente cinco veces más termorresistente en disolución de almidón que en tampón McIlvaine del mismo pH (7)** a todas las temperaturas de tratamiento investigadas, no observándose diferencias significativas entre los valores z obtenidos en ambos medios. Las diferencias en termorresistencia se mantuvieron en condiciones no isotérmicas de tratamiento.
8. **Cuando *Bacillus sporothermodurans* se expone a condiciones no isotérmicas, la letalidad de los tratamientos se puede predecir utilizando modelos no lineales, como el modelo de Weibull o el de Geeraerd.** Por lo tanto es un microorganismo apropiado para ser utilizado en la validación de tratamientos térmicos aplicados a los alimentos de baja acidez, tal como una crema de verduras.
9. **Las validaciones biológicas realizadas permiten concluir que la distribución de calor en los reactores T-sensation es homogénea.** Todas las repeticiones de las validaciones biológicas realizadas muestran coeficientes de variación de los logaritmos de los recuentos de supervivientes en los ITTs inferiores al 10%, tanto por debajo como por encima de 100°C y tanto en el que funciona con vapor como con el que funciona con agua sobrecalentada. Estos coeficientes de variación fueron similares a los obtenidos en el termorresistómetro. Las

distribuciones logística y normal son las que mejor describen la variabilidad de estos.

10. **La comparación de las validaciones biológicas realizadas con las respectivas validaciones físicas han permitido detectar sobreprocesados en los tratamientos térmicos aplicados.** Las temperaturas alcanzadas en el interior de los reactores eran, según las validaciones biológicas, muy superiores a las que indicaban las mediciones de temperatura registradas por las sondas.

Estas conclusiones ponen de manifiesto la conveniencia de llevar a cabo validaciones biológicas de los tratamientos térmicos que se aplican en la industria alimentaria, especialmente cuando la medida de la temperatura en el interior de los equipos es incierta. Además demuestran que la metodología desarrollada en esta Tesis Doctoral, basada en el empleo de ITTs microbiológicos, es adecuada para llevar a cabo estas validaciones.

6. BIBLIOGRAFÍA

-A-

Adams, D.M. (1978). "Heat injury of bacterial spores" *Adv. Appl. Microbiol.*, 23: 245-261.

Aiba, S. y Toda, K. L. (1967). "Thermal death rate of bacterial spores". *Process Biochemistry*, 36: 38-41.

Alderton, G., Ito, I.A. y Chen, J.K. (1976). "Chemical manipulation of the heat resistance of *Clostridium botulinum* spores". *Appl. Environ. Microbiol.*, 31: 492-498.

Alderton, G., y Snell, N. (1963). "Base exchange and heat resistance in bacterial spores". *Biochem. And Biophys. Research Com.*, 10 (2): 139-143.

Alderton, G., y Snell, N. (1970). "Chemical states of bacterial spores: heat resistance and its kinetic at intermediate water activity". *Appl. Microbiol.*, 19(4): 565-572.

Alderton, G., Thompson, P.A. y Snell, N. (1964). "Heat adaptation and ion exchange in *Bacillus megaterium* spores". *Science*. 143:141-143.

American Can Company, (1945). "The canned food reference manual". American Can Company. New York.

Anonymous. (2000). Special supplement. "Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies" Anonymous, US Food and Drug Administration: how to quantify the destruction Kinetic of alternative processing technologies. *J. Food Sci.*, 4-108.

Atrih, A., Bacher, G., Korner, R., Allmaier, G., y Foster, S.J. (1999). "Structural analysis of *Bacillus megaterium* KM spore peptidoglycan and its dynamic during germination". *Microbiol.*, 145: 1033-1041.

Atrih, A., Zollner, P., Allmaier, G., Williamson, M. y Foster, S.J. (1998). "Peptidoglycan structural dynamics during germination of *Bacillus subtilis* 168 endospores". *J. Bacteriol.*, 180: 4603-4612.

-B-

Bahçeci, K.S., y Acar, J. (2007). "Modeling the combined effects of pH, temperature and ascorbic acid concentration on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris*". *Int. J. Food Microbiol.*, 120: 266-273.

Ball, C. O., (1923). "Thermal process time for canned food". Boletín de National Research Council of U.S.A., 7: 1-6.

Ball, C.O., y Olson, F.C.W. (1957). "Sterilization in food technology theory, practice and calculation". McGraw-Hill, New York.

Banwart, G.J., (1979). "Basic food microbiology". Avi Pub. Co., Wersport, CT.

Bauer, B.A., y Knorr, D. (2005) "The impact of pressure, temperature and treatment time on starches: pressure-induced starch gelatinisation as pressure time temperature indicator for high hydrostatic pressure processing" *J. Food Engineering*, 68: 329–334.

Baumgart, J., Husemann, M., Schimdt, C. (1997). "*Alicyclobacillus acidoterrestris*: occurrence, importance, and detection in beverages and raw materials for beverages". *Flussiges Obst*. 64: 178-180.

Beaman, T.C. y Gerhardt, P. (1986). "Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization and thermal adptation". *Appl. Environ. Microbiol.*, 52 (6): 1242-1246.

Beaman, T.C., Koshlkawa, T., Pankratz, H.S. y Gerhardt, P. (1984). "Dehydration partitioned within core protoplast accounts for heat resistance of bacterial spores". *FEMS Microbiology Letters*, 24: 47 -51.

Beaman, T.C., Pankratz, H.S. y Gerhardt, P. (1988). "Heat shock affects permeability and resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores". *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(10): 2515-2520.

Bean, P.G., Dallyn, H., Ranjith, H.M.P. (1979b). "The use of alginate spore beads in the investigation of ultra-high temperature processing". *J. Food Tech.*, 281-294.

Bean, P.G., Dallyn, H., Ranjith, H.M.P. (1979a). "Food Microbiology and Technology". Reviews of the International Meeting on Food Microbiology and Technology". Parma, Italia. Edit.: Jarvis, Christian, Michener.

Belliveau, B.H., Beaman, T.C. y Gerhardt, P. (1990). "Heat resistance correlated with DNA content in *Bacillus megaterium* spores". *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 2919-2921.

Bender, G.R, y Marquis, R.E. (1985). "Spore heat resistance and specific mineralization". *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 1414-1421.

Berg, R.W. y Sandine, W.E. (1970). "Activation of bacterial spores. A review". *J. Milk Food Technology*, 33:435-441.

Berry M.F., Singh R.K., Nelson P.E. (1989). "Kinetics of methilmethionine sulfonium in butter solutions for estimating thermal treatment of liquid foods". *J. Food Process Preservation*, 13: 475-488.

Berry, M.J. y Bradshaw, J.G. (1986). "Comparison of sterilization values from heat penetration and spore count reduction in agitating retorts". *J. Food Sci.*, 51: 477-482.

Bertrand, K. (2005) "Microwavable Foods Satisfy Need for Speed and Palatability". *Food Tech.*, 59: 1

Betts, G. y Everis, L. (2000). "Shelf-life determination and challenge testing" In: *Chilled Foods: A comprehensive Guide* (edited by G. Betts and L. Everis). Pp: 259-285. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

Beuchat, L.R. (1988). "Influence of organic acids in the heat resistance characteristics of *Talaromyces flavus* ascospores". *Int. J. Food Microbiol.*, 22: 239-247.

Bigelow, W.D. (1921). "The logarithmic nature of thermal death time curves". Ed. National Canner Assoc. Bulletin.

Blasco, R., Esteve, M.J., Frigola, A., y Rodrigo, M. (2004). "Ascorbic acid degradation Kinetics in mushrooms in a high-temperature short-time process controlled by a thermoresistometer". *LWT-Food Sci. and Tech.*, 37: 171-175.

Blocar, J.C. y Busta, F.F. (1983). "Bacterial spore resistance to acid" *Food Tech.*, 37: 87-99.

Blocher, J.C. y Busta, F.F. (1983). "Bacterial spore resistance to acid". *Food Tech.*, 37(11): 87-89.

Boland, I., Noback, M., Bron, S., Paidhungat, M. y Setolw, P. (1998). "Characterisation of yhcN, a new forespore-specific gene of *Bacillus subtilis*". *Gene*, 212:179-188.

Brown, H.M., (1991). "The use of chemical and biochemical markers in the retrospective examination of thermally processed formulated meats". Technical memorandum 625. Chipping Campden, U.K.: Campden & Chorleywood Food Research Association.

Brown, K. L. (1995) "New microbiological spoilage challenges in aseptics: *Alicyclobacillus acidoterrestris* spoilage in aseptically packed fruit juices". *T. Ohlsson*, 1-14.

Brown, K.L. y Ayres, C.A. (1982). "Thermobacteriology of UHT processed foods". In "Developments in food microbiology" Davies, R. (ed.) *Appl. Sci. Publishers Ltd*, Londres.

Brown, K.L., y Thorpe, R.H. (1979). "The relationship between pH and the heat resistance and recovery of bacterial spores". Campden Food Preservation Research Association, Chipping Campden, U.K. Technical Memorandum nº 226.

Brown, K.L., Ayres, C.A., Gaze, J.E., Newman, M.E., (1984). "Thermal destruction of bacterial spores inmovilized in food/alginate particles". *Food Microbiol.*, 1(3):187-198.

Brown, K.L. y Gaze, J.E. (1985). "Spore studies in relation to heat processed food. Desing of a thermoresistometer and spore production and heat resistance of spore of PA 3679 and *Bacillus stearothermophilus*". Tecnical Memorandum nº 411. Campdem Food Preservation Research Association.

Brown, K.L., Gaze, J.E., (1986). "Construction of a thermoresistometer". Technical Memorandum nº 437. Campden Food Preservation Research Association.

-C-

Cameron, M.S., Leonard, S.J., Barret, E.L. (1980). "Effect of moderately acidic pH on heat resistance of *Clostridium sporogenes* spores in phosphate buffer and in buffered pea puree". *Appl. and Enviromental Microbiol.*, 39(5): 943-949.

Casp, A. y Abril, J. (2003). "Procesos de Conservación de Alimentos" 2ª edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.

- Cazemier, A.E. y Wagenaars, S.F.M. (2001). "Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli" *J. Appl. Microbiol.*, 90: 761-770.
- Cerny G., (1980). "Dependence of thermal inactivation of microorganisms on the pH-value of media". II. Bacterial and bacterial spores. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 170: 180-186.
- Cerny, G., W. Hennlich, y K. Poralla. (1984). "Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoiling microorganism". *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 179: 224-227.
- Ceviz, G. Tulek, Y., Con, A.H. (2009). "Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different heating media". *Int. J. Food Sci. Technol.*, 44: 1770-1777.
- Chen, D. A. (1990). "New method for HTST sterilization of particulate foods". Ph. D. thesis, Purdue University, West Lafayette, IN, USA.
- Chick, H. (1910). "The process of disinfection by chemical agencies and hot water". *J. Hygiene.*, Cambridge 10: 237-286.
- Chirakkal, H., O'Rourke, M., Atrih, A., Foster, S. y A. Moir (2002). "Analysis of spore cortex lytic enzymes and related proteins in *Bacillus subtilis* endospore germination". *Microbiol.*, 148: 2383-2392.
- Claeys, W. L., Van Loey, A. M., y Hendrickx, M. E. (2003). "Review: are intrinsic TTIs for thermally processed milk applicable for high-pressure processing assessment" *Innov. Food Sci. and Emerging Tech.*, 4:1-14.
- Claeys, W.L., Ludikhuyze, L.R., Hendrickx, M.E. (2001). "Formation kinetics of hydroxymethylfurfural, and furosine in milk heated under isothermal and nonisothermal conditions". *J. of Dairy Res.*, 68, 287-301.

Cole, M.B., Davies, K.W., Munro, G., Holyoak, C.D. y Kilsby, D.C. (1993). "A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*". *J. Appl. Microbiol.*, 12: 232-239.

Condón, S. y Sala, F.J. (1992). "Heat resistance of *Bacillus subtilis* in buffer and foods of different pHs". *J. Food Prot.* 55 (8): 605-608.

Condón, S., López, P. Oria, R. y Sala, F.J. (1989). "Thermal death determination: design and evaluation of a thermoresistometer". *J. Food Sci.*, 54 (2): 451-457.

Condón, S., Arrizubieta, M.J. y Sala, F.J. (1993). "Microbial heat resistance determinations by the multipoint system with the thermoresistometer TR-SC. Improvement of this methodology". *J. Microbiol. Methods.*, 18: 357-366.

Condón, S., Bayarte, M., Sala, F.J. (1992). "Influence of the sporulation temperature upon the heat resistance of *Bacillus subtilis*". *J. Appl Bacteriol.*, 73(3):251-6.

Conesa, R., Andreu, S., Fernández, P.S., Esnoz, A., Palop, A. (2009). "Non-isothermal heat resistance determinations with the thermoresistometer Mastia". *J. Appl Microbiol.*, 107: 506-513.

Conesa, R. (2001). "Resistencia al calor de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en tampón y zumo de naranja". Proyecto fin de carrera. Universidad Politécnica de Cartagena.

Conesa, R., Periago, P.M., Esnoz, A., López, A. y Palop, A. (2003). "Prediction of *Bacillus subtilis* spore survival after a combined non-isothermal/isothermal heat treatment". *Eur. Food Res. Technol.*, 217: 319-324.

Cook, A.M. y Brown, M.R. (1965). "Relationship between heat activation and percentage colony formation for *Bacillus stearothermophilus* spores: effect of storage and pH on the recovery medium". *J. Appl. Bacteriol.*, 28: 361-364.

Cook, A.M. y Gilber, R.J.(1968). "Factors affecting the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. I. The effect of recovery condition on colony count of unheated and heated spores ". *J. Food Tech.*, 3: 285-293.

Coote, J.G. y Binnie, C. (1981)."Association between DNA replication and interference by bromodeoxyuridine with sporulation in *Bacillus subtilis*". En: Sporulation and germination (H.S. Levinson, A.L. Sonenshein y D.J. Tipper, eds. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington D.C. pags: 157-162.

Cunha, L.M., Oliveira, F.A.R., Oliveira, J.C. (1988). "Optimal experimental design for estimating the kinetic parameters of processes described by the Weibull probability distribution function". *J. of Food Engineering*, 37:175-191.

-D-

Dalryn, H., Fallon, W.C. y Bean, P.G. (1977). "Method for the immobilization of bacterial spores in alginate gel". *Laboratory Practice*, 26: 773-775.

Darland, G. y Brock, T.D. (1971). "*Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore forming bacterium". *J. of General Microb.*, 67:9-15.

David, J.R.D. y Merson, R.L. (1990). "Kinetic parameters for inactivation of *Bacillus stearothermophilus* at high temperatures". *J. Food Sci.*, 55: 488-493.

David, J.R.D., (1985). "Kinetics of activation of bacterial spores at high temperatures in a computer-controlled reactor". Tesis Doctoral. Universidad de California. Davis.

Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N. y Ginseberg, H.S. (1996). Tratado de microbiología, 4ª edición. Editorial Masson S.A., Barcelona.

De Cordt, S., Hendrickx, M., Maesmans, G. y Tobback, P. (1992). "Immobilized alfa-amylase from *Bacillus licheniformis*: a potential enzymatic time-temperature integrator for thermal processing". *Int. J. Food Sci. Tech.*, 27: 661-673.

De Ritter, E. (1982). "Effect of processing on nutritive content of food: vitamins". En: Handbook on the nutritive values of processed foods. Vol 1. Ed. CRC Press.

Deinhard, G., P. Blanz, K. Poralla y Altan, E. (1987). "*Bacillus acidoterrestris* sp. Now a new thermotolerant acidophile isolated from different soils". *Syst. Appl. Microbiol.*, 10: 47-53.

Denys, S., Van Loey, A. M., y Hendrickx, M. E. (2000). "A modelling approach for evaluating process uniformity during batch high hydrostatic pressure processing: combination of a numerical heat transfer model and enzyme inactivation Kinetic". *Innov. Food Sci. & Emerging Tech.*, 1: 5-19.

Downing, D.L. (1996). "A complete course in canning and related processes", vol 1. CTI Publications, Baltimore.

Duffy, S., Churey, J., Worobo, R.W., Schaffner, D.W. (2000) "Analysis and modeling of the variability associated with UV inactivation of *Escherichia coli* in apple cider". *J. Food. Prot.*, 63:1587–1590.

Durak, M.Z., Churey, J.J., Danyluk, M.D., Worobo, M.W. (2010). "Identification and haplotype distribution of *Alicyclobacillus* spp. from different juices and beverages". *Int. J. Food Microbiol.*, 142: 286-291.

-E-

Eichler, J. (2001). "Biotechnological uses of archaeal extremozymes". *Biotechnology Advances*, 19, 261-278.

Eiroa, M.N.U., Junqueira, V.C.A., Schmidt, F.L. (1999). "Alicyclobacillus in orange juice: occurrence and heat resistance of spores". *J. Food Prot.*, 62: 883-886.

Esselen, W. B., Pflug, I. J., (1956). "Thermal resistance of putrefactive anarobe PA 3679 spores in vegetables in the temperature range of 250-290°F". *Food Tech.*, 11:557-560.

-F-

Fellows, P. (1994). "Tecnología del procesado de los alimentos: Principios y prácticas". Editorial Acribia S.A., Zaragoza.

Fernández P.S., Ocio M.J., Rodrigo F., Rodrigo M., Martinez A. (1996). "Mathematic model for the combined effect of temperature and pH on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* and *Clostridium sporogenes* spores". *Int. J. Food Microbiol.*, 32: 225-233.

Fernández, A., Collado, J., Cunhan, L.M., Ocio, M.J., Martinez, A. (2002). "Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperatura on the thermal resistance of *Bacillus cereus* in vegetable substrate". *Int. J. of Food Microbiol.*, 77:147-153.

Fernández, A., Ocio, M.J., Fernandez, P.S., Rodrigo, M., Martínez, A. (1999a). "Application of nonlinear regresión análisis to the estimation of kinetic parameters for two enterotoxigenenic strains of *Bacillus cereus*". *Food Microbiol.*, 16:607-613.

Fernandez, A., Salmeron, C., Fernández, P.S., Martinez, A. (1999b). "Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*". *Trends in Food Sci. and Tech.*, 10: 158-162.

Fernández, P.S., Ocio, M.J., Sánchez, T., Martínez, A. (1994). "Thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores heated in acidified mushroom extract". *J. Food Prot.*, 57 (1): 37-41.

Fernández, P.S., Gómez, F.J., Ocio, M.J., Sánchez, T. y Matínez, A. (1995). "D values of *Bacillus stearothermophilus* spores as function of pH and recovery medium acidulant". *J. Food Prot.*, 58: 628-632.

Fink, A. y Cerny, G. (1988) "Microbiological principles of short-time sterilization of particulate food". In: *Processings of the International symposium on Progress in Food Preservation Process*, Ceria, Brussels, Belgium, Vol. 2, pp. 185-190.

Foschino, R., Galli, A. y Ottogalli, G. (1990). "Research on the Microflora of UHT milk" *Annali di Microbiología ed Enzimología*, 40, 47-59.

Foster, S. J. y Johnstone, K. (1989). "The trigger mechanism of bacterial spore germination". En: *Regulation of prokaryotic development* (I. Smith, R. A. Slepecky y P. Setlow, eds) *Am. Soc. Microbiol.*, Washington D. C, pags: 89-108.

Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe JF, Debevere, J. (2005) "Modeling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*". *Int. J. Food Microbiol.*, 100:41–53.

Freese, E. y Heinze, J. (1983): "Metabolic and genetic control of bacterial sporulation". En *The bacterial spore*. Vol 2. Edit: Hurst, A.; Gould, G.W. Academic press. Londres.

Fu, B., y Labuza, T. P. (1995). "Potential use of time–temperature indicators as an indicator of temperature abuse of MAP products. In J. M. Farber, & K. L. Dodds (Eds.), *Principles of modifiedatmosphere and sous vide product packaging* (pp. 385–423). USA: Technomic Publishing Company, Inc.

-G-

García, P. (2006) “Optimización y modelización del procesado aséptico HTST (High Temperature Short Time) y su aplicación al cremogenado de fresa”. Tesis Universidad Politécnica de Cartagena, Cartagena, España.

Gavin, W. (1988). “Canned foods. Principles of thermal process control, acidification and container closure evaluation” 5ª edición. Published by the Food Processors Institute, Washington D.C.

Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., Van Impe, J.F. (2000). “Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment” *Int. J. Food Microbiol.*, 59 185–209.

Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F. (2005) “GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves”. *Int. J. Food Microbiol.*, 102: 95–105.

Gerhardt, P. y Marquis, R. E. (1989). “Spore thermoresistance mechanisms”. En : Regulation of prokaryotic development (I. Smith, R.A. Slepecky y P. Setlow, eds) Am. Soc. microbiol., Washington D. C. Pags: 43-63.

Godia, F., Casas, C., Castellano B., y Solá, C. (1987). “Immobilized cells: Behaviour of carragenan entrapped yeast during continuous ethanol fermentation”. *Appl. Microbiol. and Biotec.*, 26: 342-346.

Gombas, D.E. 1983. “Bacterial spore resistance to heat”. *Food Tech.*, 37(11): 105-110.

Gombas, D.E., Gómez, R.F. (1978). “Sensitization of *Clostridium perfringens* spores to heat by gamma radiation”. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36(3):403-7.

Gómez, N. (2006). “Modelización de la inactivación microbiana por pulsos eléctricos de alto voltaje”. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria.

González, I., López, M., Mazas, M., González, J. y Bernardo, A. (1995). "The effect of recovery conditions on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores". *J. Appl. Bacteriol.*, 78: 548-554.

Gould, G. W. (1989) "Heat induced injury and inactivation". En: Mechanisms of action of food preservation procedures (G.W. Gould, ed.). Elsevier Appl. Sci.. Londres, 11-42.

Gould, G., Dring G.J., (1975). "Heat resistance of bacterial endospores and concept of an expanded osmoregulatory cortex" *Nature*, 258: 402-405.

Gould, G.W., (1977). "Recent advances in the understanding of resistance and dormancy in bacterial spores". *J. Appl. Bacteriol.*, 42:297-302.

Gould, G.W., (1984). "Injury and repair mechanisms in bacterial spores. En "The revival of injured microbes". Edit: Andrew, M.H.E.; Russell, A.D. Academic Press. Londres.

Guiavarc'h, Y., Van Loey, A., Zuber, F. y Hendrickx, M. (2004). "*Bacillus licheniformis* α -amylase immobilized on glass beads and equilibrated at low moisture content: potentials as a Time-Temperature Integrator for sterilisation process". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5, 317-325.

-H-

Hammer, P., Lembke, F., Suhren, G., y Heeschen, W. (1995) "Characterization of a heat-resistant mesophilic *Bacillus* species affecting quality of UHT milk-a preliminary report". *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 47: 297-305.

Han, Y.W., (1975). "Death rates of bacterial spores: nonlinear survivor curve". *Canadian J. of Microbiol.*, 21: 1464-1467.

Han, Y.W., Schuyten, H.A., Callihan, C.D., (1971). "Combined effect on heat and alkali in sterilizing sugarcane bagasse". *J. Food Sci.*, 36:335-338.

Han, Y.W., Zhang, H.I., Krochta, J.M., (1976). "Death rates of bacterial spores: mathematical models". *Canadian J. Microbiol.*, 22(2):295-300.

Hanson, R. S., Curry, M. V., Garner, J. V. y Halvorson, H.O. (1972). "Mutants of *Bacillus cereus* strain that produce thermoresistent spores lacking dipicolinate and have low levels of calcium". *Can. J. Microbiol.* 18: 1139-1143.

Hayakawa, K., Matsuda, N., Komaki, K., Matsunawa, K., (1981). "Computerized estimation of reaction kinetic parameters for thermal inactivation of microorganism". *Lebensm.-Wiss. u. Technol.*, 14(2):70-78.

Hayakawa, K.I. (1977). "Prediction of nutrients in thermally processed canned food – review". *Journal of the association of official analytical chemists.* 60 (6): 1243-1247.

Hayakawa, K.I. y Timbers, G.E. (1977). "Influence of the heat treatment on the quality of vegetables: changes in visual green colour". *J. Food Sci.*, 42: 778-781.

Heredia, N. L, García, G. A. Luevanos, R., Labre, R. G y García Alvarado, J. S. (1997) "Elevation fo the heat reistance of vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* type A by sublethal heat shock" *J. Food Prot.* 60: 998-100.

Hersom, A.C. y Hutland, E.D. (1985). "Conservas alimenticias". Ed. Acribia, Zaragoza.

Hills, BP., y Mackey, B.M., (1995). "Multi-compartment kinetic models for injury, resuscitation induced log and growth in bacterial cell populations". *Food Microbiol.*, 12: 333-346.

Hippchen, B., A., Roll y Poralla, K. (1981). "Ocurrence in soil of thermoacidophilic bacillis possesing w-cyclohexane fatty acids and hopanoids". *Archs. Microbiol.* 129:53-55.

Holdsworth, S.D., (1997). "Thermal processing of packaged foods". London: Blackie Academic Professional.

Holyoak, C.D., Tansey, F.S. y Cole, M.B. (1993). "An alginate Beads Technique for Determining the safety of Microwave Cooking". *Lett. Appl. Microbiol.* 16, 62-65.

Huemer, I. A., Klijn, N., Vogelsang, H. W. J., y Langeveld, L.P.M. (1998). "Thermal death Kinetic of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk". *Int. Dairy J.*, 8, 851-855.

Humphrey, A. E., y Nickerson, Jhon T. R. (1961) "Testing Thermal Death for significant non logarithmic behavior". *Appl. Environ. Microbiol.*, 9(4): 282-286.

-J-

Jamieson, L., y Williamson, P. (1999). "The potential of electrotechnologies for the processing of foods". *Food Sci. and Tech. Today*, 13(2), 97-101.

Jagannath, A., Tsuchido, T., y Membré J.M. (2005). "Comparison of the thermal inactivation of *Bacillus subtilis* spores in foods using the modified Weibull and Bigelow". *Food microbiol.* 22: 233-239

Jay, J.M., (1996). "Modern food microbiology". New York: Chapman Hall.

Jedrzejewski, M.J. y Setlow, P. (2001). "Comparison of the binuclear metalloenzymes diphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase and alkaline phosphatase: their mechanism of catalysis by a phosphoserine intermediate". *Chem Rev* 101: 607–618.

Johnstone, K (1994). "The trigger mechanism of spore germination: current concepts" *J. Appl. Bacteriol., Symposium supplement*, 76: 17-24.

-K-

Katzin, L.I., Sandholzer, L.A., Strong, M.E. (1943). "Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization". *J. Bacteriol.*, 45: 256-272.

Kessler, H.G., Pfeifer, J. and Schowoppe, C. (1994). "Untersuchungen ueber hitzeresistente mesophile *Bacillus*-Sporen in UHT Milch". *Deutsche Milchwirtschaft* 13, 588-592.

Keynan, A. (1978). "Spore structure and its relation to resistance, dormancy and germination". En: Spores VII (G. Chambliss y J.C. Vary, eds) *Am. Soc. Microbiol.*, Washington D. C. Pags:43-53.

Keynan, A. y Sandler, N. (1983). "Spore research in historical perspective". En: The bacterial spore. Vol 2 (A. Hurst y G. W. Gould, eds) Academic Press Inc., Londres. Pags: 2-49.

Khoury, P.H., Lambardy, S.J.b y Slepecky, R.A., (1987). "Perturbation of the heat resistance of bacterial spores by sporulation temperature and ethanol". *Current Microbiol.*, 15: 15-19.

Kim, H.J., Taub, I.A., Choi, Y.M. y Prakash, A. (1996) "Principles and Application of Chemical Markers of Sterility in High Temperature Short-time Processing of Particulate Foods" in ACS Symp. Series 631, 54-69.

King, A.D., Bayne, H.G. y Alderton, G., (1979). "Non logarithmic death rate calculation for *Bysoclamys fulva* and other microorganism". *Appl. and Environmental Microbiol.*, 37(3):596-600.

Klijn, N., Herman, L. Langeveld, L. P. M., Wagendorp, A.A., Huemer, I. A., y Weerkamp, A.H. (1997). "Genotypical and phenotypical characterization of *Bacillus*

sporothermodurans strains , surviving UHT sterilisation”. *Int. Dairy J.*, 7: 421-428.

Klijn, N., Langeveld, L.P. M., y WeerKamp, A. H. (1994) “Identification of a mesophilic *Bacillus* sp. producing spores with unusual heat-resistance” Proceedings of the 24th International Dairy Congress 1994, Australia Ec17, poster-abstract.

Knoerzer, K., Regier, M., y Schubert, H. (2005). “Measuring temperature distributions during microwave processing”. In H. Schubert & M. Regier (Eds.), *The microwave processing of foods*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.

Komemushi, S., (1983). “On the changes on death rates constant of bacterial spores in the course of heat steriliation”. En “Heat steriliation of food”. Edit.: Motohiro, T.; Hayakawa, K.I.K. Publishers Tokio. Japón.

Komitopoulou, E., Boziari, I.S., Davies, E.A., Delves Broughton, J. y Adams, M.R. (1999). “*Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices and its control by nisin“. *Int. J. of Food Sci. and Tech.*, 34: 81-85.

Kooiman, W.J. y Geers, J.M. (1975). “Simple and accurate technique for determination of heat resistance of bacterial spores”. *J. Appl. Bacteriol.*, 38: 185-189.

Koutchma, T., Guo, B., Patazca, E., y Parisi, B. (2005). “High pressure-high temperature sterilization: from kinetic analysis to process verification”. *J. Food Process Engineering*, 28: 610-629.

Kreyenschmidt, J., Hübner, A., Beierle, E., Chonsch, L. Scherer, A. y Petersen, B. (2009). “Determination of the shelf life of sliced cooked ham based on the growth of lactic acid bacteria in different steps of the chain” *J. Applied Microbiol.*, (in press), 10-111/j.1365-2672.2009.04451.x

Krischke, W. y Poralla, K. (1990). “Properties of *Bacillus acidocaldarius* mutans deficient in w- cyclohexyl fatty acid biosynthesis”. *Arch Microbiol.* 153 : 163-169.

Kyzlink, V. (1990). "Principles of food preservation". Elsevier Sci. Publ. Co. Inc., New York

-L-

Labbe, R.G y Norris, K.E. (1982). "Evaluation of plating media recovery of heated *Clostridium preflingens* spores". *J. Food Protection*, 45(8): 686-688.

Labuza, T. P., (2000). "The search for shelf life". Research Report, University of Minnesota, USA.

Lara de, J. (2001). "Influencia de las condiciones de esporulación en el crecimiento, resistencia al calor e irradiación de *Bacillus cereus*". Proyecto fin de carrera. UPCT.

Le Jean, G.G., Abraham, G., Debray, E., Candau, Y., y Piar, G., (1994). "Kinetics of thermal destruction of *Bacillus stearothermophilus* spores using a two reactions model". *Food Microbiol.* 11: 229-237.

Lechowich, R.V. y Ordal, Z.J. (1962). "The influence of the sporulation temperature on the heat resistance and chemical composition of bacterial spores". *Can. J. Microbiol.*, 8:287-295.

Levine, S. (1956). "Determination of the thermal death rate of bacteria". *Food Res.*, 21: 295-301.

Levinson, H.S. y Hyatt, M.T. (1966). "Sequence of events during *Bacillus megaterium* spore germination". *J. Bacteriol.* 91(5): 1811-1818.

Lewis, J.C., Snell, S.N. y Burr, H.K. (1960). "Water permeability of bacterial spores and the concept of a contractile cortex". *Science*. 132:544-545.

Licciardello, J. J., y Nickerson, J. T. R. (1963) "Effect of Radiation Environment on the

Thermal Resistance of Irradiated Spores of *Bacillus subtilis*” *Appl. Environ. Microbiol.*, 11(3): 216-219.

Linton, R.H., Carter, W.H., Pierson, M.D., y Hackney, C.R. (1995). “Use of a modified Compertz equation to model nonlinear survival curves for *L. monocytogenes* Scott” *A. J. food Protec.* 58: 946-951.

Loh, J., y Breene, W. M. (1983). “A laboratory microwave sterilizer and its possible application toward improving texture of sterilized vegetables”. *J. Food Sci. and Preservation*, 7: 77–89.

López, M., Gonzalez, I., Mazas, M., Gonzalez, J. y Martín, R. (1997). “Influence of recovery condition on apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores”. *Int. J. of Food Sci. and Tech.*, 32: 305-311.

Lowick, J.A. y Anema, P.J. (1972). “Effect of pH on the heat resistance of *Clostridium sporegenes* spores in minced meat”. *J. Appl. Bacteriol.*, 35:119-121.

Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., Weemaes, C., Herremans, C.H., Van Impe, J.F., Hendrikx, M. (1997). “Kinetics for isobaric-isothermal inactivation of *Bacillus subtilis* α -amylase”. *Biotechnology Progress*. 13: 538.

Lundgren, D.G., Karp, D.F. y Lang, D.R. (1969). “Structure function relationships in bacterial sporulation”. En: *Spores IV* (L.L. Campbell, ed). Am. Soc. Microbiol., Bethesda, Maryland. Pags: 20-38.

Lynch D.J. y Potter N.N. (1988). “Effect of organic acids on thermal inactivation of *Bacillus stearothermophilus* and *Bacillus coagulans* spores in frankfurter emulsion slurry”. *J. Food Protec.*, 51: 475-480.

-M-

Mafart P., Couvert O. y Leguérinel I. (2001) "Effect of pH on the heat resistance of spores. Comparison of two models". *In. J. Food Microbiol.*, 63: 51-56.

Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I. (2002). "On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model". *Int. J Food Microbiol.* 72(1-2):107-13.

Mallidis, C.G. y Scholefield, J. (1986). "Evaluation of recovery media for heated spores of *Bacillus stearothermophilus*". *J. Appl. Bacteriol.*, 61: 517-523.

Mallidis, C.G. y Scholefield, J.S. (1985). "Determination of the heat resistance of spores using a solid heating block system". *J. Appl. Bacteriol.*, 59:407-411.

Mañas, P., Pagán, R., Raso, J., y Condón, S. (2003) "Predicting thermal inactivation in media of different pH of *Salmonella* grown at different temperatures". *Int. J. Food Microbiol.*, 87: 45-53.

Marquis, R.E., Carstensen, E.L., Bender, G.R. y Chid, S.Z (1981). "Preparation and Characteritaton of various salt forms of *Bacillus megaterium*". En A.S. Lewinson, A.L. souensheim and D.J. Tippor. Ed: Sporulation and Germination American Society of Microbiology, Washinton D.L.

Marquis, R.E., Carstensen, E.L., Bender, G.R. y Chid, S.Z (1985) "Physiological biophysics of spores". En: Fundamental and applied spectrs of bacterial spores (G.J. Dring, G. w. Gould y D.J. Ellar, eds. Academic Press Inc., Londres. Pags 227-240.

Marquis, R.E. y Shin, S.Y. (1994). "Mineralization and responses of bacterial spores to heat and oxidative agents". *FEMS Microbiol Rev.*, 14(4): 375-9.

Martínez, A., Rodrigo, D., Fernandez, P.S. y Ocio, M.J. (2006). Time-temperature integrators for Thermal Process Evaluation: Thermal Food Processing: New Technologies and Quality Issues. Ed: Da-Wen sun, CRC Press, Boca-raton, Florida.

Mazas, M., Gonzalez, I., Lopez, M., y Gonzalez, J. (1995). "Effects of sporulation media and strain on thermal resistance of *Bacillus cereus* spores.". *Int. J. Food Microbiol.*, 30, 71-78.

Mazas, M., López, M., Gonzalez, I., Gonzalez, A., Bernardo, A., Martin, R. (1998). "Effects of the heating medium pH on the heat resistance of *Bacillus cereus* spores" *J. of Food Safety.*, 18: 25-36

Mazas, M., Lopez, M., Gonzalez, I., Bernardo, A. y Martín, R. (1997). "Effects of sporulation pH on the heat resistance and the sporulation of *Bacillus cereus*". *Lett. in Appl. Microbiol.*, 25: 331-334.

McIntyre, S., J. Ikawa, N. Parkinson, J. Haglund y J. Lee. (1995). "Characteristics of an acidophilic *Bacillus* strain isolated from shelf- stable juices". *J. Food Prot.*, 58 : 319-321.

McKenna, B.M., Lyng, J., Brunton, N., y Shirsat, N., (2006). "Advances in radio frequency and ohmic heating of meats". *J. of Food Engineering.*, 77 (2), 215–229.

Melly, E., Genest, P.C., Gilmore, M.E., Little, S., Popham, D.L., Driks, A., Setlow, P., (2002) "Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures". *J. of Appl. Microbiol.*, 92: 1105-1115.

Michiels, L. (1972). "Methode biologique de determinarion de la valeur steri-lisatrice de conseves apertisees". *Industries Alimentaries et Agricoles.*, 96: 1349-1353.

Minerich, P. L., y Labuza, T. P. (2003). "Development of a pressure indicator for high hydrostatic pressure processing of foods". *Innovative Food Science & Emerging Technologies.*, 4: 235-243.

Moats, W.A. (1971). "Kinetics of thermal death of bacteria". *J. Bacteriol.*, 105:165-171.

Moats, W.A., Dabbah, R., y Edwards, W.M. (1971). "Interpretation of nonlogarithmic survivor curves of heated bacteria". *J. Food Sci.*, 36:523-526.

Montville, T.J., y Sapers, G.M. (1981) "Thermal resistance of spores from pH elevating strains of *Bacillus licheniformis*". *J. Food Sci.*, 46: 1710-1712.

Mudgett, R. E. (1986). "Microwave properties and heating characteristics of foods". *Food Tech.*, 40, 84-93 98.

Mulley A., Stumbo C., y Hunting W.(1975). "Kinetics of thiamine degradation by heat. A new method for studying reaction rates in model systems and food products at high temperatures". *J. Food Sci.*, 40: 985-988.

Murakami, M., H. Tedzuka y K. Yamakazi. (1998). "Thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in different buffers and pH". *Food Microbiol.*, 15: 577-582.

Murrell, W.G. (1981). "Biophysical studies on the molecular mechanisms of spore heat resistance and dormancy". En *Sporulation and Germination* (H.S. Levinson, A.L. Sonenshein y D.J. Tipper, eds.). Am Soc. Microbiol. Washington D.C. pags: 64-77.

Murrell, W.G. y Scott, W.J. (1966). "The heat resistance of bacterial spores at various water activities". *J. Gen. Microbiol.*, 43: 411-425.

Murrell, W.G. y Warth, A.D. (1965). "Composition and heat resistance of bacterial spores". En: *Spores III* (L.L: Campbell y H.O. Halvorson, eds) Am. Soc. Microbiol. Ann Arbor. Michigan. Pags:1-24.

-N-

Nakashio, S., y Gerhardt, P. (1985). "Protoplast dehydration correlated with heat resistance of bacterial spores". *J. Bacteriol.*, 162(2):571-8.

Nakayama, A., Yano Y., Kobayashi, S., Ishikawa, M, y Sakai, k. (1996). "Comparison of pressure resistances of spores of six bacillus strains with their heat resistances". *Appl. and Env.l Microbiol.*, 3897–3900.

Nakayama, A., Yutaka, Y., Shozo, K., Masato, I., and Kazuo, S. (1996). "Comparison of Pressure Resistances of Spores of Six Bacillus Strains with Their Heat Resistances" *Appl. and Env.l Microbiol.*, 62: 3897–3900.

Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B. (2001). "Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*" *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 433–446.

Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., y Setlow, P., (2000). "Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extra terrestrial environments". *Microbiology and Molecular Biology Review.*, 64: 548-572.

-O-

Ocio M.J., Sánchez T., P.S. Fernández, Rodrigo M. y Martínez A. (1994) "Thermal resistance characteristic of PA3679 in temperature range of 110-121°C as affected by pH, type of acidulant and substrate". *Int. J. Food Microbiol.* 22: 239-247.

Ocio, M.J. (1995). “Desarrollo de un integrador tiempo-temperatura microbiológico, utilizando esporas de *Bacillus stearothermophilus*, para validar procesos térmicos”. Tesis, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Spain.

Ocio, M.J., Fernández, P.S., Rodrigo, M., Periago, P.M. y Martínez, A. (1997). “A Time Temperature integrator for particulated foods: Thermal process evaluation”. Ed. Lebensmittel Untersuchung und Forschung.

Ocio, M.J., Fernández, P.S. y Martínez, A. (1994). “Comparison of TDT and Arrhenius models for rate constant inactivation predictions of *Bacillus stearothermophilus* heated in mushroom alginate substrate”. *Let. in Appl. Microbiol.* 19: 114-117.

Odlaug, T.E. y Pflug, I.J. (1977). “Thermal destruction of *Clostridium botulinum* spores suspended in tomato juice in aluminium thermal death time tubes”. *Appl and Environ. Microbiol.*, 34:23-29.

Okereke, A., Beelman, R.B., Doores, S. y Walsh, R. (1990). “Elucidation of the mechanism of the acid-blanch and EDTA process inhibition of *Clostridium sporognes* PA 3679 spores”. *J. Food Sci.* 55: 1137-1142.

Oomes, S. J. C. M., van Zuijlen A. C. M., Hehenkamp, J. O., Witsenboer, H., van der Vossen, J. M. B. M., y Brul S. (2007) “The characterisation of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products”. *Int J. Food Microbiol.*, 120, 85-94.

Orr, R.V., L. Robert, C. J. H., Shewfelt, T. Sebbat y L.Y.R. Beuchat. (2000). “Detection of guaiacol produced by *Alicyclobacillus acidoterrestris* in apple juice by sensory and chromatographic analyses, and comparison with spores and vegetative cell populations”. *J. Food Prot.* 63: 1517-1522.

-P-

Pagán, R., Mañas, P., Raso, J. y Sala, F.J. (1999). "Heat resistance of *Yersinia enterocolitica* grown at different temperatures and heated in different media". *Int. J. Food Microbiol.*, 47: 59-66.

Pagan, R., Mañas, P., Raso, J., Sala, F.J. (1999). "Heat resistance of *Yersinia enterocolitica* grown at different temperatures and heated in different media" *Int. J. Food Microbiol.*, 47: 59-66.

Paidhungat, M., Setlow, B., Driks, A., y Setlow, P. (2000) "Characterization of Spores of *Bacillus subtilis* Which Lack Dipicolinic Acid". *J. Bacteriol.*, 182: 5505-5512.

Paidhungat, M., Setlow, P. (2001) "Localization of a germinant receptor protein (GerBA) to the inner membrane of *Bacillus subtilis* spores". *J. Bacteriol.*, 183(13):3982-3990.

Pallas, J.E. y Hamdy, M.K. (1976)"Effects of thermoradiation on bacteria". *Appl Environ. Microbiol.*, 32(2):250-6.

Palop A., (1995) "Estudio de la influencia de diversos factores ambientales sobre la resistencia de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis* y *B. coagulans*". Tesis. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.

Palop A., Francisco J., Sala y Condon S. (2012) "Thermoresistometers for assesing microbial heat resistance" En: Progress on Quantitative Approaches. Ed:Valdramidis, V.P. & Van Impe, J.F., Ciudad. Hauppauge, NY.

Palop A., Raso J., Condón S., Sala F.J., (1996a). "Heat resistance of *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans*". *J. of Food Pro.*, 59: 487-492.

Palop, A., Raso J., Pagán R., Condón S. y Sala F.J. (1999c) "Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenizez foods". *Int. J. Food Microbiol.* 46: 243-249.

Palop A., Raso J., Pagán R., Condón S. y Sala F.J., (1996b). "Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in buffer and homogenised foods". *Int. J. Food Micro.* 29: 1-10.

Palop, A. y Martinez, A. (2006). "pH assisted termal processing". En: Thermal Food Processing: new technologies and quality issues. Capítulo 18:567-596. Ed. Da-Wen Sun.

Palop, A., Mañas, P. y Condón, S. (1999b). "Sporulation Temperature and Heat Resistance of *Bacillus* Spores: A Review". *J. Food Safety*, 1: 57-73.

Palop, A., Raso, J., Condón, S. y Sala, F.J. (1996a). "Heat resistance of *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans*: effect of sporulation temperature in foods with various acidulants". *J. Food Prot.*, 59: 487-492.

Palop, A., Rutherford, G.C. y Marquis, R.E., (1998). "Inactivation of enzymes within spores of *Bacillus megaterium* ATCC 19213 by hidroperoxides". *Can. J. Microbiol.*, 44: 465-470.

Palop, A., Sala, F.J. y Condón, S. (1999a). "Heat resistance of native and demineralized spores of *Bacillus subtilis* sporulated at different temperatures". *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(3):1316-9.

Pandit, R.B., Tang, J., Mikhaylenko, G. y Liu, F. (2006). "Kinetic of chemical marker M-2 formation in mashed potato-a tool to locate cold spots under microwave sterilization". *J. of Food Engineering*. 76: 353-361.

Patazca, E., Kouchma, T., y Ramaswamy, H.S. (2006). "Inactivation Kinetic of *Geobacillus sterothermophilus* spores in water using high-pressure processing at elevated temperatures". *J. Food Sci.*, 71, M110-M116.

Patino, H. y Heil, J.R. (1985). "A statistical approach to error analysis in thermal process calculations". *J. Food Sci.*, 50: 1110-1114.

Peleg, M. y Cole, M.B. (1998), "Reinterpretation of microbial survival curves". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 38: 353–380.

Paula M., Conesa R., Delgado B., Fernández, P. S. y Palop A. (2006) "*Bacillus megaterium* Spore Germination and Growth Inhibition by a Treatment Combining Heat with Natural Antimicrobials" *Food Technol. Biotechnol.* 44 (1): 17–23.

Periago, P.M., Van Zuijlen, A., Fernández, P.S., Klapwijk, P.M., Ter Steeg, P.F., Corradini, M.G. y Peleg, M. (2004). "Estimation of the nonisothermal inactivation patterns of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores in soups from their isothermal survival data". *Int. J. Food Microbiol.*, 95: 205-218.

Perkin, A.G., Burton, H., Underwood, H.M., y Davis, F.L. (1977). "Thermal death kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores at ultra high temperatures II. The effect of heating periods on experimental results". *J. Food Tech.*, 12: 131-148.

Perkin, A.G., Davies, F.L., Neaves, P., Jarvis, B., Ayres, C.A., Brown, K.L., Falloon, W.C., Dallyn, H. y Bean, P.G. (1980). "Determination of bacterial spore inactivation at high temperatures". En *Microbial growth and survival in extremes of environments*. Edit: Gould, G.W. y Corry, J.E.L. Soc. Appl. Bact., Technical Series 15:173-188.

Petterson, B., Lembke, F., Hammer, P., Stackebrandt, E. y Priest, F. G. (1996) "*Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores". *Int. J. Systematic Microbiol.*, 46: 759-764.

Pettipher, G.L, Osmundson, M.E. y Murphy, J.M. (1997). "Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juices and fruit juice-containing drinks". *Lett Appl. Microbiol.* 24: 185-189.

Pflug, I.J. y Esselen, W.B. (1953a). "Observations on the thermal resistance of putrefactive anaerobe n° 3679 spores in the temperature range of 250-300°F. *Food Res.*, 19(1): 92-97.

Pflug, I.J. y Esselen, W.B. (1953b). "Development and application of an apparatus for study of thermal resistance of bacterial spores and thiamine at temperatures above 250°F". *Food Tech.*, 7:237-241.

Pflug, I.J. y Smith, G.M. (1977). En "Spore research". Vol II. Edit: Barker, A.N., Wolf, J., Ellar, D.J., Dring, G.D, Gould, G.W. Academic Press, Londres.

Pontius, A.J., Rushing, J.E. y Foegeding, P.M. (1998). "Heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as affected by varios pH values and organic acids". *J. Food Prot.*, 61: 41-46.

Prakash, A., Kim, H.J., y Taub, I.A. (1997) "Assesment of microwave sterilization of foods using intrinsic chemical markers". In *J. Micro Power Electromag. Energy*. 32: 50-57.

Prescott, L.M., Harlaey, J.P. y Klein, D.A. (2004). "Microbiología". 5ª edición. Ed. McGraw-Hill. Madrid.

Prescott, L.M., Harley, J.P., y Flein, D.A. (2002). Microbiología. McGraw-Hill Interamericana, Madrid.

Previdi, M.P., Quintavalla, S., Lusardi, C. y Vicini, E., (1997). "Heat resistance of *Alicyclobacillus* spores in fruit juices" *Indust. Conserve.*, 72: 353-358.

Prokop, A. y Humphrey, A.E (1972). "Mechanism of termal death of bacterial spores: electrón-microscopic observations". *Folia Microbiol.* 17: 437 -445.

Put, H.M.C. y Aalsbersber, W.I.J. (1967). "Ocurrence of *Bacillus subtilis* with high heat resistance". *J. Appl. Bacteriol.*, 30 (3): 411-419.

-R-

Rahn, O. (1929). "The sice of bacteria as a cause of a logaritmic orther of death. *J. genetic and Phisiology.*, 13: 179-182.

Rahn, O. (1945a). "Injury and death of bacteria by chemical agents". Biodynamic. Monograph. nº3, Edit: Cuyet, B.J., Normandy, Misoury, Usa.

Rahn, O. (1945b). "Physical methods of sterilization of microorganisms". *Bacteriological Review.*, 9:1-50.

Raso, J., Barbosa-Cánovas, G. y Swason, B.G. (1998). "Sporulation temperature affects initiation of germination and incativarion by high hydrostatic pressure of *Bacillus cereus*". *J. Appl Microbiol.*, 85: 17-24.

Rodrigo, M., Martinez, A. Sanchis, J., Trama, J., Giner, V. (1990) "Determination of hot-fill-hold-cool process specification for crushed tomatoes". *J. Food Sci.*, 55: 1029-1032.

Rodrigo, F. (1977). "Establecimiento de las condiciones de utilización de un ITT microbiológico, que se utiliza como elemento sensor de esporas de *Bacillus stearothermophillus*". Ph.D. dissertation, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia, España.

Rodrigo, F., Rodrigo, C., Fernández, P.S., Rodrigo, M. y Martínez, A. (1999). "Effect of acidification and oil on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores heated in food substrate". *Int J. of Food Microbiol.*, 52: 197-201.

Rodriguez, A.C., Smerage, G. H., Teixeira, A.A. y Busta, F.F. (1988). "Kinetic effect of letal temperatura on populations dynamics of bacterial spores". Transaction of the American Society of Agricultural Engineers. 31: 1594-1601, 1606.

Röner, U.A. (1990). "A new biological indicator for aseptic sterlisation". *Food Tech. Int.*, 90: 43-46.

Russell, A.D. (1982). "The destruction of bacterial spores" Academic Inc. Press, Nueva York.

-S-

Sala F.J., Ibarz P., Palop A. Raso J. y Condon S. (1995). "Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus subtilis* at different pHs". *J. Food Protec.*, 58: 239-243.

Sandeep, K. P. (1999). "An overview of conventional and alternative processing technologies used in the food industry" ASAE Annual International Meeting, Toronto, 18-22.

Sanz, B., Palacios, P., López, P. y Ordoñez, J.A. (1982). "Effect os ultrasonics waves on heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores". Presentado en el FEMS-SAB meeting, Cambridge, Inglaterra. 13-17 septiembre. Abstract en Spore Newsletter. 7(10): 246-247.

Sastry, S. K. y Palaniappan, S. (1992). "Ohmic heating of liquid-particle mixtures". *Food Tech.*, 46 (12): 64-67.

Sastry, S.K., Li, S.F., Patel, P., Konanayakam, M., Bafna, P., Doores, S. y Beelman, B. (1988). "A bioindicador for verification of thermal processes for particulate foods". *J. Food Sci.* 53(5): 1528-1531 y 1536.

Schmidt, C.F., Bock, J.K. y Moberg, I.A. (1955). "Thermal resistance determinations in steam using thermal death time retorts". *Food Res.*, 20:606-610.

Sebaihia, M., Peck, M. W., Minton, N.P., Thomson, N. R., Holden, M. T. G. y Mitchell, W.J. (2007). "Genome sequence of a proteolytic (Group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes". *Genome Research*, 17: 1082-1092.

Sedlak, M., Vinter, V., Adamec, J., Vohradsky, J., Voburka y Z. Chaloupka, J. (1993). "Heat shock applied early in sporulation affect heat resistance of *Bacillus megaterium* spores". *J. Bacteriol.*, 175: 8049-8052.

Setlow, B., Melly, E. y Setlow, P. (2001). "Properties of spores of *Bacillus subtilis* blocked at an intermediate stage of spore germination". *J. Bacteriol.*, 183: 4894-4899.

Setlow, P. (1981). "Biochemistry of bacterial for spore development and spore germination". En "Sporulation and germination". Edit: Levinson, H.S. ; Sonenshein, A. L.; Tipper, D.J- American society for Microb. Washington D. C. USA.

Setlow, P. (1988). "Small acid-soluble, spore proteins of *Bacillus* species: structure, synthesis, genetics, function and degradation". *Annual Review of Microbiol.*, 42: 319-338.

Setlow, P. (1994). "Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species". *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* 23: 49S-60S.

Setlow, P. (2003). "Spore germination". *Current opinion in Microbiology.* 6:550-556.

Setlow, P. (1983). "Germination and outgrowth". En "The bacterial spore". Vol 2. Edit: Hurst, A.; Gould, G.W. Academic Press. Londres.

Setlow, P., (2000). "Resistance of bacterial spores. In: Storz, G., Hengge-Aronis, R. (Eds.), *Bacterial Stress Responses*. American Society of Microbiology, Washington D.C., pp. 217-230.

Shull, J. J., Cargo, G. T. y Ernst R.R. (1963). "Cinetics of heat activation and thermal death of bacterial spores". *Appl. Microbiol.* 11:485-487.

Shull, J.J. y Ernst, R.R. (1962). "Graphical procedure for comparing thermal death of *Bacillus stearothermophilus* spores in saturated and superheated steam". *Appl Microbiol.*, 10:452-455.

Sielaff, H. (2000). "Tecnología de la fabricación de conservas". Ed. Acribia, S.A.

Silla, M.H., Torres, J., Arranz, A. y Peris, M.J. (1993). "Citric acid lowers heat resistance of *Clostridium sporogenes* PA 3679 in HTST white asparagus pure". *Int. J. Food Sci.*, 28: 603-610.

Silva, V.M. y Gibbs, P. (2001). "*Alicyclobacillus acidoterrestris* spore in fruit products and design of pasteurisation processes". *Trends Food Sci. Tech.* 12: 68-74.

Silva, F.M., Gibbs, P., Viera, M.C. y Silva, C. L.M. (1999). "Thermal inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under different temperature, soluble solids and pH conditions for the design of fruit process". *Int. J. Food Microbiol.* 51: 95-103.

Skudder, P. J. (1993) "New system for sterilization of particulate food products by ohmic heating". H. Reuter (Ed.) *Aseptic processing of foods* (pp. 95-106).

Slepecky, R.A. y Foster, J.W. (1959) "Alterations in metal content of spores of *Bacillus megaterium* and the effect of some spore properties". *J. Bacteriol.*, 78:117-123.

Slepecky, R.A. y Leadbetter, E.R. (1986). "On the prevalence and roles of spore forming bacteria and their spores in nature". En: *The bacterial spore*, vol. 2 (A. Hurst y G.W. Gould, eds.) Academic Press Inc., Londres. Pags: 79-99.

Smeller, L. (2002). "Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules". *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1386: 353-370.

Smit, Y., Cameron, M., Pierre, V. y Witthuhn, R. C. (2011). "Alicyclobacillus spoilage and isolation e A review". *Food Microbiol.*, 28: 331-349.

Smolander, M., Alakomi, H-L., Ritvanen, T., Vainionpää, J. y Ahvenainen, R. (2004). "Monitoring of the quality of modified atmosphere packaged broiler chicken cuts stored in different temperature condition. A Time-temperature indicators as quality-indicating tools". *Food Control.*, 15: 217-229.

Splittstoesser, D.F., Lee, C.Y. y Churey, J.J. (1998). "Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in the juice industry". *Dairy Food Environ Sanitation.* 18: 585-587.

Stern, J.A. y Proctor, B.E. (1954). "A micro-method and apparatus for the multiple determination of rates of destruction of bacteria and bacterial spores subjected to heat". *Food Tech.* 8: 139-143.

Stewart, H., Somlyo, A.P., Somlyo, A.V., Shuman, H., Lindsay, J.A. y Murrel, W.G. (1981). "Scanning electron probe x-ray microanalysis of elemental distribution in freeze-dried cryosections of *B. coagulans* spores". *J. Bacteriol.* 147:670-674.

Steyn, C.E., Cameron, M. y Witthohn, R.C., (2011). "Ocurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment- A review". *Int. J. Food Microbiol.*, 147: 1-11.

Stoforos NG, y Merson R.L. (1990). "Estimating heat transfer coefficients in solid/liquid canned foods using only liquid temperature data". *J. of Food Sci.* 478-483.

Stumbo, C. R. (1965). "Thermobacteriology in Food Procesing". New York: Academic Press.

Stumbo, C.R. (1948). "A technique for studying resistance of bacterial spores to temperatures in the higher range". *Food Technol.* 2: 228-240.

Stumbo, C.R. (1973). "Thermobacteriology in food processing". Academic Press. Londres.

Swartzel, K. R., Ganesan, S. G., Kuehn, R. T., Hamaker, R. W. y Sadhegi, F. (1991). "Thermal memory cell and thermal system evaluation" US patent 5 021 98 1.

-T-

Tabit Frederick, T. y Buys Elna, (2010) "The effect of wet heat treatment on the structural and chemical components of *Bacillus spotothermodurans* spores". *Int. J. Food Microbiol.*, 140: 207-213.

Taoukis, P.S., (2001). "Modelling the use of time temperature indicators". In: Tijskens, L.M.M., Hertog, M.L.A.T.M., Nicolaï, B.M. (Eds.), *Food Process Modelling*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, pp. 402–431.

Taoukis, P.S. y Labuza, T.P., (1989). "Applicability of time–temperature indicators as shelf life monitors of food products". *J. Food Sci.*, 54: 783–788.

Tennen, R., Setlow, B., Davis, K.L., Loshon, C.A. y Setlow, P. (2000). "Mechanisms of killing of spores of *Bacillus subtilis* by iodine, glutaraldehyde and nitrous acid". *J. Appl. Microbiol.*, 89: 330-338.

Texeira, A. (1992). "Thermal procesing calculations". In D.R. Heldman, & L.B. Lund, *Handbook of food engineering*. New York: Marcel Dekker.

Thomas, S. (2007) "Optimierung der Lebensmittelqualität bei der Lagerung in kühlgeräten in Europa. Inagural-Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. Aachen: Shaker Verlag.

Thorley, M. (1961). "Some germination factors of mesophilic spore-formers". En "*Spore II*". Burgess Pub. Co.

Tipper, D.J. y Gauthier, J.J. (1972). "Structure of the bacterial endospore". En: Spores V (R. Hanson y L.L. Campbell, eds). *Am. Soc. Microbiol., Washington D.C.* pags: 3-12

Towsend, C.T., Esty, J. R. y Baselt, F. C. (1938). "Heat resistance studies on spores of putrefactive anaerobes in relation to determination of safe process for canned food". *Food Res.*, 19: 536-540.

Tsironi, T., Gogou, E., Velliou, E. y Taoukis, P.S. (2008) "Application and validation of the TTI based chill chain management system SMAS (Safety Monitoring and Assurance System) on shelf life optimization of vacuum packed chilled tuna" *Int. J. Food Microbiol.* 128: 108-115.

-U-

Uchino, F. Y S. Doi. (1967). "Acidothermophilic bacteria from termal waters". *Agr. Biol. Che.* 31: 817- 822.

Uehara, M. y Frank, H.A. (1965). "Factors affecting alanine-induced germination of Clostridial spores". En "Spores III". American Society for Microbiology. Washington D.C. USA.

-V-

Valdramidis, V. P., Belaubre, N., Zuniga, R., Foster, A. M., Havet, M. y Geeraerd, A. H. (2005). "Development of predictive modelling approaches for surface temperature and associated microbiological inactivation during hot dry air decontamination". *Int. J. Food Microbiol.*, 100,261–274.

Van Boekel, M.A.J.S. (2002). "On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells". *Int. J. of Food Micrbiol.*, 74: 139-159.

Van Loey, A., Haentjens T., Scout Ch. y Hendrickx, E., (1999) “Enzymic time-temperature integrators for the quantification of thermal processes in terms of food safety”. FAR Oliveira, JC Oliveira, Eds., Processing Foods. Lonfon: CRC Press, , pp. 13-36.

Van Loey, A., Hendrickx, M., Smout, C., Haentjens, T. y Tobback P. (1996) “Recent Advances in Process Assessment and Optimisation”. *Meat Science*. 43, 81-98.

Van Zuijlen, A., Periago, P., Amézquita, M., Palop, A., Brul, S. y Fernández, P.S. (2010) “Characterization of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores; putative indicator microorganism for optimization of thermal processes in food sterilization”. *Food Res Int.*, 43: 1895-1901.

-W-

Walls, I. y Chuyate, R. (1998). “*Alicyclobacillus* historical perspective and preliminary characterization study”. Dairy, *Food and Enviromental Sanitaiton*. 18:499-503.

Walls, I. y Chuyate, R. (2000). “ Spoilage of fruit juices by *Alicyclobacillus acidoterrestis*”. *Food Australia*. 52 (7): 286-288.

Walls, I., (1997). “*Alicyclobacillus* an overview”. Institute of Food Technologist Annual Meeting in Orlando, FL. 14-18.

Warth, A. D. (1978a). “Molecular structure of the bacterial spore”. *Adv. Microbiol. Physiol.* 17:1-45.

Warth, A. D. (1978b). “Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species”. *J Bacteriol.*, 134(3): 699-705.

Warth, A.D. (1985). “Mechanisms of heat resistance”. En: Fundamental and applied

aspects of bacterial spores (Eds: Dring, G.J., Gould, G.W. y Ellar, D.J.) Academic Press Inc., Londres. Pags. 209-226.

Warth, A.D., (1980). "Heat stability of *Bacillus cereus* enzymes within spores and in extracts" *J. Bacteriol.*, 143: 27-34.

Watkins, J.H.; Winslow, L.E.A. 1932. Factors determining the rate of mortality of bacteria exposed to alkalinity and heat. *J. Bacteriol.*, 24:243-246.

Weng, Z., Hendrickx, M., Maesmans, G. y Tobback, P. (1991). "Thermostability of soluble and immobilized horseradish peroxidase". *J. Food Sci.* 56(2): 567-570.

Williams, D.J., Franklin, J.G., Chapman, H.R., Clegg, L.F.L. (1957). Methods of assessing the sporicidal efficiency of an ultra-high-temperature milk sterilising plant. I. Experiments with suspensions of spores in water. *J. of Appl. Bacteriol.*, 20:43-49.

Wisotzkey, J. D., P. Jurtshuk, G. E. Fox, G. Deinhard y K. Poralla. (1992) "Comparative sequence analyses on the 16 rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen." *J. System. Bacteriol.* 42: 263-269.

Wisse C.A. y Parish M.E. (1998) "Isolation and enumeration of sporeforming, thermoacidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environment". *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 18: 504-509.

Witonsky, R.J. 1977 "A new tool for the validation of the sterilization". Bull. Parenter. Drug Assoc.

-X-

Xezones H., y Hutching I.J., (1965) "Thermal resistance of *Clostridium botulinum* (62A) spores as affected by fundamental food constituents. *Food Tech.* 19: 113-115.

-Y-

Yamakazi, K., C. Isoda, H. Tedzuka, Y. Hawaii. y H. Shimano. (1997a). "Termal resistance and prevention of spoilaige bacterium, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, in acidic beverages". J. Jpn. Soc. *Food Sci. Technol* .44: 905-911.

Yamakazi, K., Kawai, Y., Inoue, N., y Shinano, H. (1997b). "Influence of sporulation medium and divalent ions on the heat resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores" *Let. Appl. Microbiol.*, 25: 153-156.

Yingjie Deng, Rakesh K. Singh, Jun Ho Lee, (2003). "Estimation of temperature profiles in microwave particulates using enzyme and vision system" *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 36: 331–338.

Yokoya, F.; York, G.K. 1965. "Effect of several environmental conditions on the thermal death rate of endospores of aerobic thermophilic bacteria". *Appl. Microbiol.*, 13(6):993-999.

-Z-

Zechman, L.G, (1988) "Heat inactivation Kinetic of *Bacillus stearothermophilus* Spores" PhD. Disertation. University of Minnesota.

Zechman, L.G. y Pflug, I.J. (1988). "Heat inactivation kinetics of *Bacillus stearothermophilus* spores". Tesis, University of Minnesota, Minneapolis.