

Evaluation of bacterial growth in a thermally treated smoothie

Evaluación del crecimiento bacteriano en un smoothie térmicamente tratado

G.A. González-Tejedor*, F. Artés-Hernández^{1,2}, P.S. Fernández^{1,2}

¹Departamento de Ingeniería de Alimentos. Universidad de Politécnica de Cartagena - UPCT. 30203. Cartagena, Spain.

²Instituto de Biotecnología Vegetal - IBV. UPCT. Campus Muralla del Mar s/n. 30202. Cartagena, Spain.

Abstract

The growth of *Listeria monocytogenes* in a purple smoothie made of fresh fruit and vegetables during storage at 5 and 28°C has been evaluated. After smoothie elaboration, it was thermally treated during 3 min at 95 °C and subsequently inoculated. A very dynamic behavior of listeria at 28°C was found, reaching the death stage after 10 days in all concentrations assayed. There was no death nor growth of *listeria* at 5°C.

Keywords: beverage; minimal processing; shelf life; heat treatment; food safety.

Resumen

En este trabajo se ha evaluado el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en un smoothie morado a base de fruta y hortalizas frescas durante una simulación de la vida comercial a 5 °C y 28°C. Tras la preparación del smoothie, éste se procesó térmicamente a 95 °C durante 3 min y posteriormente fue inoculado. Se observó un comportamiento muy dinámico de la *listeria* durante la conservación a 28°C, alcanzando la fase de muerte tras 10 días para todas las concentraciones ensayadas. No se registró muerte ni crecimiento de la *listeria* a 5°C.

Palabras clave: batido; procesado mínimo; vida útil; tratamiento térmico; seguridad alimentaria.

1. INTRODUCCIÓN

Diferentes factores y el contacto humano durante las prácticas de cosecha y la manipulación posterior pueden causar contaminación microbiana de productos frescos [1]. La disponibilidad de azúcar, nutrientes y la alta actividad de agua de las frutas y hortalizas, promueven el rápido crecimiento de patógenos alimentarios [2]. La posible presencia de especies patógenas en las materias primas (frutas y hortalizas) principalmente respecto a *Listeria monocytogenes*, representa un riesgo microbiológico incluso a temperaturas de refrigeración [3]. Por lo tanto, para garantizar su seguridad, el smoothie de frutas y hortalizas requiere un proceso de pasteurización adecuado (86-96°C durante 2 minutos) para posibilitar la destrucción de patógenos y reducir la flora microbiana de deterioro. Sin embargo, el proceso térmico puede ser acortado a 15–30 s.

* E-mail: gerardo.gonzalez@utp.ac.pa

mediante una pasteurización rápida a elevada temperatura por lo que el estudio del binomio tiempo temperatura es fundamental [4]. También es necesario evitar la recontaminación posterior del producto con microorganismos patógenos.

Se ha demostrado la presencia de *L. monocytogenes* bajo condiciones de refrigeración en frutas y hortalizas, como tomates, naranjas, fresas y ensalada de frutas frescas [5]. El pH mínimo para el crecimiento de *L. monocytogenes* fue reportado en 4.3 utilizando un medio acidificado con HCl [6]; por otra parte, el pH mínimo que permite el crecimiento de este patógeno en los productos alimenticios es de 4.6 [7]. En alimentos listos para comer a base de frutas ácidas puede representar un peligro potencial para la salud dada la conocida capacidad de *L. monocytogenes* para sobrevivir en productos almacenados durante largos periodos en refrigeración. En este sentido, algunos autores han encontrado que *L. monocytogenes* debe utilizarse como el organismo de referencia en la evaluación de letalidad de procesos UV y térmicos para zumo de manzana (pH = 3.68), ya que este patógeno mostró mayor resistencia que *E. coli*, *Salmonella enteritidis* o *Salmonella typhimurium* a este pH bajo [8].

En alimentos listos para el consumo que puedan permitir el desarrollo de *L. monocytogenes* antes de que el alimento haya dejado el control inmediato de la empresa alimentaria que los haya producido, debe demostrar que el producto no superará el límite de 100 UFC/g durante su vida útil; Si no se puede demostrar, se considera satisfactorio si todos los valores observados indican ausencia de la bacteria e insatisfactorio si se detecta la presencia de la bacteria en cualquiera de las muestras [9].

El objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad o crecimiento de *L. monocytogenes*, durante la conservación a 5 y 28°C en smoothies morados a base de fruta y hortalizas frescas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Preparación de la Cepa utilizada

La cepa de *L. monocytogenes* CECT 4032 fue suministrada por la Colección Española de Cultivos Tipo. Aproximadamente 100 µL de la cepa se inocularon en 50 mL de TSB (Tryptic Soy Broth) y se incubó a 37°C durante 24 horas para obtener las células en fase de crecimiento estacionario con una concentración aproximada de 1×10^9 UFC/mL.

2.2 Inoculación de la muestra de smoothie

Las muestras de smoothie (20 mL) previamente preparadas, desinfectadas con Hipoclorito de Sodio de uso alimentario (150 ppm; 2 min), enjuagadas en agua de la red 1 min y tratadas térmicamente a 95°C se inocularon con *L. monocytogenes* (CECT 4032) en concentraciones iniciales de 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 . Se almacenaron inmediatamente a 5 y 28°C hasta su uso para los estudios microbiológicos en condiciones de oscuridad. Se estudió el crecimiento de *L. monocytogenes* (CECT 4032) durante su almacenamiento a las temperaturas indicadas.

2.3 Recuento microbiológico de *L. monocytogenes*

El medio utilizado para células viables fue Tryptona Soya Agar (TSA). Las diluciones seleccionadas se incubaron a 37°C durante 24 horas, posteriormente se realizó el conteo. El crecimiento y/o reducción de células viables se expresó como el logaritmo de UFC/mL partiendo del día 0.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó el crecimiento de *Listeria monocytogenes* inoculada en smoothies tratados térmicamente a 95 °C utilizando concentraciones de 10^2 a 10^5 a durante una vida comercial de 5 y 28°C.

3.1 Smoothies conservados a 5°C

En la Fig. 1, se observa que no existe crecimiento de *L. monocytogenes* en smoothies inoculados y conservados a 5°C, sino que con el tiempo esta población tiende a disminuir lentamente ya que tras 35 días de almacenamiento la concentración bajó aproximadamente media unidad logarítmica para las diferentes concentraciones de inoculación ensayadas. En la muestra sin inocular no se produjo crecimiento bacteriano apreciable.

3.2 Smoothies conservados a 28°C

En los smoothies conservados a 28°C (Figura 2), *L. monocytogenes* tuvo un comportamiento muy diferente en comparación con los conservados a 5 °C. Ello se debió a que esta temperatura de conservación se acerca mucho a la temperatura óptima de crecimiento de este microorganismo. Así, tras crecer hasta niveles de 7 log₁₀ UFC/mL en todas las concentraciones iniciales ensayadas, la fase de declive fue muy pronunciada y después de 15 días de almacenamiento, dicha población disminuyó a niveles inferiores a 10³ UFC/mL. En la muestra sin inocular no se produce un crecimiento bacteriano apreciable.

L. monocytogenes ha mostrado que, a valores cercanos de pH a 4.5, no pudo crecer a una temperatura de conservación de 5 °C. No obstante, el microorganismo fue capaz de proliferar a concentraciones elevadas en el smoothie a una temperatura cercana a la óptima de crecimiento (28 °C). Ello indica que la temperatura es una barrera determinante para el control de su proliferación en el smoothie estudiado. Se ha demostrado que la presencia de *L. monocytogenes* bajo condiciones de refrigeración en frutas y hortalizas [5]. Nuestros resultados indican que, para evitar el riesgo que supone la presencia de recuentos elevados de *L. monocytogenes* en este tipo de productos, es necesario evitar la recontaminación del producto final por este microorganismo y garantizar una adecuada refrigeración. Este factor actúa como una importante medida de control adicional.

4. CONCLUSIONES

El comportamiento de *L. monocytogenes* inoculada en el smoothie, se mostró dependiente de la temperatura y concentración. Así, se apreció estable sin observarse crecimiento en la población durante 35 días a 5°C, apreciándose una cierta inactivación durante el almacenamiento. A 28°C, temperatura muy cercana a la óptima para el crecimiento de este microorganismo, se vio que *L. monocytogenes* fue capaz de crecer, pese a que el pH del producto era cercano al inhibitorio descrito en la bibliografía sin que existiesen potentes agentes antimicrobianos que controlasen su crecimiento. Es necesario llevar a cabo estudios adicionales para caracterizar los mecanismos de este comportamiento y su posible interés en el establecimiento de procesos combinados.

5. AGRADECIMIENTOS

Se agradece la financiación al Ministerio de Economía y Competitividad MINECO (Proyectos AGL2013-48830-C2-1-R y AGL2013-48993-C2-1-R) y a los fondos FEDER. G. González agradece al gobierno de Panamá la beca para realizar el doctorado en la UPCT.

6. REFERENCIAS

- [1] De Roever, C. (1998). Microbial safety evaluation and recommendation on fresh produce. *Food Control* 9, 321-347
- [2] Tournas, V. H., Heeres, J., Burgess, L. (2006). Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiol.* 23, 684-688.
- [3] Scolari, G., Zacconi, C., Busconi, M., Lambri, M. (2015). Effect of the combined treatments of high hydrostatic pressure and temperature on *Zygosaccharomyces bailii* and *Listeria monocytogenes* in smoothies. *Food Control* 47, 166-174.

- [4] Castillojo, N., Martínez-Hernández, G.B., Gómez, P.A., Artés F., Artés-Hernández, F. (2016). Red fresh vegetables smoothies with extended shelf life as an innovative source of health-promoting compounds. J Food Sci Technol. In press. DOI: 10.1007/s13197-015-2143-2.
- [5] Cobo-Molinos, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Valdivia, E., & Gálvez, A. (2008). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw fruits by enterocin AS-48. J Food Protec. 71(12), 2460–2467.
- [6] Tienungoon, S., Ratkowsky, D.A., McMeekin, T.A. Ross T. (2000) Growth Limits of *Listeria monocytogenes* as a Function of Temperature, pH, NaCl, and Lactic Acid. Appl Environ Microbiol. 66(11): 4979–4987
- [7] Carpentier, B., Cerf, O. (2011). Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. Int. J. Food Microbiol. 145, 1–8.
- [8] Benlloch-Tinoco, M., Pina-Pérez, M.C, Martínez-Navarrete, N., Rodrigo, D. (2014). *Listeria monocytogenes* inactivation kinetics under microwave and conventional thermal processing in a kiwifruit puree. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 22, 131–136.
- [9] Regulation (EC) 1441/2007. (2007). Commission regulation on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union 32, 12–29.

Figuras

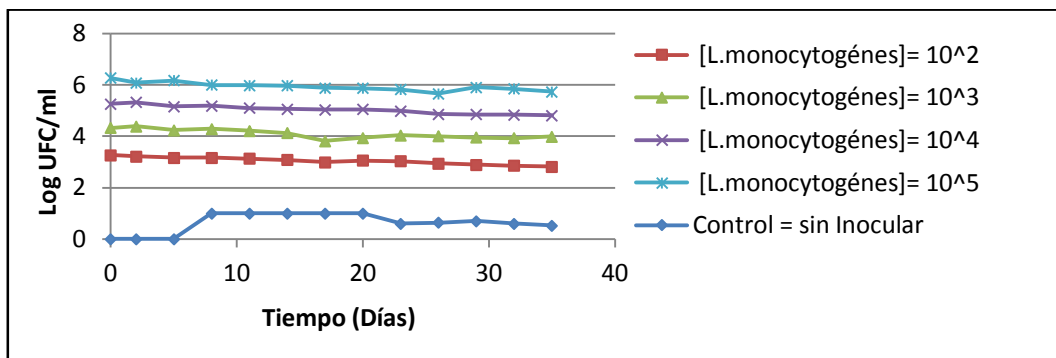


Figura 1. Gráfico de crecimiento de *Listeria monocytogenes* inoculada en smoothies y conservados a 5°C.

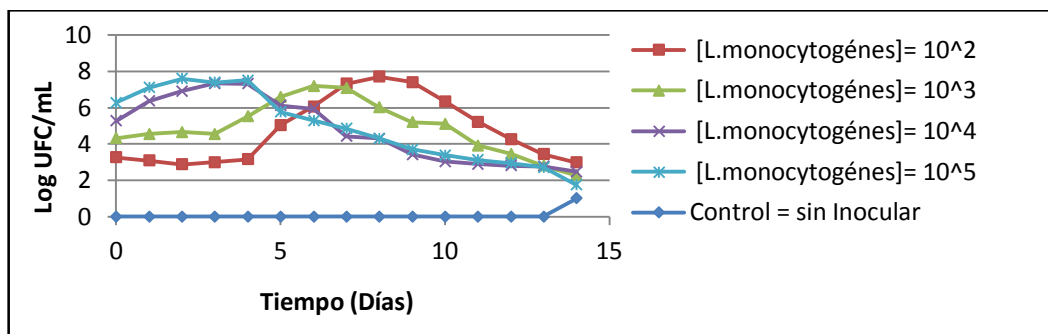


Figura 2. Gráfico de crecimiento de *Listeria monocytogenes* inoculada en smoothies y conservados a 28°C.