



**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**  
**FACULTAT DE VETERINÀRIA**  
**DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS**  
**04-09-2017**

APLICACIÓN DE UN CONSERVANTE  
NATURAL ELABORADO A BASE DE  
ACEITES ESENCIALES PARA ALARGAR  
LA VIDA ÚTIL DE NATA Y TRUFA  
UTILIZADAS COMO RELLENOS DE  
PASTELERÍA

**JOHANNA MERCEDES LOOR VERA**

Trabajo presentado para la superación del Módulo  
Trabajo Fin de Máster del **Máster Oficial en Calidad de  
Alimentos de Origen Animal**

## **INFORME DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

Sra. Núria Rovira Lozano Responsable de Calidad de Yaya María S.A., delegación perteneciente al grupo Europastry S.A.

### **INFORMA**

El trabajo de investigación titulado “Aplicación de un conservante natural elaborado a base de aceites esenciales para alargar la vida útil de nata y trufa utilizadas como rellenos de pastelería” ha sido realizado bajo mi supervisión o tutela por la Srta. Johanna Mercedes Loo Vera dentro del módulo Trabajo Fin de Máster del Máster Oficial de Calidad de Alimentos de Origen Animal de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Sant Joan Despí, 04 de septiembre de 2017.

Firma.

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, quisiera dar las gracias a todo el equipo docente que ha hecho posible el desarrollo del Máster de Calidad de Alimentos de Origen Animal de la Facultat de Veterinària, especialmente al coordinador del master, Dr. Antonio Trujillo por su sabiduría, apoyo y dedicación.

Estoy especialmente agradecida a mis compañeros por haber sido parte fundamental de cada momento vivido durante este año y por su incansable entusiasmo. Me gustaría reconocer el trabajo y esfuerzo realizado por cada uno de ellos con el propósito de lograr superar con éxito sus objetivos. ¡Enhorabuena, habéis conseguido uno de ellos!

Me gustaría expresar mi gratitud al departamento de Microbiología de Europastry S.A. por la colaboración que ha tenido en el desarrollo de este trabajo y principalmente a mis compañeros del departamento de producción de la delegación de Yaya María por la acogida y apoyo brindado.

Por último, darle mi más sincero agradecimiento a la Sra. Núria Rovira, directora del presente estudio y tutora en mi estancia en Yaya María por su apoyo incondicional, su amistad y por ser parte de la consecución de esta meta.

## ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstrat.....	1
1. Introducció .....	2
1.1. Aceites Esenciales.....	3
1.2. Mecanismo de actuación.....	4
2. Materiales y Métodos.....	5
2.1. Materiales.....	5
2.2. Métodos.....	6
2.2.1. Análisis Microbiológico.....	6
2.2.1.1. Importancia del análisis microbiológico. ....	7
2.2.2. Análisis Sensorial.....	8
3. Resultados y Discusión .....	8
3.1. Análisis Microbiológico.....	8
3.2. Evaluación Sensorial.....	11
4. Conclusió .....	13
5. Anexos .....	14
5.1. Procedimiento para el recuento de aerobios mesófilos totales.....	14
5.1.1. Materiales.....	14
5.1.2. Medios de cultivo.....	14
5.1.3. Realizació.....	14
5.1.4. Recuento .....	14
5.1.5. Resultados .....	14
5.2. Procedimiento para el recuento de hongos y levaduras. ....	15
5.2.1. Materiales.....	15
5.2.2. Medio de cultivo .....	15
5.2.3. Realizació.....	15
5.2.4. Recuento .....	15
5.2.5. Resultados .....	15
5.3. Procedimiento para realizar el recuento de Coliformes Totales y <i>E. Coli</i> .....	16
5.3.1. Materiales.....	16

5.3.2.	Medios de Cultivo.....	16
5.3.3.	Realización.....	16
5.3.4.	Recuento .....	17
5.3.5.	Resultados .....	17
5.4.	Procedimiento para realizar la investigación de <i>L. monocytogenes</i> .....	17
5.4.1.	Materiales.....	17
5.4.2.	Medios de Cultivo.....	18
5.4.3.	Realización.....	18
5.4.4.	Resultados .....	18
5.5.	Procedimiento para realizar la investigación de <i>Salmonella spp.</i> .....	18
5.5.1.	Materiales.....	18
5.5.2.	Medios de cultivo.....	19
5.5.3.	Realización.....	19
5.5.4.	Identificación .....	19
5.5.5.	Confirmación .....	19
5.6.	Ficha utilizada para realizar el análisis sensorial. ....	20
6.	Bibliografía .....	21

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó con la ayuda del departamento de microbiología de Europastry S.A. y en las instalaciones de la delegación de Yaya María con la finalidad de determinar el efecto antimicrobiano que ejerce en trufa y nata un determinado conservante natural elaborado a base de aceites esenciales. Al mismo tiempo se realizó un análisis sensorial con 10 catadores para observar el efecto del bioconservante en las propiedades organolépticas del producto. La trufa y la nata son utilizadas como relleno de diversos productos de bollería/pastelería.

En los resultados obtenidos se pudo observar que el hecho de agregar el conservante natural no aporta una mejora microbiológica importante y en cambio sí que interfiere negativamente en las características organolépticas. Estos cambios negativos se observaron básicamente en el gusto; deja un sabor y retrogusto poco agradable, además el producto adquiere más dulzor y pierde consistencia, es decir, la textura se vuelve líquida.

Puesto que estos resultados fueron los arrojados en el primer análisis, no fue viable hacer más pruebas. Se considera que, en el supuesto de utilizar una mayor concentración en el producto final, pudiendo así obtener mejores resultados microbiológicos, se vería una mayor afectación negativa en el gusto y la textura del producto.

Por lo antes expuesto, se llega a la conclusión de que no es viable la utilización del conservante natural propuesto para alargar la vida útil de este tipo de productos.

## ABSTRAT

The present study was carried out with the collaboration of the Microbiology Department of Europastry S.A. and in the Yaya Maria's installations. The objective was the determination of the antimicrobial effect that produce a natural conservative prepared from essential oils in truffle and cream. At the same time, a sensorial analysis was carried out with 10 tasters to observe the

bioconservative effect on organoleptic properties in the product. The truffle and the cream are used as a filling for various pastry products.

Such a result, it can be observed that the fact of adding the natural preservative doesn't contribute an important microbiological improvement but instead, it interferes negatively in the organoleptic characteristics. These negative changes were basically observed in taste; it leaves a pleasant taste and aftertaste. In addition, the product becomes sweeter than the samples without any additions and loses consistency.

Because these results were obtained in the first analysis, it was not feasible to do further testing. It is considered that, the addition of higher concentration could be used, being able to obtain better microbiological results but it would see a greater negative affectation in the taste and the texture of the product.

From the foregoing, it is concluded that it isn't feasible to use the natural preservative proposed to extend the useful life of this kind of products.

## **1. INTRODUCCIÓN**

Muchos alimentos son perecederos por naturaleza al deterioro microbiano. La nata y la trufa se emplean como rellenos para preparar productos de bollería que generalmente son alimentos listos para el consumo, que se mantienen a temperatura de refrigeración para mantener la frescura antes de ser servidos. Es en esta etapa donde se produce un aumento del riesgo que representa el crecimiento microbiano en la calidad microbiológica del producto.

Desde la antigüedad, se ha destacado el esfuerzo por alargar la vida útil de los alimentos mediante diversos procedimientos que permitían disponer de productos alimenticios aptos para el consumo durante un mayor periodo de tiempo. Hoy en día, los procesos tecnológicos aplicados a los alimentos tienen como una de sus prioridades aumentar este parámetro.

Los alimentos requieren protección contra el deterioro durante su preparación, almacenamiento y distribución para darles el tiempo deseado de conservación. Los alimentos están expuestos a contaminación por microorganismos los cuales pueden causar problemas indeseables tales como

deteriorar las propiedades sensoriales de los alimentos o en el caso más extremo ser una causa de riesgo para la salud.

El desarrollo de este estudio se ha planteado debido a la necesidad de encontrar un método para conservar durante mayor tiempo productos de bollería (reellenos) y aumentar su caducidad secundaria, inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos o de microorganismos precursores de descomposición, sin afectar negativamente las propiedades organolépticas utilizando un conservante natural elaborado a base de aceites esenciales.

El crecimiento microbiano es una preocupación importante debido a que algunos microorganismos pueden causar enfermedades transmitidas por los alimentos. *Escherichia Coli* es un patógeno común y los mohos, aerobios y levaduras son microorganismos de deterioro. Estos microorganismos están asociados con los alimentos y pueden causar riesgos para la salud o el deterioro de la calidad de los mismos.

El uso de aditivos naturales para preservar los alimentos se ha vuelto popular debido a que la demanda de los consumidores por los productos naturales está en auge (Holley and Patel, 2005). El interés en los antimicrobianos alternativos de origen natural ha dado lugar a un mayor interés científico por los aceites esenciales (Gutierrez et al., 2008). De acuerdo con la tendencia actual de dar valor a los recursos naturales otro de los objetivos planteados es acercarnos a la utilización de un etiquetado limpio, es decir, reducir en la composición del alimento y en la etiqueta la presencia de aditivos sintéticos.

## **1.1. Aceites Esenciales**

Los aceites esenciales son productos del metabolismo secundario de las plantas pudiendo ser sintetizados por todos los órganos de la planta, es decir, brotes, flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutos, raíces, madera o corteza. Son compuestos volátiles, naturales y complejos caracterizados que aportan el aroma que producen las plantas. Los aceites esenciales específicos reciben el nombre de la planta de la que se extraen, por ejemplo, aceite de jengibre, aceite de nuez moscada

y aceite de naranja. Como grupo, también se les llama aceites de especias y aceites cítricos (Gutierrez et al., 2008).

Un aceite esencial es un concentrado de compuestos químicos lipofílicos e hidrófobos, son líquidos solubles en lípidos y en disolventes orgánicos con una densidad generalmente inferior a la del agua. Estos compuestos son conocidos debido a sus propiedades bactericidas, virucidas, fungicidas, medicinales y por su fragancia (Flavors, 2011).

En la naturaleza, los aceites esenciales desempeñan un papel importante en la protección de las plantas como antibacterianos, antivirales, antifúngicos, insecticidas y también contra los herbívoros al reducir su apetito por estas plantas. También pueden atraer algunos insectos para favorecer la dispersión de polen y semillas, o repeler otros indeseables.

Debido a sus propiedades bactericidas y fungicidas, los usos farmacéuticos y alimenticios son cada vez más generalizados como alternativas a los productos químicos sintéticos para proteger el equilibrio ecológico.

Los aceites esenciales se han empleado en gran parte para sus propiedades ya observadas en la naturaleza, es decir, por sus actividades antibacterianas, antifúngicas e insecticidas. En la actualidad, se conocen aproximadamente 3000 aceites esenciales, 300 de los cuales son comercialmente importantes, especialmente para las industrias farmacéutica, agronómica, alimentaria, sanitaria, cosmética y perfumería. Los aceites esenciales o algunos de sus componentes se utilizan en alimentación como conservantes y aditivos naturales (Bakkali et al., 2008). En los alimentos el impacto organoléptico es importante, los alimentos generalmente asociados con hierbas, especias o condimentos son los menos afectados por este fenómeno (Deans and Ritchie, 1987).

## **1.2.Mecanismo de actuación**

Los aceites esenciales son mezclas naturales complejas que pueden estar compuestas por 20 - 60 componentes en diferentes concentraciones. En su composición predominan principalmente dos o tres componentes en altas concentraciones del orden del 20% al 70%, mientras los demás están

presentes en bajas concentraciones llegando algunos a estar en condición de traza. Generalmente, estos componentes mayoritarios son los que determinan las propiedades biológicas de los aceites esenciales (Bakkali et al., 2008).

Debido al gran número de constituyentes, los aceites esenciales no tienen dianas celulares específicas. Como lipófilos típicos, atraviesan la pared celular y la membrana citoplasmática, alteran la estructura de sus diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos y los permeabilizan. La citotoxicidad parece incluir daño a la membrana. En las bacterias, la permeabilización de las membranas está asociada con la pérdida de iones y la reducción del potencial de membrana, el colapso de la bomba de protones y el agotamiento de ATP (Turina et al., 2006).

Los aceites esenciales pueden coagular el citoplasma y dañar los lípidos y las proteínas. El daño a la pared celular y a la membrana puede conducir a la fuga de macromoléculas y a la lisis (Burt, 2004).

En las células eucariotas, los aceites esenciales pueden provocar la despolarización de las membranas mitocondriales al disminuir el potencial de la membrana, afectar el ciclo iónico  $Ca^{++}$  y otros canales iónicos y reducir el Gradiente de pH, afectando la bomba de protones y el grupo de ATP. Cambian la fluidez de las membranas, que se vuelven permeables, dando lugar a la fuga de radicales, citocromo C, iones de calcio y proteínas. La permeabilización de las membranas mitocondriales externas e internas conduce a la muerte celular por apoptosis y necrosis (Di Pasqua et al., 2006)(Turina et al., 2006).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Materiales**

Para realizar este trabajo se utilizó nata y trufa para montar además del bioconservante Essential

2.2 Liquid.

La nata se ha sometido a un proceso de alta pasteurización y tiene un 38% de masa grasa. Al no contener azúcar en su fórmula, en el momento de montarla se le añade.

La trufa es un producto elaborado a base de cobertura de chocolate (21%), azúcar (20%), grasa vegetal (15%), grasa láctea (13%) y leche desnatada y proteína de leche (10%) que ha sido sometida a un proceso de ultrapasteurización.

La dosis de aplicación recomendada por el fabricante del aditivo está comprendida entre el 0,6% y el 1% en producto acabado.

Los utensilios utilizados para montar la nata y la trufa fueron previamente desinfectados con el producto NEBUL HDL.

La nata y la trufa se almacenaron a una temperatura de refrigeración de 4 °C. La temperatura de la sala donde fueron montadas tanto nata como trufa fue de 15-17 °C.

Una vez montadas la nata y la trufa se depositan en recipientes estériles y se almacenan a una temperatura de -18°C hasta que se procede a realizar el análisis microbiológico y sensorial.

## **2.2.Métodos**

### **2.2.1. Análisis Microbiológico**

Para determinar la calidad microbiológica en el alimento, se estudió la evolución microbiana en cinco días consecutivos.

El análisis microbiológico se determinó mediante procedimientos normalizados de trabajo internos y los valores de referencia establecidos se toman de los criterios internos de la empresa basados en la guía ASEMAC y en las especificaciones del Reglamento CE 2073/2005 y sus modificaciones.

El recuento de microorganismos se realizó por duplicado haciendo un promedio. El estudio de microorganismo fue el siguiente:

- Recuento de aerobios (anexo 5.1)
- Recuento de hongos y levaduras (anexo 5.2)
- Recuento de coliformes (anexo 5.3)
- Recuento de *E. Coli* (anexo 5.3)
- Investigación de *Listeria monocitogenes* (anexo 5.4)
- Investigación de *Salmonella spp* (anexo 5.5)

### 2.2.1.1. Importancia del análisis microbiológico.

El análisis microbiológico permite valorar la carga microbiana, señalando los posibles puntos de riesgo de contaminación o multiplicación microbiana. En los alimentos la concentración de aerobios mesófilos es un indicador de calidad microbiológica del producto.

Los alimentos constituyen un medio excelente para el desarrollo de un gran número de especies fúngicas y de levaduras. La contaminación por hongos y levaduras puede ocasionar defectos en el aspecto del alimento y modificarlo químicamente pero su presencia también puede originar intoxicaciones en el consumidor.

Los coliformes se encuentran en el intestino del hombre y de los animales y en otros ambientes como suelo, plantas. Suelen usarse como índice de contaminación fecal por su frecuencia en heces. En general, niveles altos de coliformes indican manipulación y elaboración deficientes en los alimentos. *E. Coli* pertenece a este grupo, es huésped constante del intestino del hombre y otros animales. Por su especificidad, está considerado como un buen índice de contaminación fecal.

*L. monocitogenes* tienen la particularidad de poder crecer a temperaturas de refrigeración. Su presencia en alimentos está determinada por su extensa distribución en el ambiente, tierra, desagües de fábricas, materia fecal, vegetación, ensilados y entorno a la producción de alimentos, lo que le confiere una importante oportunidad para contaminarlos.

*Salmonella spp.* tienen importancia a nivel clínico por su capacidad de producir infecciones intestinales o sistémicas en el hombre y en los animales (salmonelosis). Su poder patógeno, así como su especificidad, dependen de las características de cada cepa en particular. La salmonelosis es una zoonosis y está considerada la principal causa de toxoinfección alimentaria en medicina

humana. El carácter ubicuo de las salmonellas y la existencia de portadores asintomáticos entre las poblaciones humana y animal hacen que su control sea especialmente complejo.

### **2.2.2. Análisis Sensorial**

El análisis sensorial consistió en realizar una prueba triangular donde se presentaban tres muestras a cada persona en órdenes diferentes. Dentro de las muestras, dos eran iguales y la tercera era diferente. Los evaluadores sensoriales tuvieron que identificar qué muestra era diferente de las otras. El objetivo de este análisis fue poner a prueba la hipótesis de que la adición del aditivo no suponía cambios organolépticos en el producto.

En la misma prueba se realizó una descripción más detallada del perfil de la nata y la trufa, con la adición del aditivo y sin ella, para evaluar de una forma más clara las características que concede dicha adición al producto y las preferencias de los catadores (anexo 5.6).

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1. Análisis Microbiológico**

Se ha estimado que aproximadamente un tercio de la producción mundial de alimentos se pierde anualmente debido al deterioro microbiano (Abdollahi et al., 2014).

La naturaleza conservante de las plantas se ha sabido durante siglos. Diversas hierbas y especias se han utilizado tradicionalmente para extender la vida útil de los alimentos. Las propiedades antimicrobianas de los extractos de plantas han sido objeto de diversos estudios. Se ha demostrado por ejemplo que los aceites de naranja y de limón son inhibidores de una amplia gama de microorganismos de deterioro de alimentos, especialmente levaduras. También se ha demostrado una inhibición considerable por parte de los aceites esenciales contra las bacterias de intoxicación alimentaria (Liu and Yang, 2012).

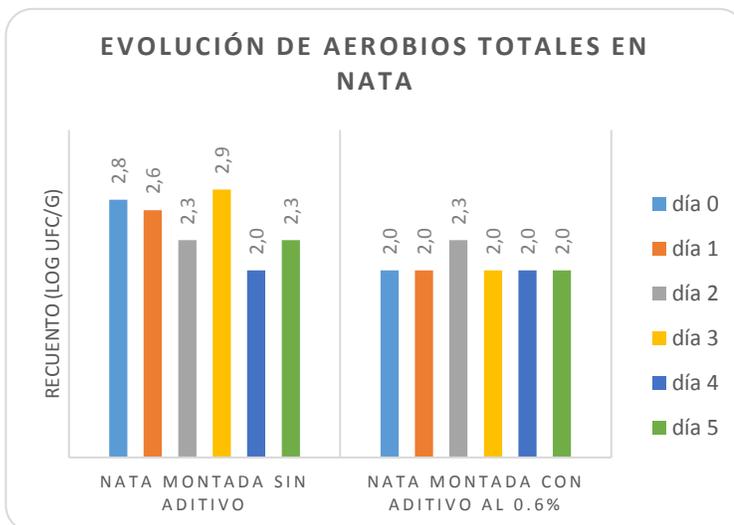
Después de analizar los datos proporcionados por el departamento de microbiología de Europastry podemos observar, como se muestra en las gráficas, que los recuentos de las muestras de nata y

trufa fueron bajos lo que indica la alta calidad de la materia prima utilizada en este estudio y de las condiciones de elaboración de las mismas.

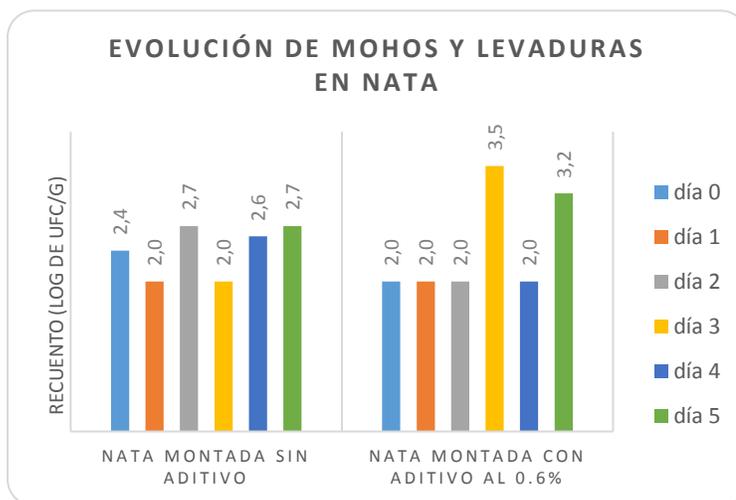
El recuento resultante para coliformes totales y *E. Coli* para nata y trufa durante los 5 días en ambos casos, es decir, con la adición del aditivo y sin ella fue  $< 1 \log \text{ ufc/g}$ . Los resultados obtenidos para la investigación de *L. monocytogenes* y *Salmonella spp* en todas las muestras fue de ausencia en 25 gramos.

Las diferencias observadas en los perfiles microbiológicos de nata y trufa, con adición y sin ella de aditivo, solo se encontraron en el recuento de aerobios totales, mohos y levaduras.

Como se puede ver en la gráfica 1 el recuento de aerobios totales fue mayor en la nata montada sin aditivo, de lo que se deduce que el aditivo tiene un efecto antimicrobiano frente al desarrollo de este tipo de microorganismo.

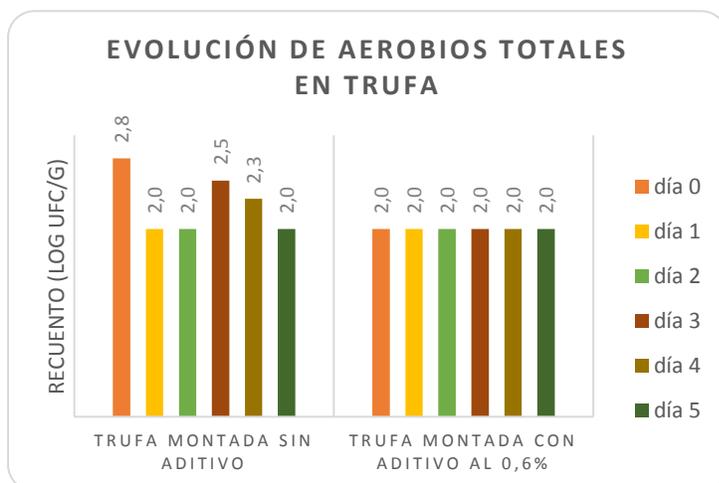


**Gráfica 1. Evolución microbiológica en nata. Aerobios Totales.**

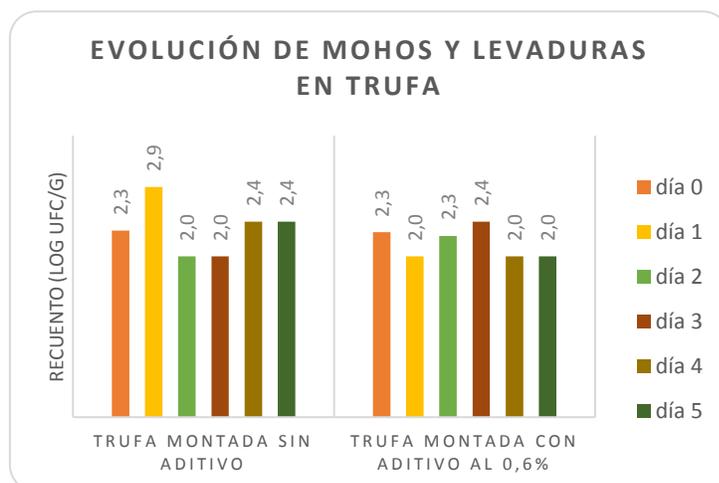


**Gráfica 2. Evolución microbiológica en nata. Mohos y Levaduras.**

En la gráfica 2 podemos observar que el recuento de mohos inicialmente en la muestra con aditivo tiene una concentración mayor de microorganismos que la muestra sin aditivo, pero en esta última



**Gráfica 3. Evolución microbiológica en trufa. Aerobios Totales.**



**Gráfica 4. Evolución microbiológica en trufa. Mohos y levaduras.**

solo se ve crecimiento en cuatro días, por debajo de 3 log ufc/g, mientras en el primer caso el crecimiento se da en dos días, pero el recuento se sitúa por encima de 3 log ufc/g.

Cabe decir que, aunque se vieron diferencias en el crecimiento microbiano, el recuento en cada caso no superó los niveles máximos de aceptabilidad ni siquiera en el quinto día que se llevó a cabo el control.

Con respecto al recuento en muestras de trufa, podemos observar en la gráfica 3 y 4 los resultados microbiológicos que tuvo por microorganismo y por día. Anteriormente se ha comentado que no se observó crecimiento para *E. Coli* y coliformes totales, del mismo modo, la investigación para los dos patógenos que se estudian dio como resultado ausencia en 25 g.

En los resultados del análisis microbiológico de la trufa se puede ver que el desarrollo de aerobios totales (gráfica 3) fue mayor en trufa sin aditivo que en la muestra de trufa con la adición del aditivo donde no se detectó crecimiento. Algo similar sucedió en el recuento de hongos y levaduras, aunque en este caso hubo crecimiento en ambas muestras, sin embargo, la diferencia no es acentuada.

### 3.2. Evaluación Sensorial

En la gráfica 5 se muestra la puntuación sensorial para el color, olor, textura y sabor de la nata y trufa. Estos valores reflejan el grado de aceptabilidad, que tiene el hecho de añadir el conservante natural a nata y trufa, desde el punto de vista de los catadores.



**Gráfica 5. Puntuación y aceptabilidad de nata y trufa con y sin la adición del aditivo.**

Inicialmente, aunque se encontraron diferencias en la tonalidad del color de nata y trufa con y sin aditivo, ambas muestras tenían un aspecto aceptable como se puede observar en la imagen 1 y 2. Con la adición del conservante, la nata tomó una tonalidad amarillenta la cual se alejaba del tono blanco habitual. Este punto hizo que los evaluadores sensoriales se decantaran a primera vista por la nata sin aditivo. En el caso de la trufa sucedió lo contrario, el hecho de agregar el aditivo concedió un tono mucho más oscuro, lo que se relacionó con una concentración más alta de cacao.



**Imagen 1. Nata montada con adición y sin adición de aditivo**



**Imagen 2. Trufa montada con adición y sin adición de aditivo**

Hubo un consenso general en el efecto que tiene el conservante sobre la textura. Tanto nata como trufa perdieron consistencia, es decir, perdieron su estructura y se volvieron más líquidas, aunque en nata el efecto fue mayor.

Con respecto al sabor, se encontró que el aditivo afectaba de manera considerable tanto a la nata como a la trufa. En la nata el sabor que le confirió el aditivo fue negativo mientras que en la trufa hubo diversas opiniones. Por un lado, hubo opiniones que decían que potenciaba el sabor a chocolate; hecho fuertemente influenciado por la tonalidad más oscura que confirió el conservante a la trufa, otros por el contrario percibieron amargor y sabor desagradable en el producto.

Las puntuaciones sensoriales fueron bajas especialmente para la muestra de nata con aditivo seguida de la muestra de trufa con aditivo. Sin embargo, se consideró que ésta última era aceptable para el consumidor debido a que, aunque el conservante influenciaba de manera negativa algunos aspectos como por ejemplo el olor y la textura, era un potenciador de color y en algunos casos de sabor.

Un último punto importante que destacar es que a medida que se llegaba al último día de análisis, la nata montada sin aditivo presentaba más sinéresis que la nata montada que contenía el aditivo natural. En la trufa no se observó dicho acontecimiento en ninguno de los dos casos.

#### 4. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo, en el que se evalúa la utilización de un conservante natural para alargar la vida útil de nata y trufa y los efectos que ocasiona sobre la calidad sensorial del producto, se pudo observar que el hecho de agregar el conservante natural no aporta una mejora microbiológica importante y en cambio sí que interfiere negativamente en las características organolépticas.

Los cambios negativos fueron apreciados especialmente en la nata. El efecto fue observado fundamentalmente en el gusto, deja un sabor y retrogusto poco agradable, además el producto adquiere más dulzor y pierde consistencia, es decir, la textura se vuelva más líquida. Por otro lado, se observó que en la trufa potencia el color oscuro característico y en algunos casos potencia el sabor a cacao, aunque afecta negativamente a la textura que como en el caso de la nata, también se torna más fluida.

Puesto que estos resultados fueron los arrojados en el primer análisis, no fue viable hacer más pruebas. Se considera que, en el supuesto de utilizar una mayor concentración en el producto final, pudiendo así obtener mejores resultados microbiológicos, se vería una mayor afectación negativa en el gusto y la textura del producto.

El recuento microbiológico en los cuatro casos fue bajo y aunque el conservante muestra efecto antimicrobiano frente a aerobios, mohos y levaduras, no se considera que sea relevante.

Para un uso práctico en los alimentos, la selección de un agente antimicrobiano debe basarse en la compatibilidad sensorial del agente antimicrobiano con el alimento objetivo (Holley and Patel, 2005).

Por lo antes expuesto se considera que no es necesaria la utilización de un conservante natural para disminuir el desarrollo microbiano y alargar la vida útil secundaria del producto. Sería más conveniente la utilización de un aditivo que minimice la pérdida de agua y que mantenga la textura, especialmente en el caso de la nata.

## 5. ANEXOS

### 5.1. Procedimiento para el recuento de aerobios mesófilos totales

#### 5.1.1. Materiales

- Estufa de incubación a 30 °C +/-1 °C
- Placas de Petri de 90mm de diámetro de plástico.
- Micropipeta 1000µl.
- Baño de agua programado para operar entre 44-47°C.
- Equipo de recuento de colonias.

#### 5.1.2. Medios de cultivo

Se usa TGY (Tryptic Glucose Yeast Agar) deshidratado.

#### 5.1.3. Realización

Se prepara el medio de cultivo, la dilución madre y el banco de diluciones de la muestra. Seguidamente se toman 2 placas de Petri estériles y se transfiere mediante una pipeta estéril 1 ml de la suspensión inicial a cada una de las placas. Se vierte entre 18 y 20 ml de medio TGY atemperado entre 44 y 47°C y se mezcla el inóculo mediante la rotación de las placas. Una vez las placas estén en estado sólido se incuban en posición invertida a 30°C +/-1°C durante 72 +/-3h.

#### 5.1.4. Recuento

Recuento de las colonias (en las placas que contengan menos de 300 colonias) tras el periodo de incubación.

#### 5.1.5. Resultados

Se recuentan placas que al menos contengan 10 colonias. El número de microorganismos N presentes en la muestra para análisis se calcula como la media corregida de dos diluciones consecutivas, utilizando la ecuación:

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

$\sum C$ : suma de las colonias contadas en las 2 placas escogidas de las dos diluciones consecutivas.

V: es el volumen de inóculo utilizado en cada placa, en ml.

d: dilución correspondiente a la primera dilución escogida.

El resultado calculado se redondea a 2 cifras significativas y se expresa como número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada. El resultado se expresa como número de microorganismos N por gramo.

## **5.2. Procedimiento para el recuento de hongos y levaduras.**

### **5.2.1. Materiales**

- Estufa de incubación a 25°C.
- Placas Petri de 90mm de diámetro de plástico.
- Pipeta 1000µl.
- Baño de agua a 48°C.
- Equipo contador de colonias.

### **5.2.2. Medio de cultivo**

Se utiliza Agar Dextrosa Saboureaud con Cloranfenicol.

### **5.2.3. Realización**

Se prepara el medio de cultivo y se procede a preparar la dilución madre y el banco de diluciones. A continuación, se siembra 1 ml de la dilución madre y de cada una de las siguientes diluciones decimales en placas de Petri estériles. Se vierten unos 15 ml de medio Sabouraud+Cloranfenicol atemperado entre 45 y 48°C y se agita suavemente la placa con movimientos circulares hasta la homogenización de la muestra y se deja solidificar. Una vez sólidas las placas se incuban en posición invertida a 25°C +/-1°C durante 5 días.

### **5.2.4. Recuento**

Recuento de las colonias (en las placas que contengan menos de 150 colonias) cada 24h, marcándolas para evitar contarlas de nuevo y diferenciando cuántas son mohos y cuántas levaduras.

### **5.2.5. Resultados**

El número de hongos y levaduras por gramo se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\Sigma C / (n_1 + 0.1n_2) \cdot d$$

$\Sigma C$  = suma de las colonias en todas las placas  
 $n_1$  = número de colonias contadas en la primera dilución  
 $n_2$  = número de colonias contadas en la segunda dilución  
 $d$  = dilución de la que se obtuvo el primer recuento.

El resultado calculado se redondea a 2 cifras significativas y se expresa como número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada. El resultado se expresa como número de microorganismos N por gramo. Si el crecimiento es nulo se expresa el recuento como <10 ufc/g.

### **5.3. Procedimiento para realizar el recuento de Coliformes Totales y *E. Coli***

#### **5.3.1. Materiales**

- Agitador-calefactor.
- Estufa a 37°C +/- 1°C.
- Placas petri de 90mm de diámetro de plástico.
- Micropipeta 1000µl.
- Baño de agua a 44-47°C.
- Equipo de recuento de colonias.

#### **5.3.2. Medios de Cultivo**

El medio de cultivo utilizado el recuento se denomina Coli ID. Este medio antes de ser utilizado se debe fundir al baño maría durante.

#### **5.3.3. Realización**

En primer lugar, se prepara la solución madre y el banco de diluciones. Se siembra en profundidad 1 ml de la dilución madre y de cada una de las diluciones decimales en placas de petri estériles. Se vierten entre 15-20 ml del medio Coli ID atemperado entre 44 y 47°C, se agita suavemente la placa hasta la homogenización de la muestra y se deja solidificar. Por último, se las placas se incuban en posición invertida a 37°C +/- 1°C durante 24 +/- 2h horas.

### 5.3.4. Recuento

El recuento de las colonias se realiza sobre placas que contengan menos de 300 ufc.

El medio utilizado permite la detección conjunta de Coliformes y *E. Coli*. Las colonias de *E.coli*  $\beta$ D-glucuronidasa positivo tienen un diámetro de 0,5 a 2mm y un color de rosa a violeta. Otros coliformes producen colonias de un diámetro de 0,5 a 2mm y un color azul/azul-gris.

El número de coliformes totales corresponde a la suma de las colonias rosa a violeta y las colonias azules/azul-gris.

### 5.3.5. Resultados

Se recuentan placas que al menos contengan 10 colonias y como mucho 300 colonias.

El número de microorganismos N presentes en la muestra para análisis se calcula como la media corregida de dos diluciones consecutivas, utilizando la ecuación:

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d}$$

$\sum C$ : suma de las colonias contadas en las 2 placas escogidas de las dos diluciones consecutivas.  
V: es el volumen de inóculo utilizado en cada placa, en ml.  
d: dilución correspondiente a la primera dilución escogida.

El resultado calculado se redondea a 2 cifras significativas y se expresa como número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada.

El resultado se expresa como número de microorganismos N por gramo.

## 5.4. Procedimiento para realizar la investigación de *L. monocytogenes*

### 5.4.1. Materiales

- Estufa de incubación a 37°C $\pm$ 1°C.
- Estufa de incubación a 30°C $\pm$ 1°C.
- Baño de agua entre 44-47°C

- Micropipeta 1000µl y 100 µl.
- Asa digralsky.
- Asa picadura.
- Equipo de recuento de colonias.

#### **5.4.2. Medios de Cultivo**

Para el enriquecimiento selectivo de *L. Monocytogenes* se utiliza el caldo de cultivo Fraser Demi listo para su uso mientras que para su aislamiento se utilizó placas ALOA (Agar Listeria según Ottaviani y Agosti). En este último medio, Listeria forma colonias redondas de color azul o azul verdoso mientras *L. monocytogenes* se distingue por presentar además de las características anteriores un halo opaco que las permite diferenciar.

#### **5.4.3. Realización**

Preparación de la muestra y siembra. Se prepara preparan 25 gramos de muestra usando como diluyente 225ml de Fraser ½ y se incuba la preparación a 30°C+/-1°C durante 24h+/-2h. La siembra en superficie se realiza vertiendo 0,1 ml de las bolsas de Fraser ½ incubadas en las placas de Aloa y extendiendo por toda la superficie del medio con el asa de siembra. Posteriormente se incuban las placas en posición invertida a 37°C +/-1°C durante 48+/- 3h.

Las colonias de *L. monocytogenes* presentan una coloración azul turquesa rodeadas de un halo opaco. A partir de las colonias típicas que se identifican, se realiza una siembra en estría única (una estría por cada colonia sospechosa) en una placa Aloa confirmación. Se incuba durante 24+/- 2h a 37+/-1 °C. El resultado es positivo cuando la estría presenta un color azul/verde, un cambio de coloración de rojo a amarillo a su alrededor además de la aparición de un halo opaco que la envuelve.

#### **5.4.4. Resultados**

De acuerdo con la interpretación de los resultados, se registra la presencia o ausencia de *L. monocytogenes*, especificando la masa en gramos de la muestra analizada.

### **5.5.Procedimiento para realizar la investigación de *Salmonella spp.***

#### **5.5.1. Materiales**

- Placas de IBISA.

- Asas de siembra calibradas de 10 µl.
- Estufa de incubación a 37°C±1°C.

### **5.5.2. Medios de cultivo**

Para el enriquecimiento se usa agua de peptona tamponada con Tween 80 y el suplemento ISS mientras para el aislamiento se usan placas de agar IBISA. Para la confirmación se utilizan tiras oxidadas y test de aglutinación con látex.

### **5.5.3. Realización**

Para la investigación de Salmonella con IBISA, se pesan 25g de muestra+225ml de agua de peptona tamponada, se añaden 2.5ml +/- 0.25ml del suplemento ISS y se incuba la muestra a 41.5°C±1°C durante 16-20h.

A partir del caldo enriquecido se aísla por estrías 10 µl en una placa de agar IBISA y se incuba a 37°C±1°C durante 24h±3h.

### **5.5.4. Identificación**

Las colonias de Salmonella presentan una coloración verde muy característica.

### **5.5.5. Confirmación**

Se realiza un test oxidasa en una colonia característica aislada en IBISA. Si el test de oxidasa es negativo, se realiza un test de Látex.

Si el test oxidasa es negativo y la aglutinación es positiva, la cepa se considera Salmonella.

Si el test oxidasa es negativo y la aglutinación resulta negativa estamos ante un resultado discordante. La cepa puede ser Salmonella y se realiza un API para asegurarse.

### **5.5.6. Resultados**

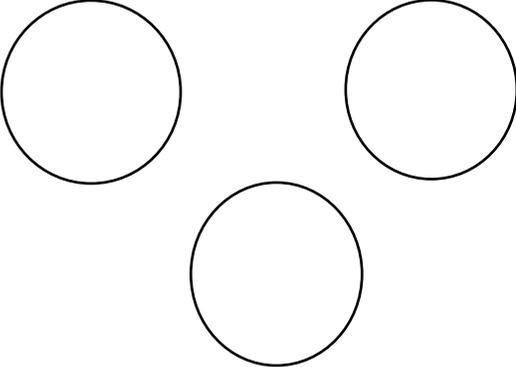
Se registra la presencia o ausencia de *Salmonella spp*, especificando la masa en gramos de la muestra analizada.

### 5.6. Ficha utilizada para realizar el análisis sensorial.

Ficha de Evaluación Sensorial

Fecha: \_\_\_\_\_ Nombre: \_\_\_\_\_

Delante de usted tiene 3 muestras:



¿Cuál es la muestra diferente?

Explique las características que las hace diferentes

¿Cuál es la muestra que más le agrada?

Indique la puntuación para cada una de las muestras (dos muestras en total teniendo en cuenta que una se repite).

Puntúe del 0 (no me agrada nada) al 5 (me agrada mucho)

	Color	Olor	Textura	Sabor

Ficha 1. Prueba realizada en el Análisis Sensorial

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abdollahi, M., Rezaei, M., Farzi, G., 2014. Influence of chitosan/clay functional bionanocomposite activated with rosemary essential oil on the shelf life of fresh silver carp. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49, 811–818. doi:10.1111/ijfs.12369
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446–475. doi:10.1016/j.fct.2007.09.106
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223 – 253. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022
- Deans, S., Ritchie, G., 1987. Antibacterial properties of plant essential oils. *Int. J. Food Microbiol.* 5, 165–180. doi:10.1016/0168-1605(87)90034-1
- Di Pasqua, R., Hoskins, N., Betts, G., Mauriello, G., 2006. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2745–2749. doi:10.1021/jf0527221
- Flavors, N.F., 2011. 4 Essential Oils 13–15.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., Bourke, P., 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 91–97. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.028
- Holley, R.A., Patel, D., 2005. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiol.* 22, 273–292. doi:10.1016/j.fm.2004.08.006
- Liu, T.T., Yang, T.S., 2012. Antimicrobial impact of the components of essential oil of *Litsea cubeba* from Taiwan and antimicrobial activity of the oil in food systems. *Int. J. Food Microbiol.* 156, 68–75. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.005
- Turina, A. del V, Nolan, M. V., Zygadlo, J.A., Perillo, M.A., 2006. Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. *Biophys. Chem.* 122, 101–113. doi:10.1016/j.bpc.2006.02.007