

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**VIABILIDAD Y DESARROLLO DE
STAPHYLOCOCCUS EN DIFERENTES
ALIMENTOS QUE CONTIENEN HUEVO**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR**

PAULA MATEOS ARLANZÓN

JULIO, 2018





Máster en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviedo.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Mario Díaz Fernández (Universidad de Oviedo)

Dra. Dña. Adriana Laca Pérez (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que Dña. **Paula Mateos Arlanzón** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Máster al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Máster Universitario en Biotecnología Alimentaria, 12ª promoción curso 2017-2018.

Oviedo, 13 de Julio de 2018

D. Mario Díaz

Dña. Adriana Laca

VºBº

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Máster en Biotecnología Alimentaria

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutor, el Dr. Mario Díaz Fernández, por concederme la oportunidad de desarrollar este proyecto junto al grupo de Tecnología de Bioprocesos y Reactores en la unidad de Tecnología Alimentaria.

A mi tutora, la Dra. Adriana Laca Pérez, por guiarme, transmitirme sus conocimientos y sobre todo, por darme la confianza necesaria para empezar esta nueva etapa de investigación.

A la Dra. Amanda Laca Pérez, por su enorme disponibilidad y amabilidad estando siempre dispuesta a ayudarme y aconsejarme como si de una tutora más se tratase.

Al coordinador del máster, el Dr. Manuel Rendueles de la Vega, por estar siempre pendiente de todos nosotros.

A mis compañeros del máster, por las largas tardes de clase y de estudio echándonos una mano siempre que ha sido posible. En especial a Pau, Laura, Lorena, Almudena, Andrea, Cristina y Rafa por ser mi familia adoptiva durante estos meses.

A todos mis amigos/as de Logroño y Salamanca, por transmitirme siempre su cariño a pesar de la distancia. A mis amigas de Avilés, porque volver a teneros cerca ha sido una de las cosas más bonitas de este año.

Y por supuesto a mis padres, a Diego, a Naiara y al resto de mi familia por todo su amor, su incondicional apoyo y por creer siempre en mí.

A TODOS ELLOS, MUCHÍSIMAS GRACIAS.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABLAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	6
I. INTRODUCCIÓN	7
II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	10
II.1. SEGURIDAD ALIMENTARIA	10
II.2. ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA (ETAs).....	10
II.3. HUEVOS Y PRODUCTOS DERIVADOS.....	16
II.3.1. Composición y estructura del huevo.....	17
II.3.2. Huevos y ETAs	20
II.3.3. Alimentos que contienen huevo: riesgos microbiológicos	21
II.4. MÉTODOS PARA EVITAR EL DESARROLLO DE PATÓGENOS.....	22
II.4.1. Conservación por calor	22
II.4.2. Conservación por frío	23
II.4.3. Conservación por reducción de la actividad del agua.....	24
II.4.4. Conservación por métodos químicos	24
II.4.5. Conservación por otros métodos.....	25
II.5. COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE PRODUCTOS ALIMENTARIOS	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
III.1. CEPA BACTERIANA UTILIZADA	28
III.2. ALIMENTOS MODELO EMPLEADOS	29
III.2.1. Preparación del preinóculo	29
III.2.2. Preparación de las salsas modelo.....	29
III.2.3. Preparación de los rellenos de repostería modelo	31
III.2.4. Toma de muestras	32
III.3. ANÁLISIS REOLÓGICO	32
III.4. ANÁLISIS MICROSCÓPICO	33
III.5. MEDIDA DEL pH.....	34
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35

IV.1. ESTRUCTURA DE LAS MATRICES ALIMENTARIAS	35
IV.2. VIABILIDAD Y DESARROLLO DE <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	41
IV.2.1. Efecto de la composición	41
IV.2.1.1. Salsas modelo	41
IV.2.1.2. Rellenos repostería modelo.....	46
IV.2.2. Efecto de la temperatura.....	49
IV.2.3. Efecto de la estructura	54
V. CONCLUSIONES	56
VI. REFERENCIAS	57



RESUMEN

El huevo y los ovoproductos son responsables de aproximadamente un 25% de las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) con origen conocido. Por otra parte, los estudios llevados a cabo sobre el comportamiento de microorganismos potencialmente patógenos en alimentos que contienen huevo son escasos en la bibliografía y la mayoría han sido centrados en el estudio de *Salmonella* spp., aunque existen más géneros como *Staphylococcus* cuya presencia en alimentos ha sido asociada a ETAs.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el objetivo de este proyecto es estudiar la viabilidad y el desarrollo de *Staphylococcus* spp. en diferentes alimentos que contienen huevo, empleando como microorganismo modelo *Staphylococcus warneri*. Así, se evaluó el comportamiento de la bacteria en diferentes matrices modelo (salsas y rellenos de repostería), analizando el efecto de la disponibilidad de oxígeno, dependiente de la posición y de la temperatura de almacenamiento, empleando técnicas de cultivo en placa y microscópicas. Asimismo, se analizó el posible efecto de la estructura de la matriz alimentaria sobre el desarrollo de *Staphylococcus*, en este caso se utilizaron medidas reométricas.

Los resultados obtenidos mostraron que el pH es un factor determinante en el comportamiento de *Staphylococcus*, ya que en las matrices alimentarias ensayadas con valores de pH inferiores a 4 (mayonesas), el crecimiento de *S. warneri* no tuvo lugar. Sin embargo, se observó que *Staphylococcus* si crece en las muestras alimentarias que incluyen queso entre sus ingredientes (crema de tiramisú), aunque la presencia de bacterias ácido lácticas (BAL) activas hace que su crecimiento se vea limitado. Por el contrario, en otros rellenos de repostería (crema de brazo de Fabiola) con menor carga microbiana, *S. warneri* se desarrolló hasta alcanzar valores superiores a 10^9 UFC/g. Por otro lado, se obtuvo que la disponibilidad de oxígeno afecta al crecimiento de *Staphylococcus*, que a pesar de ser facultativo, crece mejor en condiciones aerobias obteniéndose valores mayores de μ_{\max} en las zonas próximas a la superficie del alimento modelo. En cuanto al efecto de la temperatura se ha observado crecimiento incluso en condiciones de refrigeración (6 °C) para la crema de brazo de Fabiola, obteniéndose valores de μ_{\max} más elevados para las temperaturas más altas ensayadas (20 y 30 °C). Por último, se ha observado que el efecto de la estructura también afecta al crecimiento de *S. warneri* obteniéndose valores de μ_{\max} inferiores a los esperados para la temperatura a la que la crema experimenta un cambio en sus propiedades reológicas.



ABSTRACT

Egg and egg products are responsible of approximately 25% of foodborne diseases (FBD) of known origin. In addition, studies carried out on the behavior of potentially pathogenic microorganisms in foods containing egg are scarce in the literature and most of them have been focused on the study of *Salmonella* spp. However, there are more bacteria, such as *Staphylococcus*, whose presence in food has been associated with FBD.

In view of the above, the aim of this project is to study the viability and development of *Staphylococcus* spp. in different foods containing egg, using *S. warneri* as a model microorganism. The behavior of the bacteria in different model foods (sauces and confectionery products) was evaluated, analyzing the effect of oxygen availability depending on the position and storage temperature. Microbiological cultures and microscopic techniques has been employed. Also, the possible effect of the structure of the food matrix on the development of *Staphylococcus* was analyzed and, in this case, rheological measurements were used.

Results showed that pH is a determining factor on the behavior of *Staphylococcus*, due to the fact that in the model foods with pH lower than 4 (mayonnaise), the growth of *S. warneri* did not take place. On the contrary, it was observed that *Staphylococcus* grew in model foods that include cheese among its ingredients (tiramisu cream), although the presence of lactic acid bacteria (LAB) limited its growth. In other confectionery products (*brazo de Fabiola* cream) with a lower microbial load, *S. warneri* developed achieving values higher than 10^9 UFC/g. Additionally, the availability of oxygen affected the growth of *Staphylococcus*, which despite being facultative, grew better under aerobic conditions. Indeed, higher values of μ_{\max} were obtained in the areas closer to the surface of the food matrix. Concerning the temperature effect, growth was observed even under refrigerated conditions (6 °C) for the *brazo de Fabiola* cream, obtaining higher μ_{\max} values for the highest temperatures studied (20-30 °C). Finally, it was detected that the effect of the structure also affects the growth of *S. warneri*. The values of μ_{\max} obtained were lower than those expected for the temperature at which the cream experienced a change in its rheological properties.



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Claves de la OMS para la inocuidad de los alimentos, publicados para informar a los consumidores de los riesgos alimentarios	13
Figura 2. Alimentos implicados en brotes de ETAs en España entre 2008 y 2011	14
Figura 3. Consumo estimado de huevos en España (Unidades per cápita/año)	16
Figura 4. Corte longitudinal del huevo de gallina mostrando su estructura	17
Figura 5. Detalle de la estructura de la cáscara de huevo.....	18
Figura 6. Equipos utilizados para mantener condiciones de esterilidad.....	28
Figura 7. Stomacher (LabSystem 80 BIOMASTER).....	30
Figura 8. Jeringas llenas con el alimento modelo (mayonesa comercial)	30
Figura 9. Reómetro rotacional (ThermoFisher HAAKE MARS II).....	33
Figura 10. Microscopio óptico automático (Olympus BX61).....	34
Figura 11. pH-metro (Crison BASIC 20).....	34
Figura 12. Barrido de frecuencia de mayonesa comercial a 30 °C.....	37
Figura 13. Barrido de frecuencia de mayonesa “casera” a 30 °C.....	37
Figura 14. Barrido de frecuencia de crema de tiramisú a 30 °C.....	38
Figura 15. Barrido de frecuencia crema de brazo de Fabiola a 30 °C	38
Figura 16. Barrido de frecuencia crema de brazo de Fabiola a 25 °C	39
Figura 17. Barrido de frecuencia crema de brazo de Fabiola a 20 °C	39
Figura 18. Barrido de frecuencia crema de brazo de Fabiola a 15 °C	40
Figura 19. Barrido de frecuencia crema de brazo de Fabiola a 6 °C	40
Figura 20. Comportamiento de <i>S. warneri</i> en mayonesa comercial incubada a 30 °C	42
Figura 21. Comportamiento de <i>S. warneri</i> en mayonesa “casera” incubada a 30 °C.....	43
Figura 22. Comportamiento de la flora acompañante (control) en mayonesa “casera” sin inocular e incubada a 30 °C.....	43
Figura 23. Observación de la morfología de <i>S. warneri</i>	44



Figura 24. Observación de la morfología de la flora acompañante en muestras de mayonesa “casera”.....	45
Figura 25. Cultivo de la microbiota presente en cáscara de huevo en placa en medio NB.....	45
Figura 26. Crecimiento de <i>S. warneri</i> y flora acompañante en la zona superior de las jeringas rellenas con crema de tiramisú incubada a 30 °C.....	46
Figura 27. Observación de la morfología de la flora acompañante en muestras de crema de tiramisú	47
Figura 28. Crecimiento de <i>S. warneri</i> en crema de brazo de Fabiola incubada a 30 °C (I)	48
Figura 29. Crecimiento de la flora acompañante (control) en crema de brazo de Fabiola sin inocular e incubada a 30 °C (I)	48
Figura 30. Crecimiento de <i>S. warneri</i> en crema de brazo de Fabiola incubada a 30 °C (II).....	50
Figura 31. Crecimiento de <i>S. warneri</i> en crema de brazo de Fabiola incubada a 20 °C	50
Figura 32. Crecimiento de <i>S. warneri</i> en crema de brazo de Fabiola incubada a 6 °C	51
Figura 33. Crecimiento de la flora acompañante (control) en crema de brazo de Fabiola sin inocular e incubada a 30 °C (II)	51
Figura 34. Crecimiento de la flora acompañante (control) en crema de brazo de Fabiola sin inocular e incubada a 20 °C	52
Figura 35. Crecimiento de la flora acompañante (control) en crema de brazo de Fabiola sin inocular e incubada a 6 °C	52
Figura 36. Valores de los parámetros <i>A</i> y <i>z</i> obtenidos para la crema de Brazo de Fabiola a las distintas temperaturas analizadas	55
Figura 37. Ajuste para la ecuación de Arrhenius a 20 y 30 °C (Izquierda). Valor para 6 °C no incluido en el ajuste (Derecha)	55



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Agentes bacterianos asociados a ETAs habitualmente reconocidos a nivel global	15
Tabla 2. Temperatura de crecimiento óptima y mínima de diferentes tipos de microorganismos	23
Tabla 3. Parámetros A y z y obtenidos para los diferentes alimentos modelo a partir de los barridos de frecuencia realizados	35
Tabla 4. Valores del parámetro μ_{\max} obtenidos para las distintas temperaturas analizadas.....	54



LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AECOSANAgencia Española de Consumo Seguridad Alimentaria y Nutrición
APPCCSistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
A_wActividad del agua
BALBacterias Ácido Lácticas
CECTColección Española de Cultivos Tipo
CPSEstafilococos Coagulasa Positivos
ETAEnfermedad de Transmisión Alimentaria
FAOOrganización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
Fase lagFase de latencia
NBNutrient Broth (Medio de cultivo)
OMSOrganización Mundial de la Salud
SCNEstafilococos Coagulasa Negativos
UEUnión Europea
UFCUnidades Formadoras de Colonias
ACoeficiente de proporcionalidad (Pa)
G^*Módulo complejo (Pa)
G'Módulo elástico (Pa)
G''Módulo viscoso (Pa)
μ_{max}Velocidad máxima de crecimiento específico (s^{-1})
XConcentración de biomasa celular (UFC/g)
νFrecuencia (Hz)
zNúmero de coordinación (adimensional)



I. INTRODUCCIÓN

El huevo de gallina es un alimento ampliamente consumido en todo el mundo por varias razones. Aporta una gran cantidad de proteínas de elevado valor biológico, presenta una baja densidad calórica (aproximadamente 150 kcal/g), es muy versátil desde un punto de vista culinario y además tiene un bajo coste económico¹. Su producción mundial anual ronda las 74 millones de toneladas, de las cuales 7 millones se producen en la Unión Europea (UE). España es uno de los mayores productores de huevo y representa, junto a Francia, la cuarta parte de toda la producción europea. Cada año la UE procesa, aproximadamente, el 30% de su producción total de huevos en forma de ovoproductos^{2,3}.

Pero el huevo no es solo un alimento importante desde el punto de vista nutricional y económico, también lo es desde el punto de vista tecnológico. A lo largo de los años la industria alimentaria ha sabido aprovechar las ventajas que aporta el huevo y sus componentes (yema y clara) y, actualmente, existe una gran cantidad de productos, tales como mayonesas y otras salsas, productos de repostería o productos lácteos, que contienen huevo completo o alguno de sus componentes. Entre las propiedades tecnológicas más destacables del huevo se incluyen su capacidad espumante, emulsionante, espesante, aglutinante y colorante, entre otras⁴.

La seguridad alimentaria es un aspecto clave para evitar la propagación de infecciones e intoxicaciones alimentarias y, representa un importante desafío para los consumidores, la cadena de suministro de alimentos y las personas encargadas de proteger la salud a nivel nacional o mundial⁵. La mayoría de los brotes producidos por ETAs en España, a día de hoy, siguen teniendo un origen desconocido. Dentro de los que tienen un origen identificado los principales alimentos implicados son los huevos y ovoproductos (responsables de aproximadamente el 25% de las ETAs), seguidos de la carne y productos cárnicos, marisco y pescado y derivados⁶. Entre los patógenos implicados en estas ETAs destacan bacterias pertenecientes a los géneros *Salmonella* spp., *Escherichia* spp., o *Staphylococcus* spp.⁷.

El género *Staphylococcus* se encuentra de manera ubicua en la naturaleza y engloba 40 especies de las cuales 16 se pueden encontrar en los seres humanos⁸. *Staphylococcus aureus* es el miembro más virulento de este género y es una de las causas más comunes de infecciones nosocomiales, como la neumonía, infecciones de heridas postoperatorias o endocarditis. Es muy importante también en seguridad alimentaria porque es capaz de



causar intoxicaciones alimentarias mediadas por toxinas que son altamente estables y resistentes al calor, congelación e irradiación, por lo que una vez que se forman en el alimento son muy difíciles de eliminar^{9,10}.

Para preservar la seguridad alimentaria es necesario determinar las fuentes de contaminación, así como los factores que regulan el crecimiento de los microorganismos a fin de desarrollar técnicas eficaces de control. En relación a lo anterior, modelizar el comportamiento bacteriano en los alimentos es una herramienta esencial, para conocer la respuesta de los patógenos frente a diversos factores ambientales pudiendo así seleccionar aquellas prácticas que garanticen la calidad e inocuidad alimentaria de los consumidores y permitiendo diagnosticar el grado de alteración de un producto¹¹.

El conocimiento del comportamiento de los patógenos en sistemas alimentarios es imprescindible para cualquier prevención o actuación sobre una posible infección o intoxicación alimentaria. En la mayoría de los casos, los estudios del comportamiento microbiano en alimentos han sido desarrollados en medios líquidos¹², habiendo muy pocos trabajos que aporten información en el campo de los productos sólidos. Por tanto, es necesario ampliar el conocimiento en este área de la seguridad alimentaria, ya que la estructura de los medios sólidos tienen una estrecha relación con el crecimiento microbiano puesto genera limitaciones difusionales y alteraciones fisiológicas en la matriz alimentaria afectando al desarrollo bacteriano. Así pues, la estructura del alimento afectará a la magnitud, tipo y distribución de los microorganismos. La mayor parte de los alimentos estructurados presentan un carácter heterogéneo dificultando su estudio, es por esto que en la actualidad se utilizan alimentos modelo que simulan la estructura y composición de los alimentos reales lo que facilita su análisis^{13,14}.

El objetivo principal de este proyecto es estudiar la viabilidad y el desarrollo de *Staphylococcus* spp. en distintos alimentos que contienen huevo. Para ello se plantean los siguientes objetivos concretos:

- ❖ Evaluar el comportamiento de *Staphylococcus* spp. en diversas matrices alimentarias con distintas composiciones y características estructurales (salsas y rellenos de repostería) empleando como modelo la especie *S. warneri*.



- ❖ Estudiar las características estructurales de dichas matrices a fin de determinar su posible efecto sobre el comportamiento de *Staphylococcus*.
- ❖ Analizar el efecto de la disponibilidad de oxígeno y de la temperatura de conservación sobre el comportamiento de *Staphylococcus* en las diferentes matrices alimentarias.



II. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

II.1. SEGURIDAD ALIMENTARIA

El concepto de seguridad alimentaria apareció en los años 70 e inicialmente sólo consideraba la producción y disponibilidad de alimentos a nivel nacional y global. Esta idea fue evolucionando hasta que, en la década de los 90, se estableció la percepción actual que incluye la inocuidad, las preferencias culturales y reafirma la seguridad alimentaria como un derecho humano. Para la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), a día de hoy, la seguridad alimentaria se cumple cuando todas las personas tienen acceso en todo momento (ya sea físico, social y económico) a alimentos suficientes, inocuos y nutritivos para cubrir sus necesidades nutricionales y sus preferencias culturales para una vida sana y activa¹⁵.

Por tanto, uno de los aspectos más importantes de la seguridad alimentaria se refiere a las buenas prácticas llevadas a cabo en la producción, distribución y consumo de alimentos con el fin de asegurar la ausencia de riesgos para la salud pública. Estos riesgos están distribuidos a lo largo de toda la cadena alimentaria y se pueden clasificar en químicos, físicos o biológicos. Los biológicos hacen referencia a la aparición de microorganismos indeseados, bien de manera natural en las materias primas (endógenos), o bien integrados al alimento durante el procesado, almacenamiento y transporte, a través de las superficies de contacto y el personal (exógenos). Atendiendo a su relación con el consumidor estos microorganismos pueden ser clasificados en microorganismos saprófitos, que alteran la composición y calidad del alimento, y microorganismos patógenos responsables de ETAs^{16,17}.

II.2. ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA (ETAs)

Las ETAs representan un importante desafío no sólo para la cadena de suministro de alimentos y las personas encargadas de proteger la salud, sino también para los consumidores⁵. No es posible conocer con exactitud el impacto global de ETAs ya que por un lado, muchos países en vías de desarrollo no cuentan con sistemas que exijan que los médicos notifiquen a las autoridades sanitarias que se han producido¹⁸ y, por otro lado, porque en los países desarrollados la mayoría de estas enfermedades se dan como casos aislados y, a menudo, no se informan. Sin embargo, en ocasiones afectan a un gran número de personas, comprometiendo los sectores económicos y los recursos



sanitarios. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que a nivel mundial mueren 2,2 millones de personas anualmente a causa de enfermedades transmitidas a través de alimentos y de agua^{5,19}.

Como ya se ha mencionado, la contaminación de los alimentos puede ocurrir en cualquier punto a lo largo de la cadena alimentaria, y posteriormente los microorganismos patógenos pasan al cuerpo del consumidor a través de la ingestión de alimentos contaminados^{5,20}. Cabe destacar que existen tres tipos de ETAs de origen microbiano: en primer lugar, las infecciones que se dan cuando un microorganismo llega vivo al hospedador humano multiplicándose dentro de él y causándole daño. En segundo lugar, las intoxicaciones que son debidas a la ingestión de una sustancia tóxica presente en el alimento de origen microbiano (toxina). Por último, las toxiinfecciones donde tiene lugar una combinación de las dos anteriores, un microorganismo coloniza un determinado tejido u órgano del hospedador a la vez que produce toxinas *in situ* y no en el alimento^{16,21}. Los estudios epidemiológicos que se han realizado en España consideran que existen tres causas principales relacionadas con las ETAs:

❖ **Contaminación por incorrecta conservación y consumo de alimentos**

Conservar los alimentos a temperatura ambiente supone un grave riesgo para la salud ya que, aunque en la mayoría de los casos el crecimiento óptimo de los patógenos está entre 34-37 °C, estos pueden multiplicarse a temperaturas fuera de este rango. Es por esto que según la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) se deben almacenar los alimentos cocinados y los perecederos lo antes posible por debajo de los 5 °C y la comida ya cocinada y lista para ser consumida debe mantenerse por encima de los 60 °C²².

Por otro lado, es muy importante cocinar completamente los alimentos, ya que pueden quedar crudos en su interior o muy poco cocinados, lo que (junto con un recalentamiento inapropiado o una descongelación incorrecta) favorece la aparición de ETAs. También es importante comprobar la fecha de caducidad y que el envoltorio del alimento no muestre ningún signo de rotura antes de su consumo^{19,22}. Por último, la preparación de alimentos con una excesiva antelación (más de dos horas) suele conllevar que estos se expongan durante mucho tiempo a condiciones que favorecen el crecimiento microbiano como la exposición a la luz, el contacto con el aire, o la temperatura ambiente ya citada¹¹.



❖ **Contaminación causada por manipuladores y equipos infectados**

Es muy importante mantener los equipos de cocina limpios en todo momento (antes y después de su uso). Asimismo, los malos hábitos de higiene de los manipuladores de alimentos aumentan el riesgo de transmisión de ETAs²³.

En cuanto a los manipuladores, el Código Alimentario Español indica que: *“el personal aquejado de enfermedad transmisible, en cualquiera de sus periodos, o que sea portador de gérmenes, deberá ser excluido de toda actividad directamente relacionada con los alimentos hasta la total curación, clínica y bacteriológica, del proceso o del estado de portador”*²⁴. Cabe destacar a los portadores asintomáticos que son individuos que llevan en su organismo algún agente patógeno que no les causa sintomatología y por lo tanto, pueden actuar inintencionadamente como vectores (a alimentos u otras personas) de patógenos, como por ejemplo *S. aureus*²⁵, y contribuir a intoxicaciones alimentarias.

❖ **Contaminación cruzada entre productos cocinados y productos crudos**

Otra causa muy común es la que se conoce como contaminación cruzada. Este tipo de contaminación tiene lugar cuando un alimento cocinado entra en contacto directo con un alimento crudo contaminado o indirectamente con una superficie u utensilio que haya estado en contacto con el alimento contaminado. Por este motivo según la AECOSAN es importante prestar atención a la higiene de las superficies, a no almacenar alimentos crudos junto a productos cocidos, así como utilizar diferentes utensilios para su manipulación¹⁶.

Por tanto, resulta fundamental que los consumidores estén bien informados en lo que respecta a prevenir las ETAs. Este es un aspecto vital en el campo de la seguridad alimentaria, tanto que en 2015 el tema del Día Mundial de la Salud fue la inocuidad de los alimentos. La OMS publicó un documento en el cual recomendaba cinco pasos clave para prevenir las ETAs: mantenga la limpieza, separe alimentos crudos y cocidos, cocine completamente, mantenga los alimentos a temperaturas seguras y use agua y materias primas seguras (**Figura 1**).



Figura 1. Claves de la OMS para la inocuidad de los alimentos, publicados para informar a los consumidores de los riesgos alimentarios²⁶.

También, con el objetivo de proteger la salud de los consumidores, se creó una nueva legislación en la Unión Europea (UE) que afecta a todos los países miembros, mercado interior e importaciones de terceros países. El Reglamento (CE) 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, obliga a que todas las industrias alimentarias pertenecientes a la UE apliquen sistemas de control higiénico-sanitarios y a implantar el Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC). Este sistema de análisis protege la inocuidad de los alimentos identificando los peligros específicos asociados a cada alimentos y adopta diferentes medidas de control²⁷.

Las ETAs tienen alrededor de 250 agentes causantes entre los cuales se encuentran bacterias, virus, hongos, parásitos, priones, toxinas y metales, siendo las más frecuentes



las originadas por bacterias²¹, tales como *Salmonella* spp., *S. aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Clostridium perfringens* o *Bacillus cereus*, entre otras (Tabla 1). El género *Staphylococcus* está integrado por cocos Gram positivos que tienden a agruparse en racimos, siendo la mayoría aerobios facultativos. Incluye 40 especies de las cuales 16 se pueden encontrar en la mucosa y piel humana⁸. Aunque la mayor parte de estas especies no son patógenas, este género incluye la bacteria *S. aureus*, cuya importancia desde el punto de vista de la seguridad alimentaria radica en su capacidad para producir toxinas¹⁰ y su elevada resistencia a los antibióticos²⁵.

Hay una gran parte de brotes producidos por ETAs en España que siguen teniendo origen desconocido. Dentro de los que tienen un origen conocido los principales alimentos implicados son los huevos y ovoproductos (en torno al 25%) seguido de la carne y productos cárnicos (8%), marisco (7,4%) y pescado y derivados (6,5%) (Figura 2).

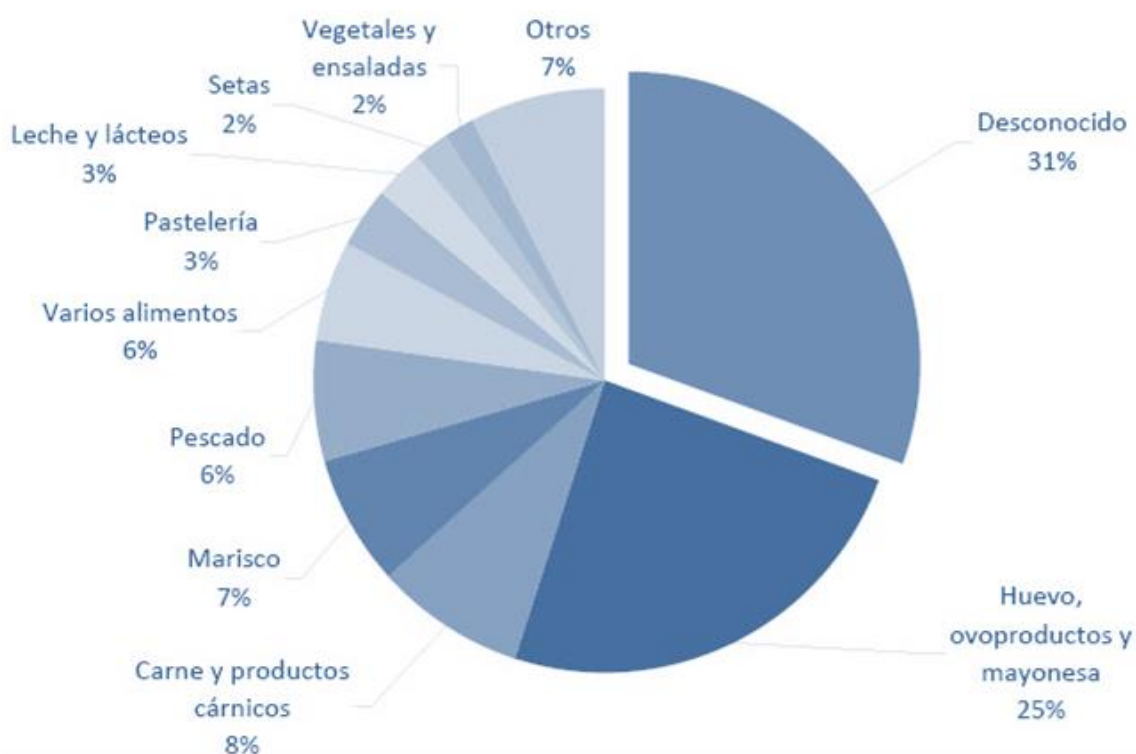


Figura 2. Alimentos implicados en brotes de ETAs en España entre 2008 y 2011⁶.



Tabla 1. Agentes bacterianos asociados a ETAs habitualmente reconocidos a nivel global⁷.

Agente	Síntomas de la enfermedad	Alimentos implicados
<i>Bacillus anthracis</i> (carbunco)	Gastroenteritis, vómitos, deposiciones hemorrágicas.	Carnes de animales enfermos.
<i>Bacillus cereus</i> (exoenterotoxina)	Náuseas, vómitos y diarrea.	Productos de cereales, arroz cocido, albóndigas, salchichas almacenadas a temperaturas cálidas.
<i>Brucella abortus</i> , <i>B. melitensis</i> y <i>B. suis</i>	Fiebre, escalofríos, sudores, debilidad, malestar pérdida de peso.	Leche cruda, queso.
<i>Campylobacter jejuni</i>	Dolores abdominales, diarreas, dolor de cabeza, fiebre, anorexia, síndrome de Guillain-Barre.	Leche cruda, hígado de res, almejas crudas, carnes crudas (res, pollo, cerdo), contaminación cruzada.
<i>Clostridium botulinum</i> (exoneurotoxina A, B, E y F)	Vértigo, visión doble, dificultad para deglutir, hablar y respirar, debilidad muscular, parálisis respiratoria, muerte.	Conservas caseras poco ácidas, pescado envasado al vacío, huevos de pescado fermentados.
<i>Clostridium perfringens</i> (endoenterotoxina)	Dolores abdominales, diarrea.	Carne de res o ave cocidas, caldos, salsas, sopas almacenadas a temperaturas cálidas o bajo refrigeración insuficiente.
<i>Enterobacter sakasaki</i>	Meningitis, enteritis.	Fórmulas infantiles en polvo.
<i>Escherichia coli</i> (enteroinvasiva, enterotoxigénica)	Dolores abdominales, diarrea, náuseas, vómitos, fiebre, cefalalgia, mialgia.	Alimentos diversos no tratados higiénicamente: ensaladas, quesos frescos.
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	Diarrea acuosa seguida por diarrea sanguinolenta, dolor abdominal severo, sangre en la orina, síndrome urémico hemolítico.	Hamburguesas, leche cruda, embutidos, yogur, lechuga, agua, por contaminación cruzada o cocción inadecuada.
<i>Mycobacterium bovis</i>	Tuberculosis: lesiones pulmonares y renales, hígado, bazo y ganglios.	Leche cruda.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Náusea, vómito, diarrea, meningitis, encefalitis, septicemia, abortos.	Leche cruda o con pasteurización ineficiente, quesos frescos, hortalizas crudas, carnes crudas, pescado crudo y ahumado, salchichas fermentadas.
<i>Salmonella typhi</i> , <i>S. paratyphi</i>	Fiebre tifoidea, dolor de cabeza, dolores abdominales y corpóreos, diarrea o constipación.	Leche cruda, quesos, berros, mariscos, pescado, pollo, huevos, carnes crudas, aderezos elaborados con huevos sin pasteurizar, alimentos contaminados por trabajadores, contaminación cruzada, refrigeración insuficiente.
<i>Salmonella</i> sp.	Náusea, vómito, dolores abdominales, fiebre, dolor de cabeza, artritis.	Leche cruda, quesos, berros, mariscos, pescado, pollo, huevos, carnes crudas, aderezos elaborados con huevos sin pasteurizar, alimentos contaminados por trabajadores, contaminación cruzada, refrigeración insuficiente.
<i>Shigella</i> sp.	Dolores abdominales, diarrea, fiebre, vómito, sangrado.	Ensaladas (papa, atún, pollo, macarrones) hortalizas crudas, rellenos de emparedados, leche y productos lácteos, pollo, pastelillos rellenos.
<i>Staphylococcus aureus</i> (exo-enterotoxina A, B, C, D y E)	Náuseas, vómito, dolores abdominales, diarreas.	Jamón, productos de carne de res y ave, pasteles rellenos de crema, mezclas de alimentos, refrigeración, contaminación o manipulación deficientes.
<i>Vibrio cholerae</i> biotipos clásico y El Tor (enterotoxina)	Diarrea acuosa y profusa, vómitos, deshidratación, sed, dolores abdominales.	Pescados y mariscos crudos, alimentos lavados o preparados con aguas contaminadas.
<i>Vibrio vulnificus</i>	Diarrea, dolores abdominales, escalofríos, septicemia.	Ostras crudas o recontaminadas, cangrejos, almejas.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Fiebre, dolores abdominales, diarrea, vómito.	Carnes, ostras, pescado, leche cruda.



II.3. HUEVOS Y PRODUCTOS DERIVADOS

Los huevos de gallina constituyen un aporte de nutrientes altamente biodisponibles, siendo una fuente popular y barata de proteínas consumida a nivel mundial. Como son uno de los productos más versátiles, los huevos también son ampliamente utilizados en las industrias alimentarias debido a sus diversas características tecnológicas²⁸.

A nivel mundial se producen, aproximadamente, 74 millones de toneladas de huevos. Asia es la región con mayor producción, seguida de la UE y de Estados Unidos. Actualmente la UE comercializa casi 7 millones de toneladas de huevos por año, de las cuales unas 400000 toneladas son exportadas al mercado global. España y Francia son los mayores productores de huevo en la UE y representan, aproximadamente, una cuarta parte de toda la producción europea^{2,3}. Aunque en los últimos años se había observado un ligero descenso en el consumo de huevos en nuestro país, desde 2013 ha ido incrementándose alcanzando en 2016 un valor de 254 huevos per cápita (**Figura 3**).

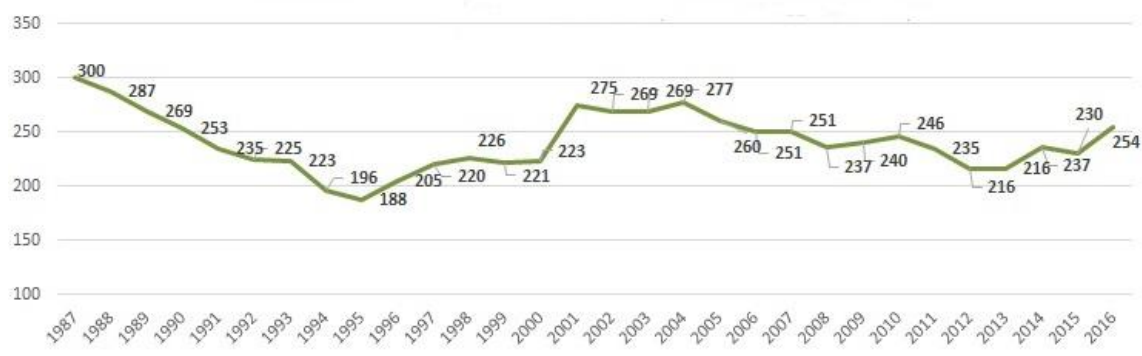


Figura 3. Consumo estimado de huevos en España (Unidades per cápita/año)³.

Además, cabe destacar que en la UE se procesan en forma de ovoproductos aproximadamente el 30% del total de huevos producidos³. El reglamento (CE) n° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal define los ovoproductos como “*los productos transformados resultantes de la transformación de huevos, de diversos componentes o mezclas de huevos, o de la transformación subsiguiente de tales productos transformados*”²⁹.

II.3.1. Composición y estructura del huevo

La estructura del huevo resulta fundamental para determinar cómo debe ser manipulado y poder garantizar así la máxima calidad y seguridad de este alimento⁴. Los tres principales componentes del huevo de una gallina son la cáscara, la albúmina (también conocida como clara) y la yema o vitelo (**Figura 4**), que representan respectivamente en torno al 10%, 63% y 27% del peso total del huevo³⁰.

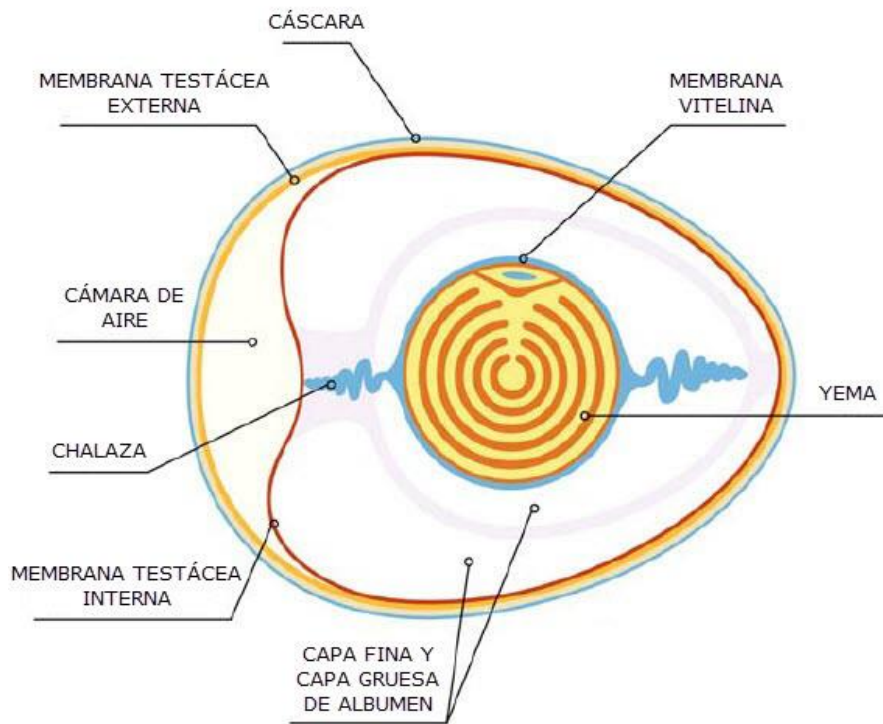


Figura 4. Corte longitudinal del huevo de gallina mostrando su estructura³¹.

❖ Cáscara

La cáscara recubre exteriormente al huevo manteniendo su integridad física, protegiendo del daño mecánico y previniendo la contaminación por bacterias y otros patógenos. También regula el intercambio de gases entre el embrión en desarrollo y el ambiente externo y controla las pérdidas de agua. Además, la cáscara de huevo constituye una fuente de nutrientes, principalmente calcio, para dicho embrión. Está compuesta en gran parte de carbonato cálcico (95%) y en una cantidad mucho menor de matriz orgánica^{32,33} y puede dividirse en varias capas (**Figura 5**).

La capa más profunda es la membrana testácea interna que está en contacto con la albúmina y a continuación de esta se encuentra la membrana testácea externa. Ambas,

se componen de fibras de proteínas (arginina, cistina, ácido glutámico, histidina, metionina y prolina) entrelazadas y se encuentran en paralelo a la superficie del huevo proporcionando soporte estructural a la cáscara. Las membranas testáceas influyen en gran medida a la resistencia de la cáscara y también a evitar la penetración de microorganismos a la clara del huevo³².

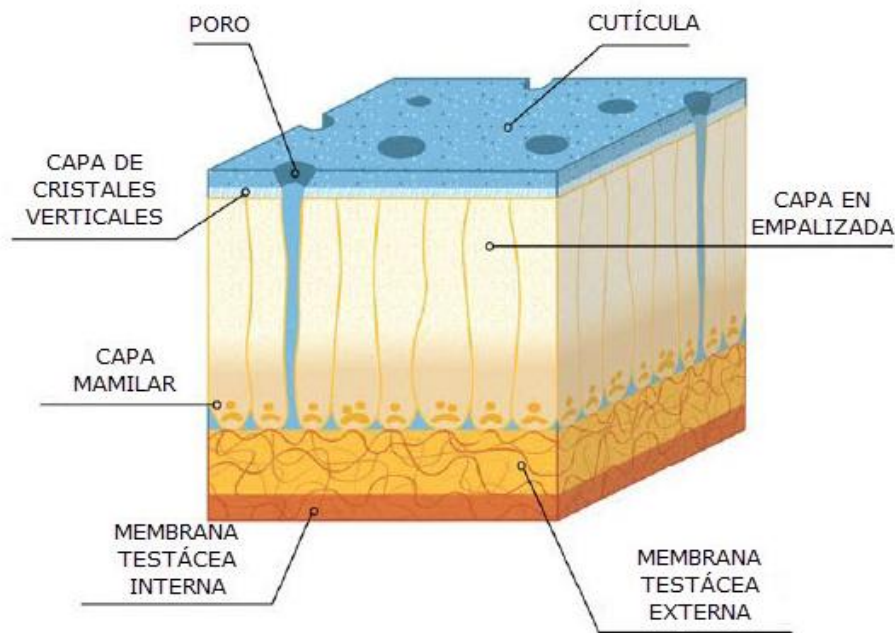


Figura 5. Detalle de la estructura de la cáscara de huevo³¹.

En la parte central de la cáscara se encuentra la porción calcificada dividida a su vez en tres regiones: la capa mamilar, la capa en empalizada y la capa de cristales verticales. La capa mamilar es la capa más interna de la porción calcificada y se encuentra en contacto con la membrana testácea externa por medio de numerosos conos de carbonato cálcico. Por encima se encuentra la capa en empalizada formando la porción principal de la capa de la porción calcificada aunque también posee una pequeña porción de matriz orgánica (2-5%) incorporada a los cristales de calcita. En esta capa se forman los poros cuando los cristales adyacentes no se unen completamente dejando espacio entre ellos. Finalmente, se encuentra la capa de cristales verticales que es una capa muy estrecha y delgada sobre la que se forma la cutícula³².

En la zona más externa de la cáscara se encuentra la cutícula, una capa orgánica constituida fundamentalmente por proteínas (90%) y con un elevado contenido de cistina, glicina, ácido glutámico, lisina y tirosina. También posee una pequeña cantidad de lípidos y polisacáridos³². Esta capa contiene entre 7000 y 17000 canales de poros



distribuidos de manera desigual por su superficie, necesarios para el intercambio de gases³⁴.

❖ **Albumen o clara**

El albumen está compuesto principalmente de agua (88%) y proteínas (11%), el resto consiste en carbohidratos y minerales, y no presenta prácticamente lípidos. La ovoalbúmina, la conalbúmina, el ovomucoide, la lisozima y la ovomucina se consideran las principales proteínas del albumen, mientras que la avidina, la cistatina, la ovomacroglobulina, ovoflavoproteína, ovoglicoproteína y ovoinhibitor se encuentran de manera minoritaria en la clara de huevo³⁵.

La ovoalbúmina es la proteína principal de la clara de huevo (representa el 54% de proteína total), tiene gran interés desde el punto de vista nutritivo³⁵ y por poseer grupos tiol libres que le confieren una actividad antioxidante. La conalbúmina u ovotransferrina destaca por su actividad súper óxido dismutasa y su capacidad quelante para unir cationes de Fe^{3+} y otros metales³⁰. El ovomucoide es bien conocido como inhibidor de la tripsina y es considerado como el alérgeno principal presente en la clara de huevo. La ovomucina es responsable de la estructura de gel de la clara de huevo³⁵ y la viscosidad varía entre las capas gruesas y delgadas de la clara de huevo a causa de los diferentes contenidos de esta proteína³⁴. Por último, la lisozima tiene la capacidad de lisar las paredes celulares de las bacterias al catalizar la hidrólisis de los enlaces β -(1,4) entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina del peptidoglicano³⁶.

❖ **Vitelo o yema**

La yema es la parte central de huevo, contiene las células germinales y es donde se produce la fecundación y el posterior desarrollo embrionario⁴. Está recubierta por la membrana vitelina, que da forma a la yema separándola de la clara, y se compone principalmente de agua (50%), proteínas (15-17%), lípidos (31-35%) y carbohidratos (1%). La fracción proteica presente en la yema de huevo consiste en lipovitelinas, livetina, fosvitina y lipoproteínas de baja densidad. Además contiene aproximadamente un 1% de carotenoides, lo que le aporta su color amarillo característico³⁵.



II.3.2. Huevos y ETAs

El huevo se encuentra protegido de manera natural gracias a las barreras físicas que le dan la cáscara y las membranas testáceas y a las barreras químicas antibacterianas presentes en el albumen⁴. Es por esto que, el 90% de los huevos son estériles en el momento de la puesta pero pueden contaminarse fácilmente por bacterias que proceden del aparato genital, del tracto intestinal o de las heces de las gallinas, por bacterias del ambiente o por bacterias procedentes de la alimentación de la gallina. Aunque solo una pequeña parte de estas bacterias son patógenas y, a pesar de las medidas tomadas por la industria alimentaria con el fin de evitar riesgos para la salud de los consumidores, el huevo y los ovoproductos forman parte de los principales alimentos implicados en brotes de intoxicación alimentaria en España (en torno al 25%)⁶.

En este contexto, la regulación EC 2073/20052, de 15 de noviembre de 2005, sobre criterios microbiológicos relacionados con los alimentos³⁷, introduce criterios de higiene para cinco categorías de productos alimentarios entre los que se encuentran los huevos y ovoproductos. Los criterios están definidos para seis peligros distintos: *Salmonella* spp. , toxinas estafilocócicas (producidas por *Staphylococcus* spp.), *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter sakazakii* e histamina¹⁰.

Dentro del género *Staphylococcus* se encuentran por un lado los estafilococos coagulasa positivos (CPS) que incluyen al patógeno *S. aureus*³⁸ que, como ya se ha mencionado, es muy importante desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, por su capacidad para producir toxinas¹⁰. Las toxinas estafilocócicas son altamente estables y resistentes al calor, congelación e irradiación por lo que una vez que se forman en el alimento son muy difíciles de eliminar. Por otro lado, se encuentran los estafilococos coagulasa negativos (SCN) entre los que se incluye *S. warneri* que al tratarse de una especie, generalmente, no virulenta es un microorganismo adecuado para usar como modelo en estudios de laboratorio³⁹.

Aunque algunos autores han estudiado el comportamiento de *S. aureus*^{40,41,42} en huevos y ovoproductos, la mayoría de los trabajos publicados sobre este tema se centran en la contaminación del huevo por *Salmonella* spp^{43,12,44} y, son escasos los trabajos dedicados a otras especies^{28,45,46}. Por otro lado, apenas existen publicaciones acerca de ETAs relacionadas con ovoproductos y platos derivados de huevo, esto es debido a que la mayor parte de los trabajos se centran en técnicas de prevención asociadas a la contaminación del huevo durante el proceso de producción pero no durante su



procesado posterior⁴³. Asimismo, la mayoría de los estudios han sido realizados sobre ovoproductos líquidos^{12, 47} y apenas se encuentra información sobre el comportamiento de patógenos en alimentos sólidos conteniendo huevo. Es por esto que estudiar el comportamiento de *Staphylococcus* en diferentes alimentos estructurados que contienen huevo es un tema de gran interés para ampliar el conocimiento en este campo, a fin de determinar las mejores prácticas para garantizar la calidad y seguridad alimentaria de los consumidores.

II.3.3. Alimentos que contienen huevo: riesgos microbiológicos

Al igual que ocurre con el huevo, los alimentos que lo contienen entre sus ingredientes también son susceptibles a la contaminación por patógenos. Además, este riesgo se ve incrementado significativamente por la existencia de productos que se consumen tradicionalmente de manera cruda o poco cocinados⁴⁸, como por ejemplo diferentes salsas y aliños preparados de manera “casera” (mayonesa, salsa alioli, salsa holandesa etc.) determinados productos de repostería (mousse, merengue, tiramisú etc.), helados “caseros” o ponche de huevo y otras bebidas preparadas con huevo que no estén completamente cocidas⁴⁹.

La mayonesa es una de las salsas más utilizadas en todo el mundo, es una emulsión de aceite vegetal en agua en la que la yema de huevo resulta fundamental para mantener la estabilidad del producto⁵⁰. Existen varios estudios recientes en los que se ha estudiado la contaminación por *Salmonella* spp. de productos crudos de huevo como la mayonesa^{51,48}, puesto que es un alimento que habitualmente es responsable de ETAs.

También son frecuentes los casos de infecciones e intoxicaciones alimentarias relacionados con los productos de repostería. En los últimos años el tiramisú ha ido ganando gran popularidad entre los países de Europa⁵² y aunque, a día de hoy, las industrias alimentarias utilizan alternativas al empleo de huevo crudo como ingrediente en su elaboración, este postre es preparado de manera “casera” en muchos hogares. A parte del huevo crudo entre los ingredientes de este postre destaca un tipo de queso blando, el queso mascarpone, que también pertenece al grupo de los productos alimentarios que son vulnerables a la contaminación por microorganismos indeseados. Se han detectado en diversos países brotes relacionados con su ingesta producidos por especies como *E. coli*, *Salmonella* spp. y *S. aureus*^{48,9}.



II.4. MÉTODOS PARA EVITAR EL DESARROLLO DE PATÓGENOS

Desde la antigüedad, la conservación de los alimentos jugó un papel muy importante en la supervivencia de la humanidad mejorando la estabilidad de diferentes productos alimentarios⁵³. Actualmente existen una gran variedad de métodos para evitar el desarrollo de microorganismos en alimentos entre los que destacan la conservación por calor, por frío, por reducción de la actividad del agua (A_w), por métodos químicos, así como nuevas tecnologías emergentes como la irradiación y el plasma frío.

II.4.1. Conservación por calor

El tratamiento térmico es uno de los métodos más utilizados en la conservación de alimentos, incluso teniendo en cuenta sus desventajas y el desarrollo de nuevas tecnologías de conservación. Se basa en el uso de calor para la inactivación microbiana y enzimática, que se obtiene fundamentalmente debido a la desnaturalización de proteínas y a la fusión de los componentes lipídicos. Sin embargo, este tipo de tratamiento produce también otros efectos, generalmente no deseados, tales como cambios en las propiedades organolépticas o la destrucción de nutrientes. Por lo tanto, el reto para la industria alimentaria en este campo es el de garantizar un producto seguro y estable, con la reducción o eliminación de la microbiota y la inactivación enzimática, pero conservando las características organolépticas y nutricionales, logrando además bajos costes y consumo de energía⁵⁴.

Los dos principales procesos térmicos empleados en la conservación de alimentos son la pasteurización y la esterilización. La pasteurización se lleva a cabo, generalmente, a presión atmosférica, con temperaturas entre 65-100 °C y durante un tiempo determinado que depende fundamentalmente de la temperatura empleada. Es un método que necesita para ser utilizado tecnologías complementarias, tales como, la refrigeración o el uso de conservantes para garantizar así la inocuidad del alimento. Se usa comúnmente para la conservación de productos lácteos como la leche líquida⁵⁴ y ovoproducidos como huevos líquidos pasteurizados¹, eliminando patógenos como *Salmonella* spp. y *Staphylococcus* spp., garantizando la seguridad y prolongando la vida útil de estos alimentos.

La esterilización es un proceso térmico más drástico que somete al alimento a temperaturas de 120°-150 °C y a elevadas presiones durante un periodo de tiempo más corto que el de la pasteurización. El producto final no debería tener ni células y ni



esporas vegetativas capaces de crecer en condiciones normales de transporte y almacenamiento⁵⁴. Por lo tanto, es un proceso que asegura, además de la seguridad, la estabilidad en condiciones ambientales (en general durante períodos del orden de meses a algunos años). Se utiliza para conservas que pueden estar contaminados con esporas de *Clostridium botulinum*, que representan un riesgo potencial para la seguridad del producto y deben ser inactivadas¹¹.

II.4.2. Conservación por frío

El frío afecta al crecimiento de las bacterias y otros microorganismos produciendo una ralentización de sus procesos metabólicos y químicos. En este sentido, un descenso de temperatura produce un retraso en el deterioro de los alimentos durante el almacenamiento¹¹. Este retraso, generalmente, será mayor cuanto menor sea la temperatura aunque cabe destacar que hay microorganismos psicrófilos capaces de sobrevivir y crecer a bajas temperaturas (**Tabla 2**) y será necesario el uso de técnicas complementarias. Entre los métodos más utilizados se encuentran la refrigeración y la congelación.

Tabla 2. Temperatura de crecimiento óptima y mínima de diferentes tipos de microorganismos⁵⁴.

Tipo de microorganismo	T ^a mínima (°C)	T ^a óptima (°C)
Psicrófilos	0-5	12-18
Psicrótrofos	0-5	20-30
Mesófilos	5-10	30-40
Termófilos	30-40	55-65

La refrigeración consiste en conservar los alimentos, a corto plazo, a bajas temperaturas y siempre por encima de su temperatura de congelación, esto es, entre 2-4 °C. Se logra así que los productos alimentarios conserven sus características organolépticas y el valor nutricional inicial. Sin embargo, es importante tener en cuenta que este proceso no resulta en la inactivación total microbiana, y, por lo tanto, debe estar asociado con otro método de conservación⁵⁴.

A diferencia de la refrigeración, la congelación es una técnica de conservación a largo plazo donde la temperatura se mantiene en torno a -18 °C. En esta técnica se



elimina el calor latente de la comida, con la consiguiente solidificación del agua. El cambio en el estado físico del agua define la congelación como un método muy eficaz de conservación ya que reduce la movilidad molecular y dificulta la interacción entre los reactivos⁵⁴.

II.4.3. Conservación por reducción de la actividad del agua (Aw)

La disminución del contenido de agua de un alimento favorece una buena conservación debido a que la mayor parte de los procesos microbianos se llevan a cabo en medios acuosos⁵⁴. Un alimento con una Aw por debajo del 0,7 es considerado muy estable porque la mayoría de patógenos, tales como cocos grampositivos o bacilos gramnegativos, requieren valores de Aw entre 0,85 y 0,95¹¹.

Entre los métodos más empleados para disminuir el contenido de agua de los alimentos destacan el secado, la deshidratación y la liofilización. El secado consiste en reducir la humedad del alimento hasta equilibrarla con la del ambiente, puede realizarse a temperatura ambiente o acelerar el proceso mediante calor artificial o la adición de sal como, por ejemplo, en pescados o embutidos. Con la deshidratación se consigue la eliminación prácticamente total del agua mediante el uso de calor artificial y se obtienen productos como huevo, leche o café en polvo¹¹. Por último, la liofilización consigue la disminución de la Aw mediante una sublimación del agua libre de la fase sólida del alimento, acompañada de una evaporación de las fracciones remanentes de agua no congelable. Mediante la liofilización se consigue mantener las propiedades organolépticas de los alimentos por lo que es considerado uno de los métodos más eficaces en la conservación de productos alimentarios⁵⁵.

II.4.4. Conservación por métodos químicos

En la actualidad, la industria alimentaria aprovecha las propiedades de los compuestos químicos utilizándolos para la conservación de alimentos. Entre los compuestos químicos que más se emplean están los antioxidantes cuya función principal es evitar o retrasar la oxidación de los componentes del alimento, principalmente de los lípidos que sufren reacciones de rancidez. También están los aditivos que son sustancias que se adicionan directamente a alimentos y bebidas durante su elaboración para proporcionar o intensificar su aroma, su color o su sabor; para mejorar su estabilidad o para su conservación⁵⁶.



Otro método químico muy utilizado es el ahumado que se basa en el empleo de humo al que se exponen alimentos como pescados y jamón. Al utilizar el proceso el humo se agrega al producto esterilizándolo y agregando un color y sabor característicos. La temperatura de ahumado oscila entre los 45-70 °C y los tiempos son muy variados⁵⁶.

Además, la adicción de azúcares también se utiliza como método frecuente de conservación en frutas, ya sea para la elaboración de frutas en almíbar o en mermeladas. Por último, la fermentación es un proceso biológico muy utilizado en la industria alimentaria para alargar la vida útil de los productos y en la actualidad se consume una gran cantidad de alimentos fermentados, tales como yogur, diversos quesos, vinagre, vino, cerveza, sidra etc⁵⁶.

II.4.5. Conservación por otros métodos

Como se ha mencionado anteriormente, los métodos térmicos convencionales son muy utilizados pero pueden presentar ciertos inconvenientes, como son la pérdida de nutrientes y una considerable reducción de la calidad organoléptica en algunos alimentos⁵⁴. Por ello, en los últimos años se ha hecho un gran esfuerzo en el desarrollo de nuevas tecnologías de conservación basadas en nuevos principios, como son la irradiación o el plasma frío. Estas nuevas técnicas se engloban bajo el término de tecnologías emergentes de conservación de los alimentos, y su objetivo consiste en inactivar los microorganismos y/o enzimas presentes en los mismos sin alterar considerablemente sus características nutritivas, organolépticas y funcionales.

La irradiación se emplea para calentar rápidamente los productos alimentarios a base de ondas electromagnéticas que van de 3 kHz a 300 MHz y se ha utilizado con éxito para la inactivación de algunos patógenos presentes en alimentos, tales como *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Listeria* spp⁵⁷.

El plasma frío es un gas ionizado que se genera aplicando un campo eléctrico o electromagnético a un gas (generalmente aire, oxígeno, nitrógeno, argón o helio), lo que provoca que los electrones colisionen con las moléculas o átomos del gas produciéndose así la ionización. El plasma frío presenta la capacidad de inactivar una amplia gama de microorganismos como bacterias, mohos, levaduras, esporas e incluso algunos virus y su potencial depende de las condiciones de tratamiento y del tipo de gas utilizado para generar el plasma. Este tratamiento está siendo evaluado para conservar algunas frutas y vegetales como manzanas tomates, pepinos y zanahorias^{58,59}.



II.5. COMPORTAMIENTO REOLÓGICO DE PRODUCTOS ALIMENTARIOS

Los alimentos, además de presentar diferentes composiciones, muestran matrices estructurales muy variadas y complejas. La estructura es un parámetro fundamental que no solo tiene relación con la calidad del alimento desde un punto de vista organoléptico, sino que también determina el crecimiento microbiano. La estructura determina, por una parte, la capacidad de difusión de sustancias que actúan como sustratos o inhibidores del desarrollo de los microorganismos, y, por otra, el grado de confinamiento de la bacteria que afecta a su capacidad de multiplicarse. Por tanto, la estructura de un alimento resulta un parámetro clave a la hora de evaluar la seguridad de un determinado producto desde un punto de vista microbiológico. Una de las técnicas más empleadas para estudiar la estructura de diferentes materiales es la reometría. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en el sector alimentario, ya que conociendo las propiedades reológicas de un alimento se puede obtener mucha información acerca de su microestructura⁶⁰.

La reología tiene por objeto el análisis de los fenómenos de la deformación y el flujo de los materiales bajo la acción de fuerzas mecánicas. Se entiende por deformación al cambio de forma o de volumen que sufre un cuerpo bajo la acción de un sistema de fuerzas y por flujo a una deformación continua en el tiempo. Al aplicar fuerzas externas de intensidad suficiente se puede generar una deformación de la materia, realizándose un trabajo que se acumula en forma de energía interna de deformación. Se habla de comportamiento elástico cuando estas transformaciones son reversibles, el sistema recupera la forma original y la energía acumulada retorna en forma de trabajo. Otras veces, cuando la acción de dichas fuerzas cesa la materia sigue deformada permanentemente y el trabajo realizado se disipa completamente en forma de calor, se entiende entonces como comportamiento viscoso¹¹.

La mayoría de los alimentos, al tratarse de matrices complejas, presentan un comportamiento viscoelástico, es decir, una combinación de los dos anteriores⁶¹. Por lo tanto, para obtener en el ensayo un resultado fiable y reproducible se debe trabajar en la región lineal viscoelástica, donde el módulo complejo (G^*), que depende del módulo elástico (G') y del módulo viscoso (G''), es constante¹¹.

Se pueden distinguir ensayos reológicos oscilatorios o estacionarios. Para caracterizar alimentos viscoelásticos se usan los oscilatorios que se caracterizan porque en lugar de aplicar un esfuerzo o una velocidad de deformación constante, estos se



aplican sobre la muestra de manera oscilatoria y a una frecuencia determinada. Los resultados que aportan información relacionada con los módulos G' y G'' en función de la frecuencia aplicada, son sensibles a la estructura física y a la composición química del producto⁶².

Existen muchos tipos de ensayos oscilatorios, uno de los más empleados para analizar la estructura de los alimentos es el barrido de frecuencia. Este tipo de ensayo se realiza a una temperatura determinada y se aplica un esfuerzo constante que debe estar dentro de la región lineal viscoelástica. Para su realización se parte de un frecuencia inicial que va incrementando hasta llegar a un esfuerzo final¹¹.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Salvo que se indique lo contrario, todos los procedimientos descritos a continuación fueron llevados a cabo en condiciones de esterilidad. Se empleó una cabina de flujo laminar (Biobase BBS-DDC) para poder trabajar en condiciones estériles y un autoclave (Raypa AES-75) para esterilizar el material de trabajo que fue autoclavado a 121 °C durante 20 minutos (**Figura 6**).



Figura 6. Equipos utilizados para mantener condiciones de esterilidad. **A)** Cabina de flujo laminar (Biobase BBS-DDC). **B)** Autoclave (Raypa AES-75).

III.1. CEPA BACTERIANA UTILIZADA

Para estudiar el comportamiento de *Staphylococcus* spp. en diferentes matrices alimentarias se empleó como organismo modelo *S. warneri* ya que pertenece al grupo de “riesgo 1” (riesgo poblacional e individual escaso o nulo). Además, cabe destacar que *S. warneri* ha sido identificado en la microbiota del huevo^{63, 40} y también en otros productos alimentarios fermentados como salchichas, queso, salsa de soja, jamón y pescado^{64, 65}.

S. warneri se encuentra en el 50% de la población formando parte de flora natural de la piel, membranas mucosas, fosas nasales y boca de los seres vivos⁶⁶. Forma parte



de los SCN y representa menos del 1% de la población total de estafilococos de la piel. Aunque en general se considera una especie inofensiva, puede actuar como un patógeno oportunista llegando a causar graves infecciones en pacientes inmunocomprometidos, neonatos y personas con catéteres vasculares y otras prótesis internas^{67, 68, 69}.

Se empleó una cepa comercial de *S. warneri* (CECT 236) que fue suministrada liofilizada por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

III.2. ALIMENTOS MODELO EMPLEADOS

Como alimentos modelo para estudiar la viabilidad y el desarrollo de *S. warneri* en alimentos derivados del huevo se utilizaron mayonesa comercial estéril, y otros productos elaborados en el laboratorio: mayonesa “casera”, crema de tiramisú y crema de brazo de Fabiola.

III.2.1. Preparación del preinóculo

En todos los casos, para la preparación del preinóculo se inocularon dos colonias de *S. warneri* en 100 ml de medio líquido estéril Nutrient Broth (NB) (Biokar) en matraces Erlenmeyer de 500 ml, manteniendo una relación medio:volumen de 1:5. Se incubaron los matraces a 250 rpm y 37 °C en un agitador durante 24 horas. Pasadas las 24 horas se centrifugaron 2 ml del preinóculo a 13000 rpm durante 5 minutos, después se resuspendió el pellet en 1 ml de NaCl 0,7% estéril y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones para evitar añadir medio de cultivo al alimento modelo¹¹.

III.2.2. Preparación de las salsas modelo

Como ya se ha mencionado, las salsas modelo empleadas fueron mayonesa comercial estéril y mayonesa elaborada en el laboratorio de manera “casera”.

❖ Mayonesa comercial

Se utilizó mayonesa comercial (Calvé) cuyos ingredientes son: agua, aceite de soja (40%), vinagre de vino blanco (5%), yema de huevo de gallinas camperas (3,2%), almidón modificado de maíz, almidón de trigo, azúcar, sal, cloruro potásico, espesantes (goma garrofín, goma guar), aromas (contiene mostaza), zumo de limón concentrado y colorantes (carotenos). Se tomaron 50 g de mayonesa en condiciones estériles, se les



añadió el preinóculo y se homogenizó la mezcla con un Stomacher (LabSystem 80 BIOMASTER) durante 2 minutos (**Figura 7**).

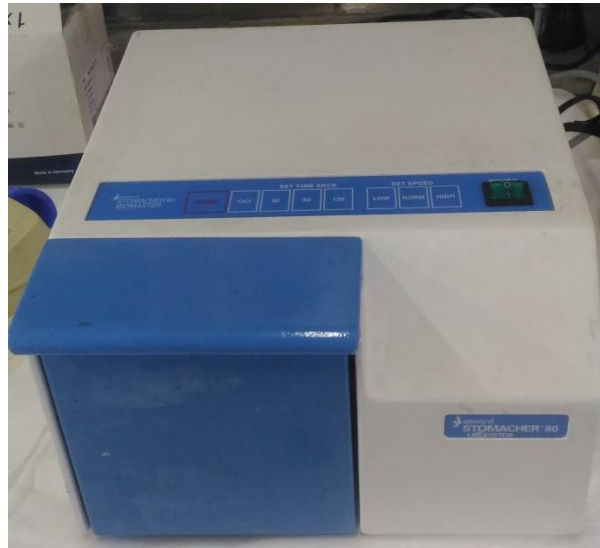


Figura 7. Stomacher (LabSystem 80 BIOMASTER).

Esta mezcla se utilizó para llenar 8 ml aproximadamente en jeringas de 10-12 ml (**Figura 8**). La parte superior de las jeringas fue tapada con algodón y papel de aluminio (simulando un ambiente aerobio en la superficie de la mayonesa) y la parte inferior se cubrió con papel de aluminio y parafilm (para simular un ambiente anaerobio en el interior de la mayonesa).

En este caso al tratarse de mayonesa comercial estéril no fue necesario hacer un control de mayonesa sin preinóculo.



Figura 8. Jeringas llenas con el alimento modelo (mayonesa comercial).



❖ **Mayonesa “casera”**

Para la preparación de mayonesa “casera” se tomaron 9 ml de vinagre, 0,94 g de sal, 70 ml de aceite y 10 g de yema de huevo⁷⁰. Inicialmente se mezclaron la sal, la yema y el vinagre y se batieron con una batidora mientras se añadía el aceite poco a poco sin dejar de batir.

Aunque se trató de mantener las mejores condiciones de esterilidad posibles durante la preparación del alimento modelo, al ser preparado de modo “casero” puede aparecer flora acompañante además del microorganismo inoculado (*S. warneri*). Es por esto que para el análisis de alimentos elaborados en el laboratorio se preparó también un control con el producto sin inocular *S. warneri*.

La inoculación de la bacteria se realizó en las mismas condiciones que las empleadas en el caso de la mayonesa comercial.

III.2.3. Preparación de las cremas de repostería modelo

Los rellenos de repostería modelo que se utilizaron fueron la crema de tiramisú y la crema de brazo de Fabiola.

❖ **Crema de tiramisú**

Para la preparación de la crema de tiramisú se tomaron 100 g de azúcar, 400 g de queso mascarpone, 80 g de yema de huevo y 60 g de clara⁷¹. El proceso de elaboración que se siguió es el siguiente: primero se separaron las yemas de las claras y en un recipiente se montaron las claras a punto de nieve. En otro recipiente batieron las yemas junto con el azúcar y el preinóculo. Finalmente se juntaron ambas mezclas batiendo muy lentamente para evitar que se bajen las claras.

❖ **Crema de brazo de Fabiola**

Para elaborar este producto se utilizaron 100 g de azúcar, 20 g de yema de huevo y 250 g de margarina⁷². Se mezclaron todos los ingredientes en un recipiente y se batieron hasta tener una mezcla homogénea.

La inoculación, en ambas cremas, se realizó en las mismas condiciones que la mayonesa, preparando jeringas para simular el alimento modelo. Dado que los



productos fueron elaborados en el laboratorio, también fue necesaria la preparación de un control sin inóculo.

III.2.4. Toma de muestras

En todos los casos, las jeringas se incubaron a 30 °C y se tomaron muestras a las 24, 48, 72 y 144 horas. En el caso de la crema de brazo de Fabiola también se incubaron a 20 y 6 °C.

Para el análisis de crecimiento microbiano, en todos los casos, se pesó 1 g de muestra de la parte superior, media e inferior de cada jeringa, se diluyó en 9 ml de NaCl al 0,7% y se hicieron siembras de diluciones seriadas en placa en medio NB. Las siembras en placa fueron realizadas por duplicado y la toma de muestras se llevó a cabo por triplicado, es decir, a cada tiempo se tomaron 3 jeringas de cada vez.

III.3. ANÁLISIS REOLÓGICO

Para la realización de los ensayos reológicos se utilizó un reómetro rotacional (ThermoFisher HAAKE MARS II) con un sistema Peltier de control de la temperatura y un sensor placa-placa (PP60-Ti) (Figura 9).

Se analizaron las diferentes salsas y rellenos de repostería descritos en los apartados III.2.2. y III.2.3. a una temperatura de análisis de 30 °C (en el caso de la crema de brazo de Fabiola también se analizó a 6, 15, 20 y 25 °C). La ranura empleada entre placas fue de 1,000 mm y antes del ensayo se dejó la muestra una vez colocada en las placas durante 10 minutos para eliminar así las tensiones generadas durante su colocación. Todos los ensayos se realizaron, al menos, por triplicado.

El tipo de ensayo reológico utilizado fue el de barrido de frecuencia, en el que se aplica un esfuerzo constante que debe estar dentro de la región lineal viscoelástica, en este caso 5 Pa, y se utilizó una rampa de frecuencia de 0,1 a 10 Hz.

Los datos obtenidos en el barrido de frecuencia permiten calcular diferentes parámetros de interés relacionados con la estructura de los alimentos. Por un lado, el número de coordinación (z) que refleja las unidades reológicas que están relacionadas con otras en la red tridimensional y por otro lado el coeficiente de proporcionalidad (A) que indica la fuerza de interacción entre dichas unidades reológicas. Los dos parámetros



están relacionados según la ecuación $G^* = A \times \nu^{\frac{1}{z}}$, donde ν es la frecuencia medida en Hz y G^* el módulo complejo medido en Pa^{11,73}.

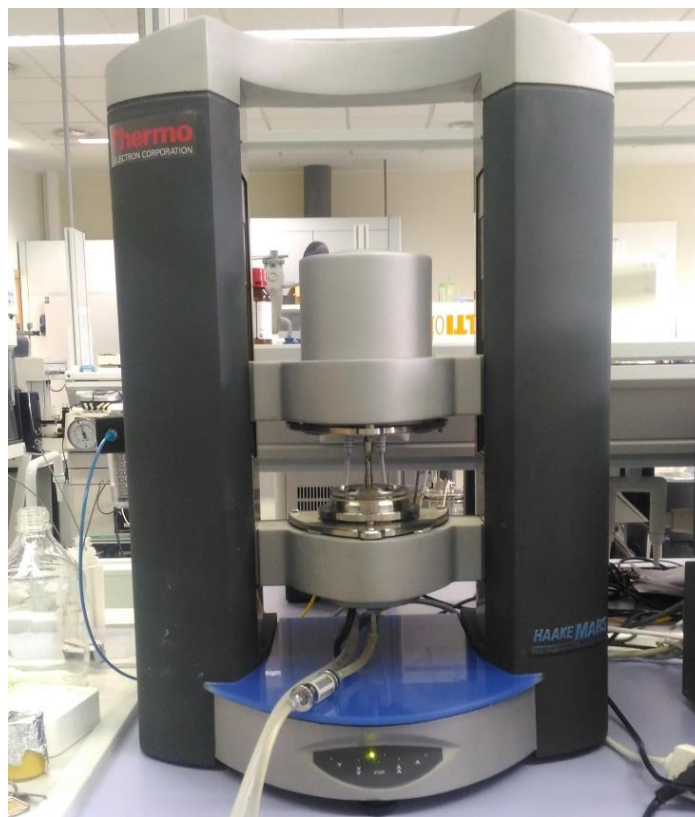


Figura 9. Reómetro rotacional (ThermoFisher HAARKE MARS II).

III.4. ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Para caracterizar la morfología del microorganismo modelo *S. warneri*, así como del resto de microorganismos presentes en los alimentos modelo descritos en los apartados III.2.2. y III.2.3. se realizaron observaciones al microscopio óptico automático (Olympus BX61) (Figura 10). Se realizaron observaciones en fresco y observaciones con muestras teñidas mediante una tinción Gram.

La tinción Gram es una tinción diferencial que clasifica a las bacterias en dos grupos: grampositivas (se tiñen de rojo/rosa) y gramnegativas (se tiñen de azul/violeta)⁷⁴. El protocolo que se llevó a cabo es el siguiente: en primer lugar, se realizó un frotis de los microorganismos a estudiar y se fijó la muestra con calor. Se añadió azul violeta, se esperó un minuto y se lavó con agua destilada. Después, se agregó lugol, se esperó un minuto. A continuación, se añadió alcohol, se esperaron 30 segundos y se lavó la muestra con alcohol. Por último se agregó safranina, se esperó otro minuto y se lavó levemente la muestra con agua destilada.



Figura 10. Microscopio óptico automático (Olympus BX61).

III.6. MEDIDA DEL pH

Para medir el pH, implicado en la viabilidad de *S. warneri*³⁸, de los diferentes alimentos modelos descritos en los apartados III.2.2. y III.2.3. se empleó un pH-metro (Crison BASIC 20) (Figura 11).



Figura 11. pH-metro (Crison BASIC 20).



IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. ESTRUCTURA DE LAS MATRICES ALIMENTARIAS

Con todas las matrices alimentarias empleadas se realizaron los ensayos reológicos explicados en el apartado III.3 y se calcularon los parámetros A y z . Los valores de R^2 (Tabla 3) indican un buen ajuste para la ecuación $G^* = A \cdot v^{(1/z)73}$ para todos los casos con valores superiores a 0,9, excepto para la muestra correspondiente al brazo de Fabiola a 6°C.

Tabla 3. Parámetros A y z obtenidos para los diferentes alimentos modelo a partir de los barridos de frecuencia realizados.

	T^a (°C)	A (kPa)	Z	R^2
Mayonesa comercial	30	$0,94 \pm 0,04$	$14,79 \pm 0,55$	$0,9977 \pm 0,0006$
Mayonesa “casera”	30	$1,01 \pm 0,12$	$12,68 \pm 0,74$	$0,9890 \pm 0,0050$
Crema de tiramisú	30	$79,54 \pm 24,36$	$21,91 \pm 10,73$	$0,9395 \pm 0,0488$
Crema de brazo de Fabiola	30	$3,94 \pm 2,39$	$10,53 \pm 1,05$	$0,9880 \pm 0,0040$
	25	$4,71 \pm 0,36$	$10,80 \pm 2,41$	$0,9955 \pm 0,0049$
	20	$6,63 \pm 1,28$	$10,22 \pm 0,49$	$0,9880 \pm 0,0040$
	15	$18,41 \pm 4,47$	$13,60 \pm 1,56$	$0,9075 \pm 0,0460$
	6	$96,76 \pm 65,29$	$14,29 \pm 3,76$	$0,7930 \pm 0,0339$

En trabajos previos se han obtenido los parámetros A y z para muestras de distintos alimentos que contienen huevo, en concreto muestras de pudín⁷⁵ y muestras de tortilla de patata simulada¹¹. En el primer trabajo se obtuvieron valores para z a 30 °C en torno a 2,5, mientras que en el segundo los valores obtenidos fueron próximos a 12, valores que se encuentran en el mismo orden de magnitud que los mostrados en la **Tabla 3** (10-22). Esto parece indicar que el número de uniones que se generan en las muestras está determinado por la naturaleza proteica de dichas muestras y, tanto en los trabajos citados, como en las matrices alimentarias analizadas aquí, la yema resulta un ingrediente fundamental. Es destacable que en el caso del tiramisú se obtuvo el valor más alto para el parámetro z (22), lo que puede ser debido a que en este caso además de utilizar como ingrediente la yema y la clara de huevo, se utilizó también queso, de manera que las proteínas lácteas parecen interaccionar con las proteínas del huevo



incrementando el número de uniones en la red tridimensional de esta matriz alimentaria. Por el contrario, para el parámetro A los resultados obtenidos mostraron mayor variación. Así, mientras que en el caso del pudín se obtuvieron valores entre 0,02 y 15 kPa y para las muestras de tortilla de patata se alcanzaron valores entre 4,5 y 8,3 kPa, en el caso de las salsas y cremas aquí analizadas el valor de A osciló entre 0,9 y 97 kPa. Para comprender estas diferencias, hay que tener en cuenta que las muestras de salsa y rellenos de repostería no están cocidas y que, además del huevo, contienen otros ingredientes que les aportan un comportamiento reológico distinto. Nuevamente, la muestra de relleno tiramisú fue la que mostró un valor más alto (97 kPa), lo que parece indicar un cierto efecto sinérgico de las proteínas lácteas y las proteínas del huevo que hace que las uniones sean más fuertes que en el resto de matrices alimentarias analizadas.

Para una misma temperatura de 30 °C (**Tabla 3**) se obtuvieron valores similares de A y z para la mayonesa comercial y la mayonesa “casera” ya que la composición de ambos alimentos modelo es muy similar, siendo el ingrediente clave la yema de huevo. En el caso del brazo de Fabiola se obtuvo un valor de ambos parámetros ligeramente distinto al de las mayonesas, aunque del mismo orden, ya que tanto el brazo de Fabiola como las mayonesas, además de yema, tienen entre sus ingredientes una gran proporción de grasa vegetal. Por el contrario y, tal y como ya ha sido comentado, el tiramisú presentó los valores más elevados para ambos parámetros, debido a la presencia de proteínas del queso. Debe destacarse que, en el caso del brazo de Fabiola, al ir disminuyendo la temperatura de análisis, los valores de ambos parámetros van incrementándose, lo que indica que a menores temperaturas existe un mayor número de uniones y estas son cada vez más fuertes en la matriz alimentaria, siendo el caso más acusado para la temperatura más baja ensayada (6 °C).

Por último, los resultados de los barridos de frecuencia que se muestran en las **Figuras 12-19**, donde se representan los módulos G' y G'' frente al esfuerzo, indican que, en el rango de frecuencias estudiado, todas las matrices alimentarias presentaron un carácter predominantemente elástico (en todos los casos G' es mayor que G''). A su vez, en todos los casos analizados, a 30 °C, ambos módulos se incrementan ligeramente al ir incrementándose la frecuencia. En el caso de las mayonesas, comercial y “casera”, el comportamiento fue muy similar, así como los valores obtenidos para los módulos elástico y viscoso. Es destacable que, en el caso del tiramisú los valores de G' y G'' fueron aproximadamente 100 veces más altos que en el caso de las mayonesas, mientras



que el brazo de Fabiola mostró unos valores intermedios. Por último, debe señalarse que la temperatura produce un cambio notable en el comportamiento del módulo viscoso, mientras que a 30 y 25 °C este módulo se incrementa con la frecuencia, a 20 y 15 °C el valor de G'' se mantiene más o menos constante con la frecuencia y a 6 °C puede apreciarse que tiende a disminuir con la frecuencia.

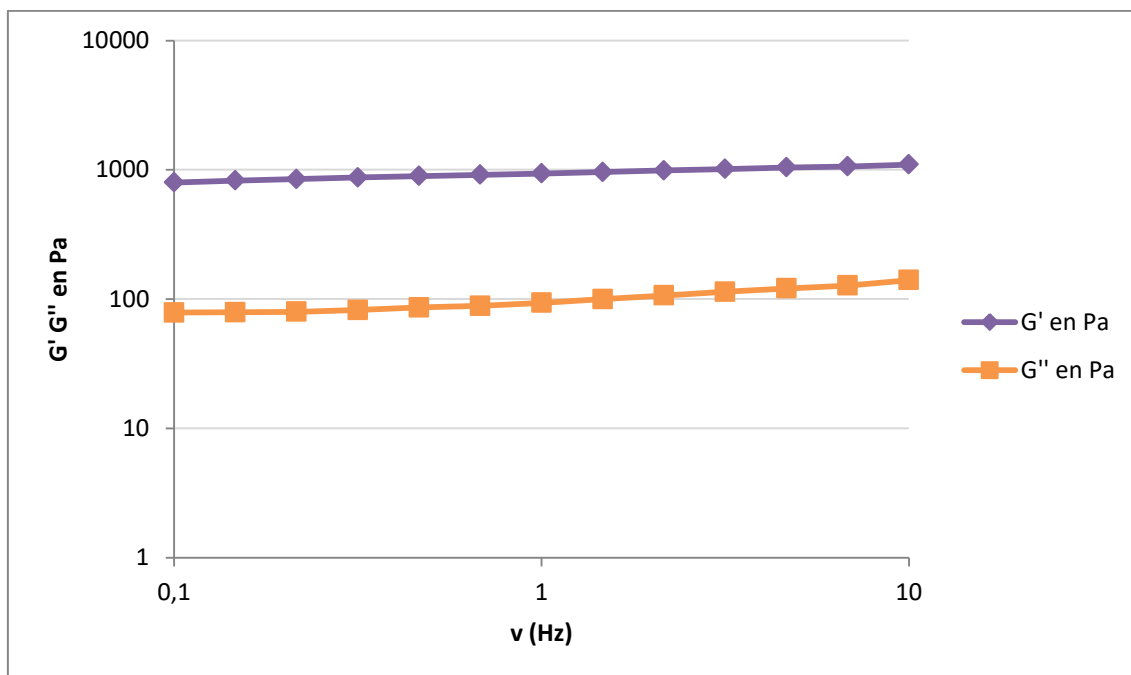


Figura 12. Barrido de frecuencia de mayonesa comercial a 30 °C. Los datos mostrados son los valores medios del ensayo realizado al menos por duplicado.

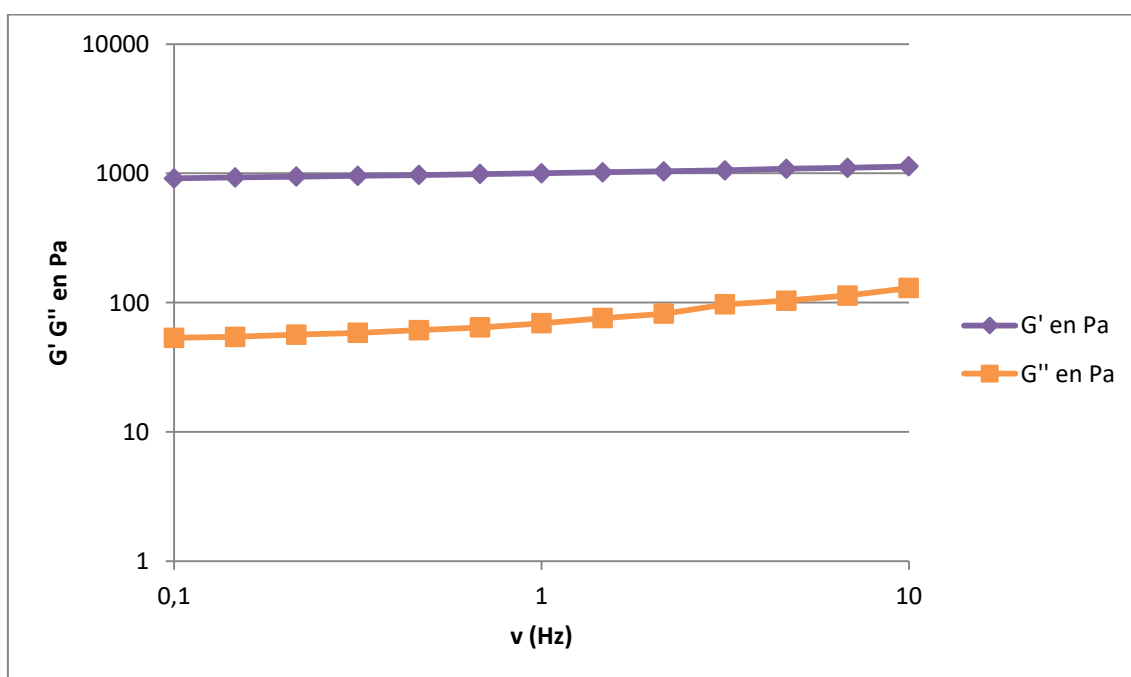


Figura 13. Barrido de frecuencia de mayonesa "casera" a 30 °C. Los datos mostrados son los valores medios del ensayo realizado al menos por duplicado.

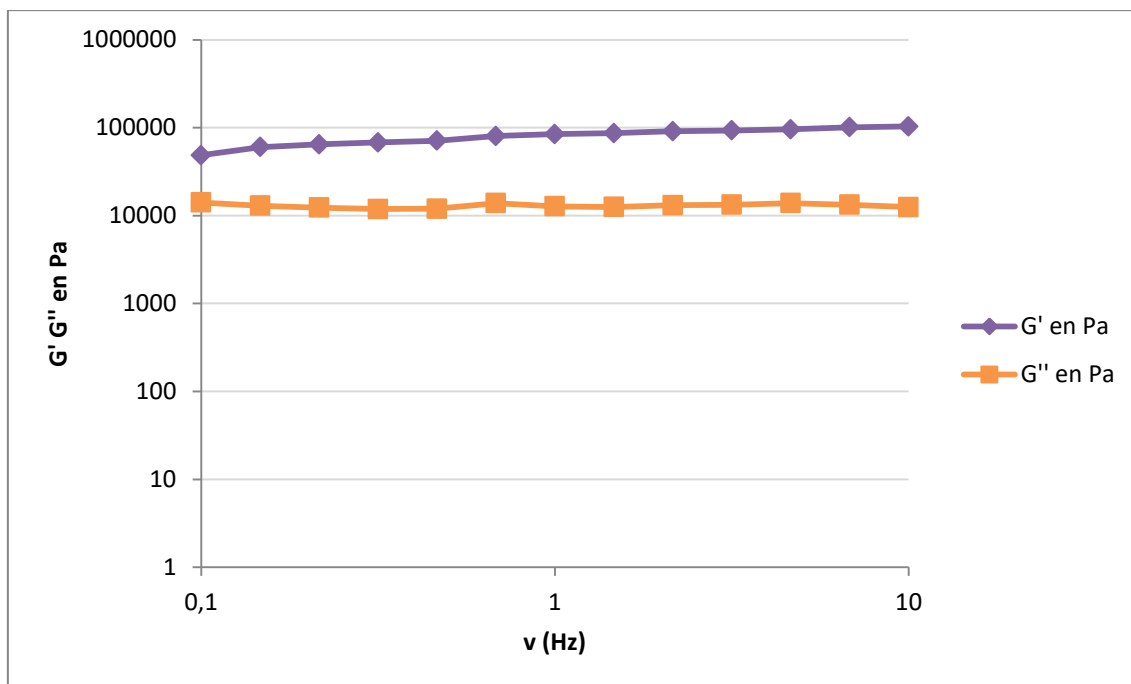


Figura 14. Barrido de frecuencia de crema de tiramisú a 30 °C. Los datos mostrados son los valores medios del ensayo realizado al menos por duplicado.

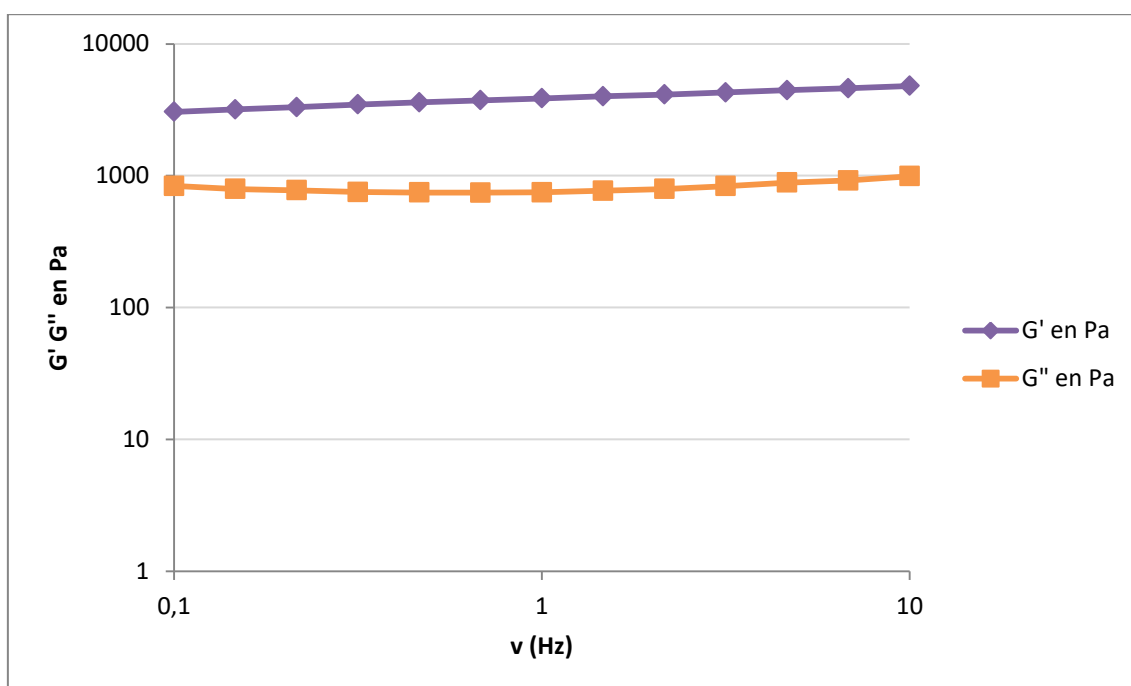


Figura 15. Barrido de frecuencia de crema de brazo de Fabiola a 30 °C. Los datos mostrados son los valores medios del ensayo realizado al menos por duplicado.

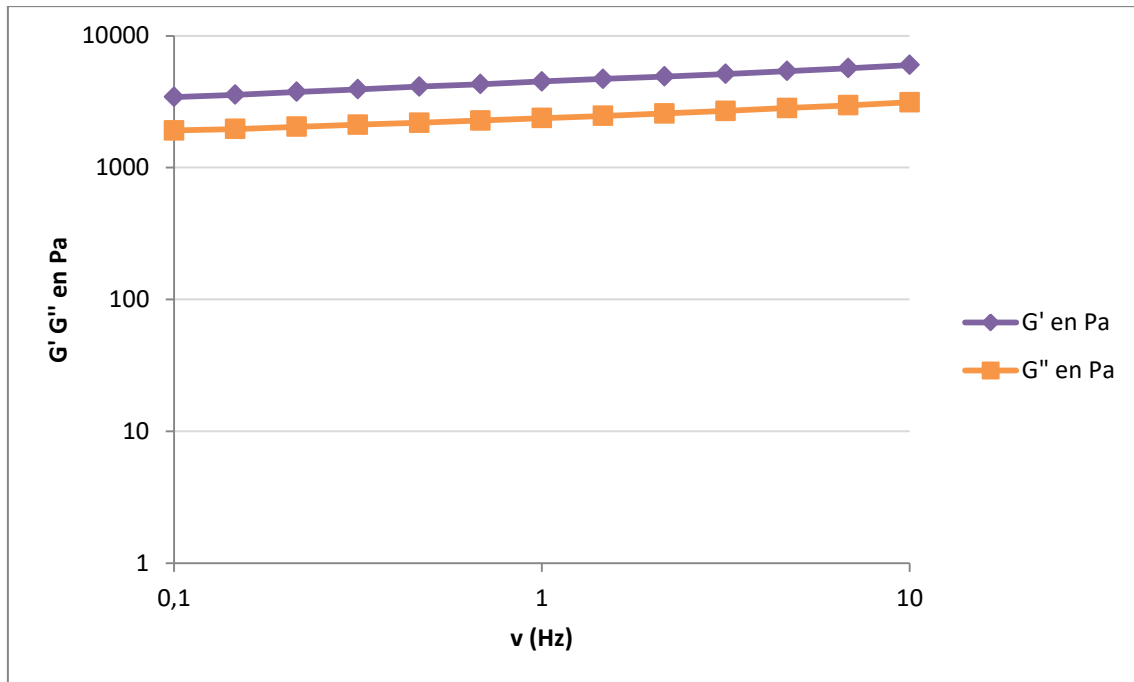


Figura 16. Barrido de frecuencia de crema de brazo de Fabiola a 25 °C. Los datos mostrados son los valores medios del ensayo realizado al menos por duplicado.

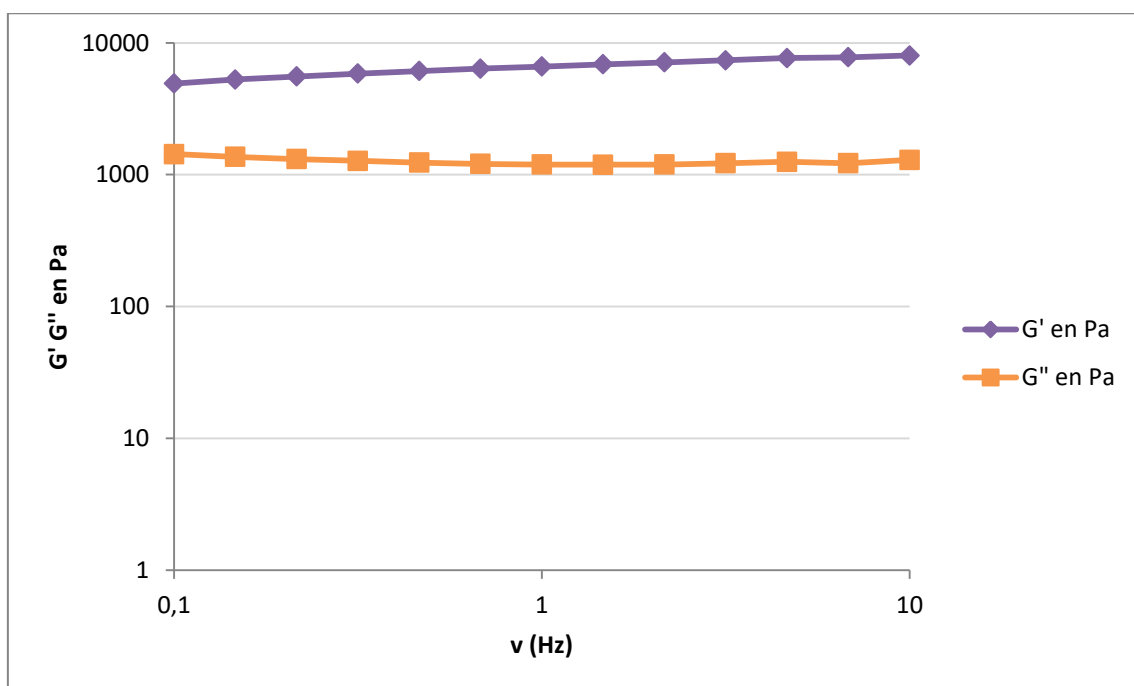


Figura 17. Barrido de frecuencia de crema de brazo de Fabiola a 20 °C. Los datos mostrados son los valores medios del ensayo realizado al menos por duplicado.

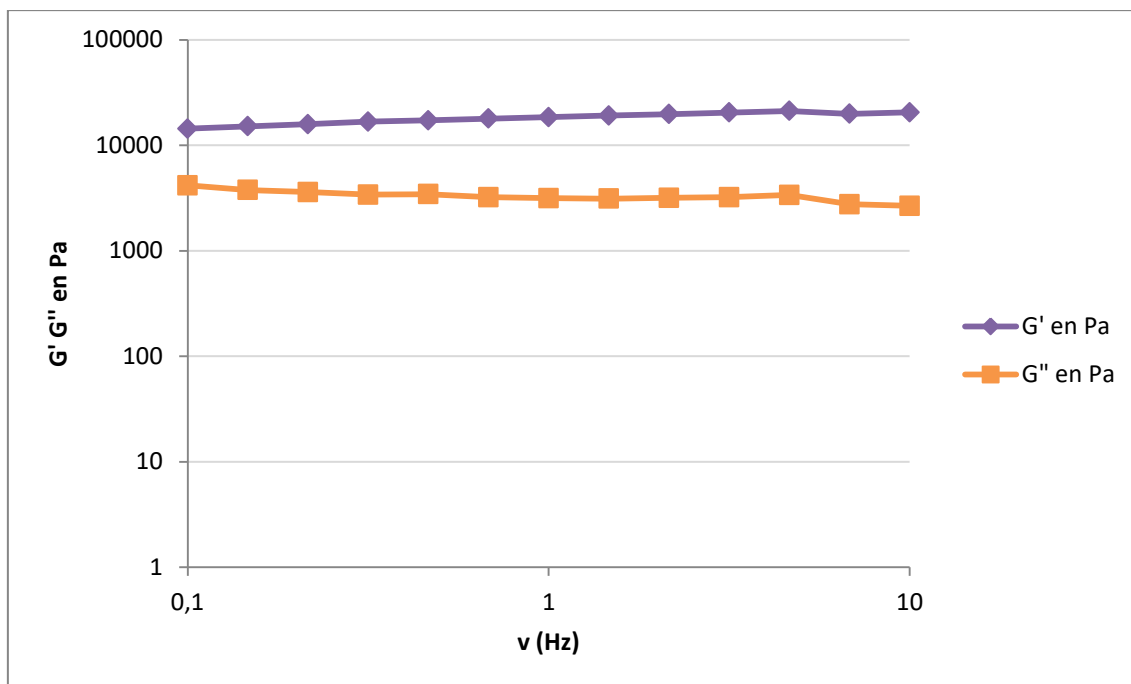


Figura 18. Barrido de frecuencia de crema de brazo de Fabiola a 15 °C. Los datos mostrados son los valores medios del ensayo realizado al menos por duplicado.

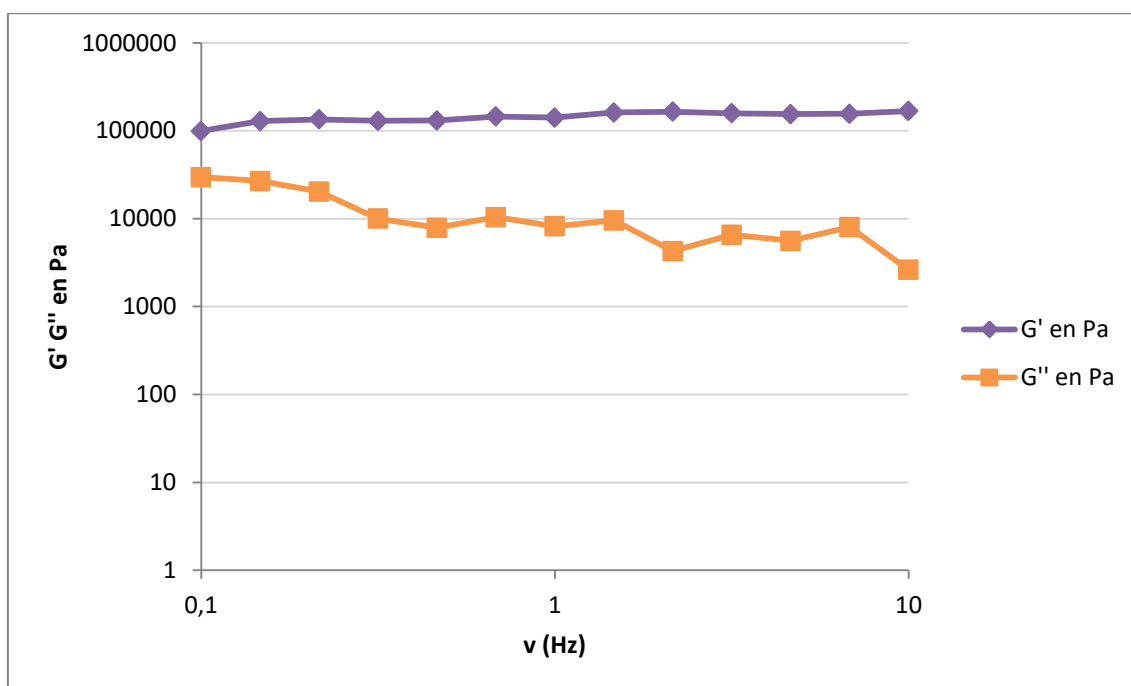


Figura 19. Barrido de frecuencia de crema de brazo de Fabiola a 6 °C. Los datos mostrados son los valores medios del ensayo realizado al menos por duplicado.



IV.2. VIABILIDAD Y DESARROLLO DE *STAPHYLOCOCCUS*

Para estudiar la viabilidad y el desarrollo de *Staphylococcus* los distintos alimentos modelo se estudió el efecto de la composición, de la temperatura y de la estructura.

IV.2.1. Efecto de la composición

IV.2.1.1 Salsas modelo

Como ya se ha descrito, las salsas modelo empleadas fueron mayonesa comercial estéril y mayonesa elaborada en el laboratorio de manera “casera”.

❖ **Mayonesa comercial**

Con el fin de estudiar el comportamiento de *S. warneri* en el alimento modelo se incubaron las jeringas a 30 °C (simulando así el mantenimiento del producto a temperatura ambiente en clima cálido) y la toma de muestras se llevó a cabo tal como se explica en el apartado III.2.4.

Los resultados muestran en la **Figura 20** que partiendo de una concentración inicial de $1,7 \times 10^8$ UFC/g, en la zona superior de la muestra el número de bacterias viables fue reduciéndose alcanzando valores de 10^6 UFC/g a las 24 horas, 10^4 UFC/g a las 48 horas y a partir de las 72 horas ya no se observaron células viables. El comportamiento fue similar en las zonas media e inferior, aunque la concentración de células viables disminuyó más rápidamente, alcanzando valores de 10^4 UFC/g a las 24 horas y a partir de las 48 horas ya no se observaron células viables. Esto se debe a la menor disponibilidad de oxígeno en las partes media e inferior, lo que aceleró la muerte de las bacterias.

La mayonesa comercial presenta vinagre entre sus ingredientes lo que proporciona al producto un pH de 3,53. El pH óptimo de crecimiento de *S. warneri* es de 4,7-5³⁸ y el bajo pH del producto parece inhibir el crecimiento y provocar la muerte celular.

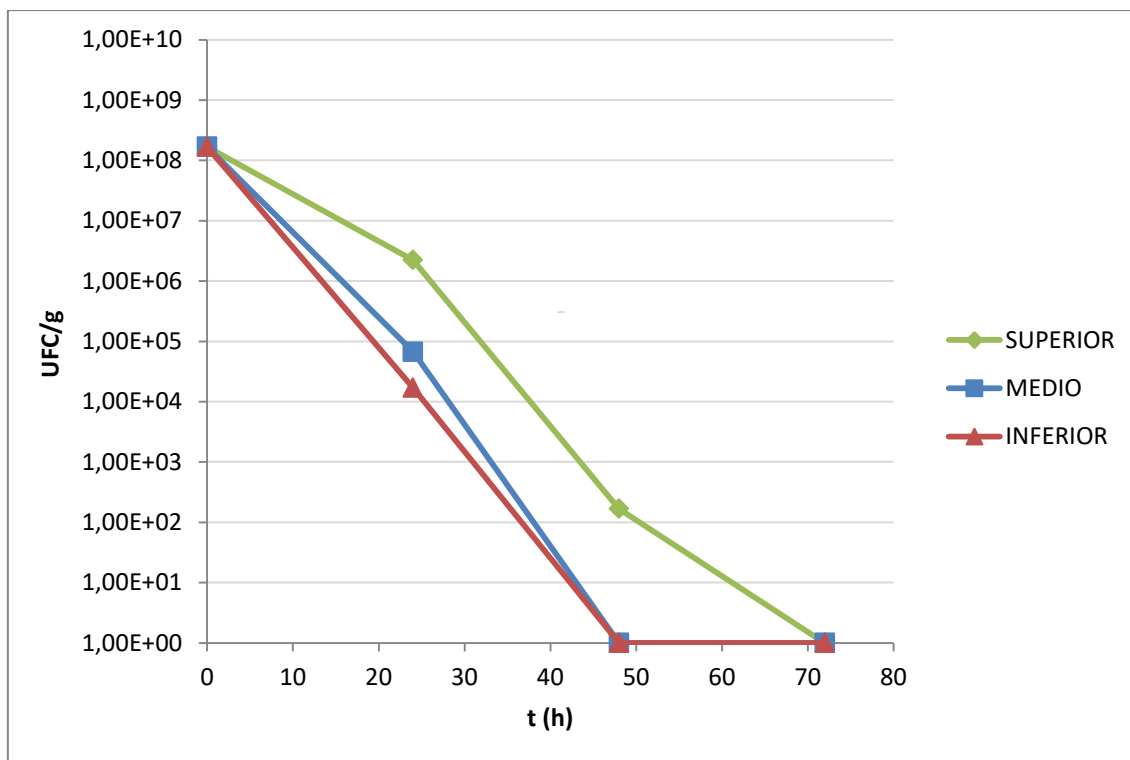


Figura 20. Comportamiento de *S. warneri* en mayonesa comercial incubada a 30 °C. Coeficiente de variación < 5%. Los datos corresponden con la media de las muestras tomadas por triplicado.

❖ Mayonesa “casera”

En el caso de los alimentos preparados en el laboratorio de manera “casera”, aunque se trató de mantener las mejores condiciones de esterilidad posibles, además del estudio del producto inoculado con *S. warneri* (Figura 21), fue necesario analizar el producto sin inóculo para determinar la posible presencia de flora acompañante (Figura 22).

La Figura 21 muestra que, partiendo de una concentración inicial de inóculo de 4×10^8 UFC/g, en la parte superior tuvo lugar un decrecimiento a las 24 horas hasta 10^6 UFC/g y en las partes media e inferior hasta 10^5 UFC/g. En las tres zonas estudiadas, a partir de las 48 horas dejaron de observarse colonias de *S. warneri* y solo sobrevivió la flora acompañante coincidiendo con la gráfica control (Figura 22). De nuevo, la muerte celular parece ser debida, al igual que en la mayonesa comercial, al bajo pH del producto (3,68), muy inferior al pH óptimo de crecimiento de *S. warneri*³⁸.

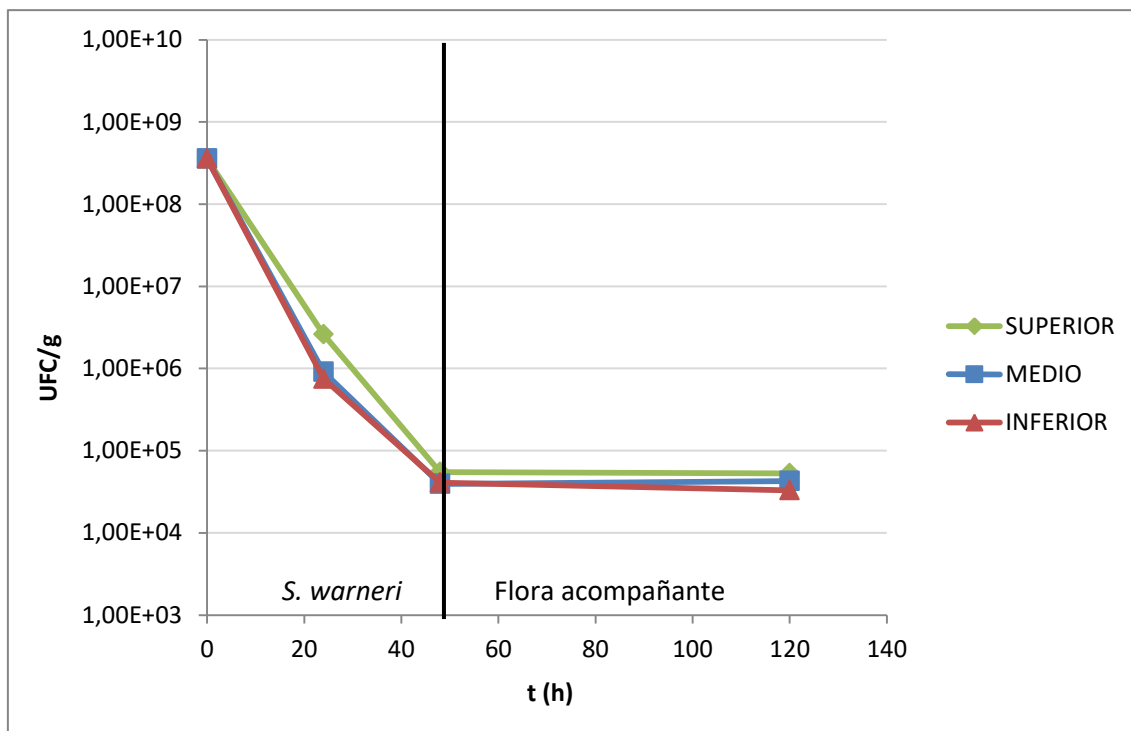


Figura 21. Comportamiento de *S. warneri* en mayonesa “casera” incubada a 30 °C. Coeficiente de variación < 5%. La línea vertical indica que a partir de las 48 horas dejan de verse células viables de *S. warneri* y solo sobrevive la flora acompañante. Los datos corresponden con la media de las muestras tomadas por triplicado.

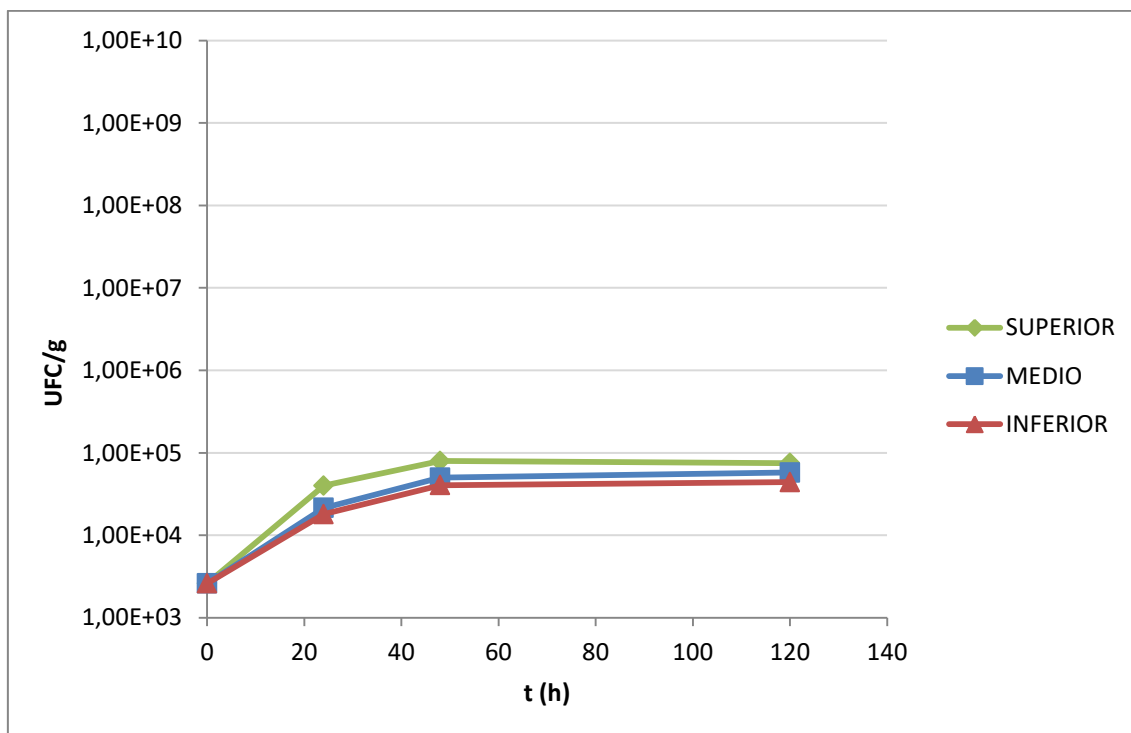


Figura 22. Comportamiento de la flora acompañante (control) en mayonesa “casera” sin inocular e incubada a 30 °C. Coeficiente de variación < 5%. Los datos corresponden con la media de las muestras tomadas por triplicado.

En la **Figura 23** se muestran las colonias típicas de *S. warneri*, colonias redondeadas de color blanco-amarillento en las placas de medio NB. En la tinción de Gram, *S. warneri* aparece como cocos grampositivos (se tiñen de azul/violeta) formando células esféricas en tétradas y racimos⁷⁶

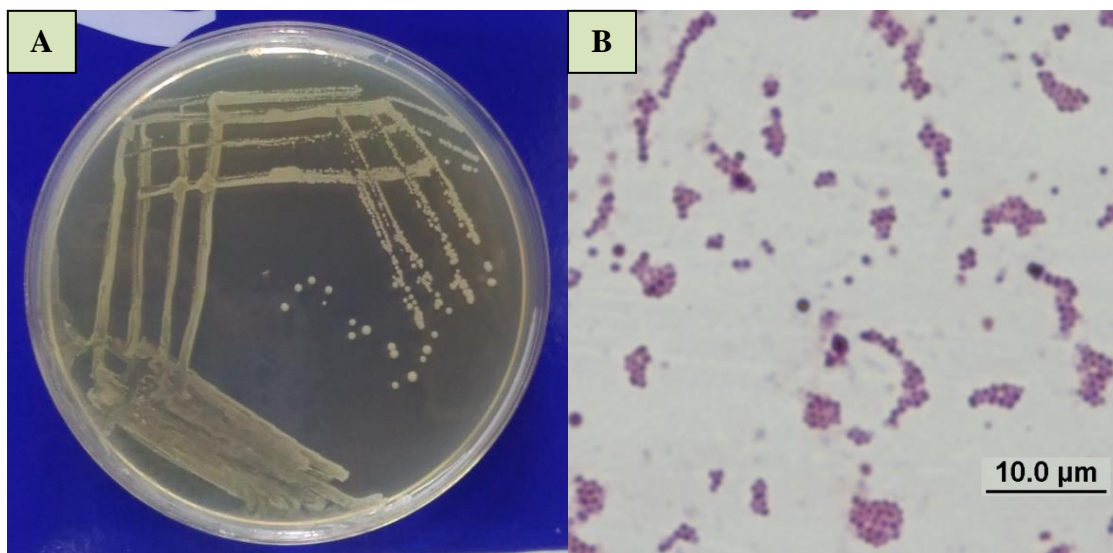


Figura 23. Observación de la morfología de *S. warneri*. **A)** Visualización en placa en medio NB. **B)** Visualización mediante microscopía óptica con tinción Gram.

En la **Figura 24** se observa la morfología en placa de diferentes microorganismos encontrados en la flora acompañante de la mayonesa “casera”. El microorganismo que aparece con mayor frecuencia fue observado en fresco al microscopio óptico (**Figura 24B**) y por su morfología y tamaño parece tratarse de alguna especie de levadura. Existen estudios que identifican la presencia de levaduras entre la microbiota natural del huevo^{46,63}. Además se realizó un cultivo en placa NB (**Figura 25**) de una muestra de la microbiota presente en la cáscara de los huevos empleados para la preparación de los alimentos modelos y se observó la aparición de una gran cantidad microorganismos entre los que se observan algunos de morfología similar a la flora acompañante. Sin embargo, también pueden identificarse en la **Figura 25** otras colonias más pequeñas con diversas tonalidades que no se identificaron en ninguno de los alimentos modelo ensayados.

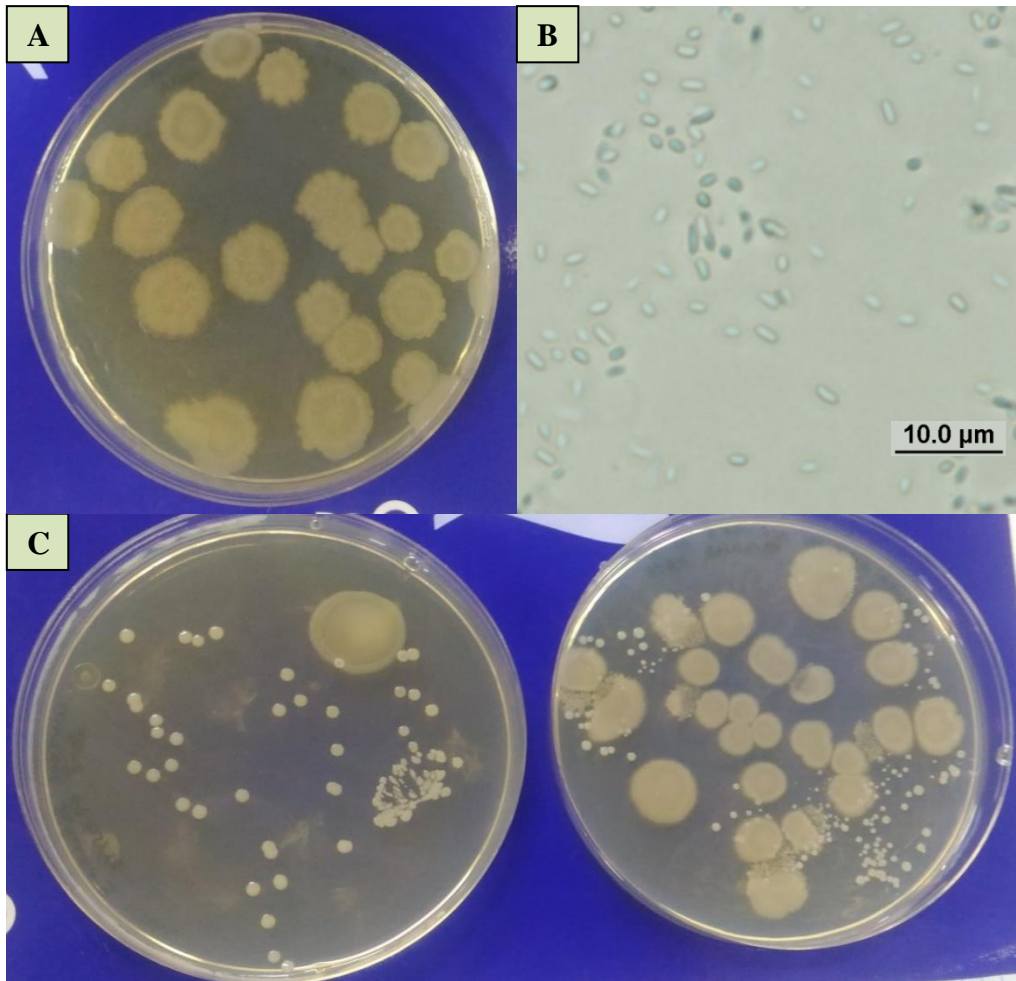


Figura 24. Observación de la morfología de la flora acompañante en muestras de mayonesa “casera”. **A)** Visualización en placa en medio NB. **B)** Visualización mediante microscópica óptica en fresco. **C)** Visualización de la flora acompañante junto a *S. warneri* en placa en medio NB.

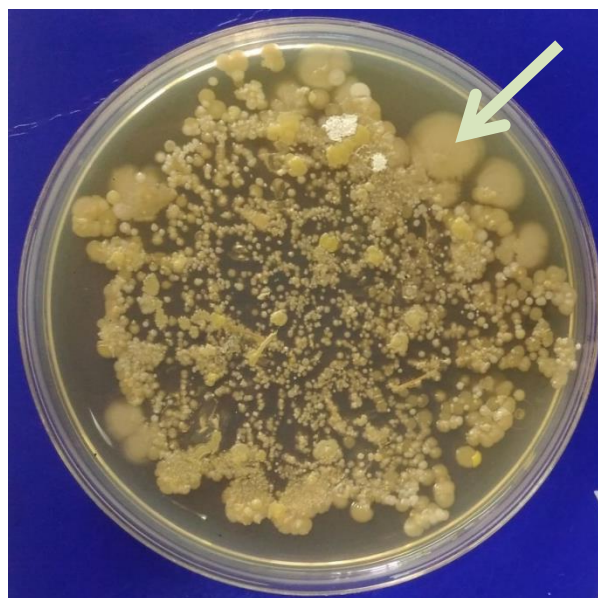


Figura 25. Cultivo de la microbiota presente en cáscara de huevo en placa en medio NB.



IV.2.1.2. Rellenos de repostería modelo

Los rellenos de repostería modelo que se utilizaron, ya mencionados, fueron la crema de tiramisú y la crema de brazo de Fabiola.

❖ Crema de tiramisú

En el caso de la crema de tiramisú para el estudio del desarrollo de *Staphylococcus* solo se analizó la parte superior de las jeringas (zona aerobia) porque se observó la aparición de un nuevo tipo de bacterias, probablemente BAL procedentes del queso mascarpone empleado como ingrediente en la elaboración de este relleno⁷⁷, con morfología en coco similar a la de *S. warneri* lo que dificultó el conteo en placa del microorganismo modelo (Figura 27A).

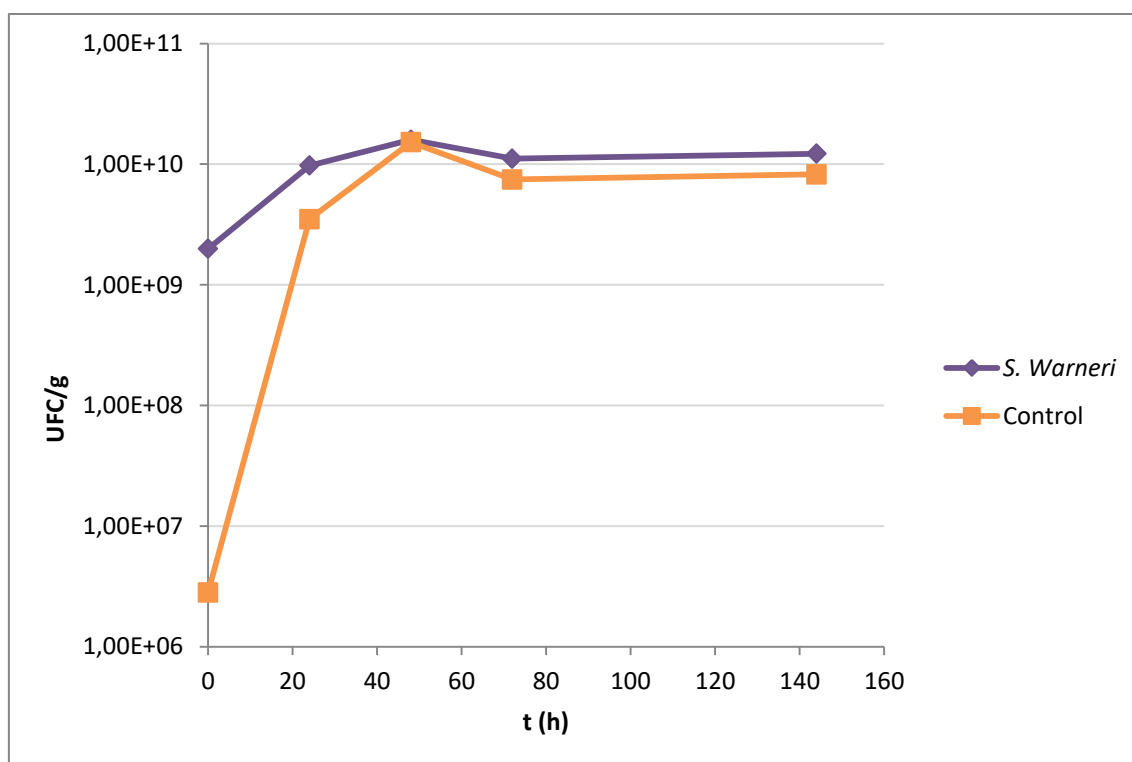


Figura 26. Crecimiento de *S. warneri* y flora acompañante en la zona superior de las jeringas rellenas con crema de tiramisú incubada a 30 °C. Coeficiente de variación <5%. Los datos corresponden con la media de las muestras tomadas por triplicado.

Los resultados se muestran en la Figura 26, inicialmente se observó una concentración muy superior de *S. warneri* (2×10^9 UFC/g) frente a concentración de las BAL ($2,8 \times 10^6$ UFC/g), pero a partir de las 24 horas las concentraciones de ambas



especies se van igualando hasta que a las 72 horas se estabilizan en torno a 1×10^{10} UFC/g y son difícilmente diferenciables.

En este caso el pH del producto es de 6,1, más adecuado para el microorganismo modelo, lo que junto al elevado contenido de azúcar que posee la crema de tiramisú entre sus ingredientes, favorece enormemente el crecimiento tanto de *S. warneri* como de las BAL.

La **Figura 27B** corresponde con la observación al microscopio óptico de las BAL, como ya se comentado, poseen una morfología en coco similar a la de *S. warneri*, lo que dificultaba el conteo en placa del microorganismo modelo e hizo en imposible su diferenciación en las últimas muestras.

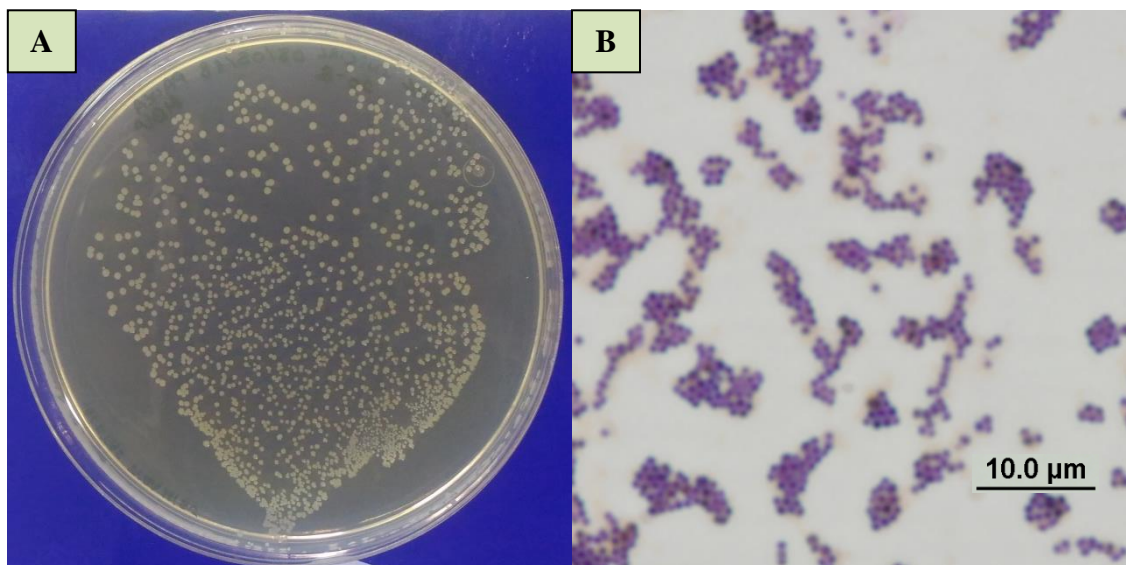


Figura 27. Observación de la morfología de la flora acompañante en muestras de crema de tiramisú. **A)** Visualización en placa en medio de cultivo NB. **B)** Visualización mediante microscopía óptica con tinción Gram.

❖ Crema de brazo de Fabiola

Para estudiar el efecto de la composición de la crema de brazo de Fabiola en el desarrollo de *Staphylococcus* se realizó un primer experimento a 30 °C. Los resultados representados en la **Figura 28** muestran que en la zona superior de las jeringas (zona aerobia) se obtuvo un ligero crecimiento a las 24 horas hasta $9,3 \times 10^9$ UFC/g estabilizándose después en torno a 8×10^9 UFC/g. Mientras que en las zonas media e inferior de las jeringas se observó una disminución de carga celular entorno a 4×10^8 UFC/g que se mantuvo estable a lo largo del tiempo. Los valores obtenidos son próximos a los alcanzados cuando se partió de un inóculo menor (**Figura 30**). En este

caso el crecimiento de la flora acompañante control (**Figura 34**) fue poco significativo al obtenerse concentraciones muy inferiores (en torno a 10^2) a las de *S. warneri*.

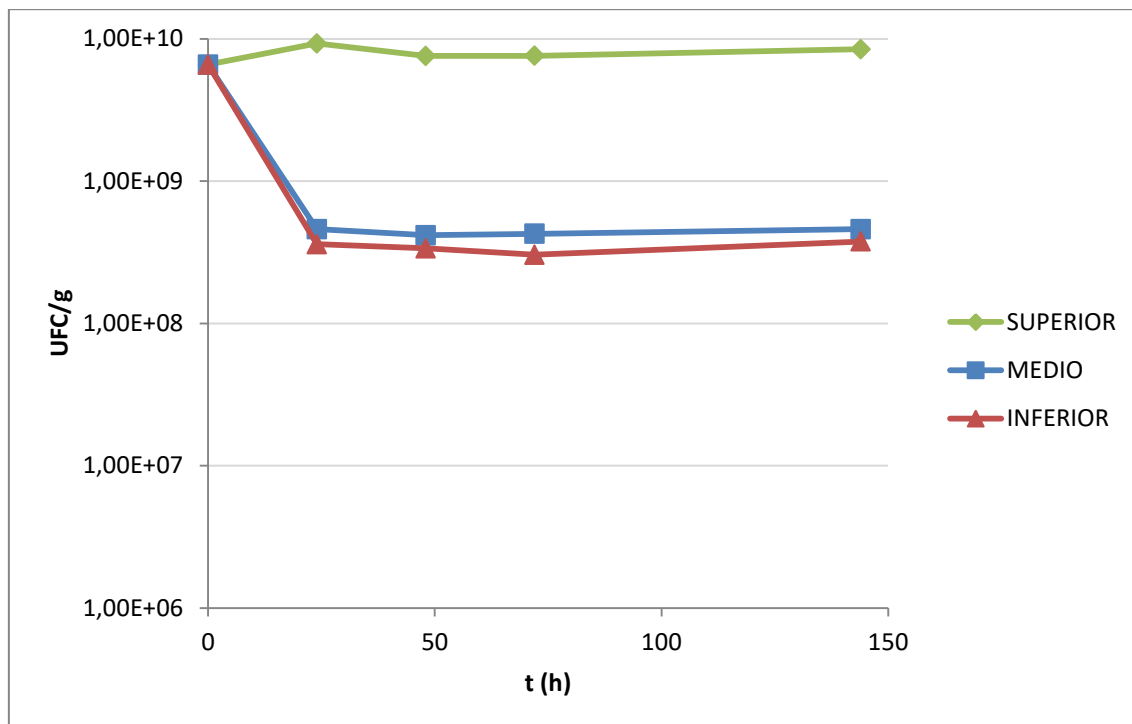


Figura 28. Crecimiento de *S. warneri* en crema de brazo de Fabiola incubada a 30 °C (I). Coeficiente de variación < 5%. Los datos corresponden con la media de las muestras tomadas por triplicado.

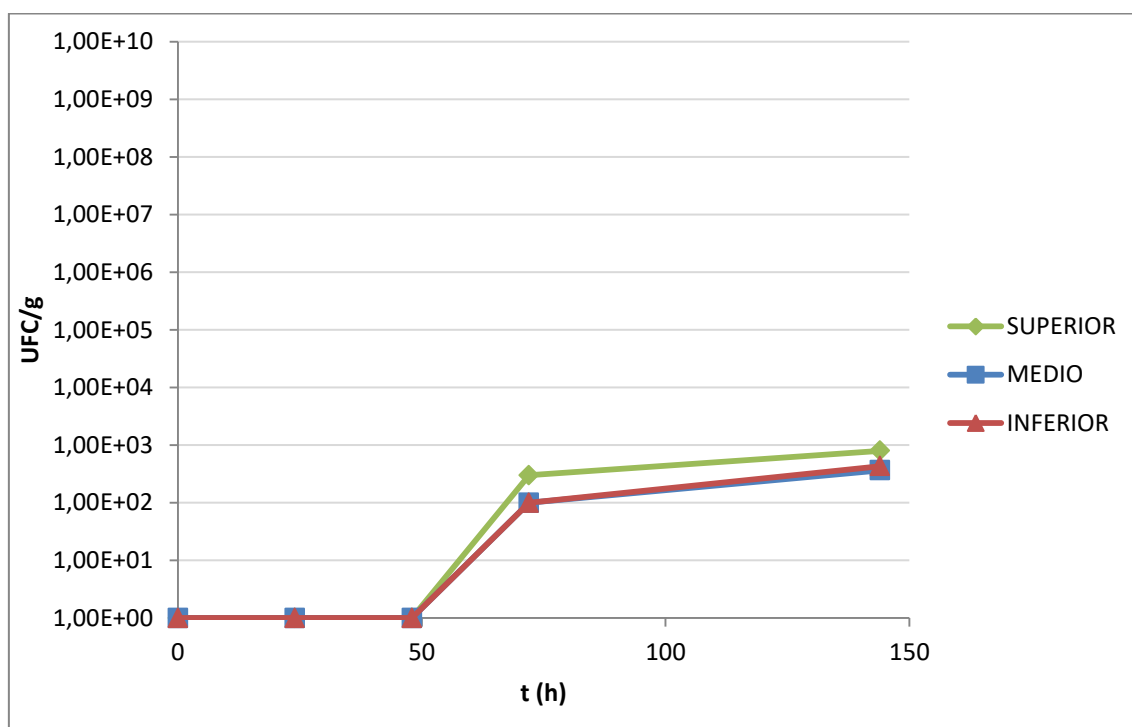


Figura 29. Crecimiento de la flora acompañante (control) en crema de brazo de Fabiola sin inocular e incubada a 30 °C (I). Coeficiente de variación < 5%. Los datos corresponden con la media de las muestras tomadas por triplicado.



El pH obtenido para la crema de brazo de Fabiola fue de 4,63, es decir, un valor que se encuentra dentro del intervalo de crecimiento óptimo definido para *S. warneri* (4,7-5)³⁸.

IV.2.2. Efecto de la temperatura

Con el fin de estudiar el efecto de la temperatura de conservación en el relleno de brazo de Fabiola, se incubaron las jeringas a 30 °C (simulando así el mantenimiento del producto a temperatura ambiente en clima cálido), a 20 °C (simulando el mantenimiento del producto a temperatura ambiente) y a 6 °C (simulando el mantenimiento del producto en condiciones de refrigeración). En el caso de la incubación a 30 °C se repitió el experimento anterior (**Figura 29**) partiendo de una concentración de inóculo menor y poder comparar así el desarrollo de *S. warneri* en ambas situaciones.

Comparando las gráficas de crecimiento de *S. warneri* obtenidas para las diferentes temperaturas de conservación (**Figuras 30, 31 y 32**) puede observarse que en todos los casos, partiendo de un inóculo del orden de 10^7 UFC/g, el crecimiento es ligeramente mayor en la zona superior de las jeringas. A 30 °C (**Figura 30**) a las 168 horas se alcanzaron concentraciones en la zona superior de 3×10^9 UFC/g y en las zonas media e inferior de 9×10^8 . A 20 °C (**Figura 31**) a las 144 horas se obtuvieron concentraciones en la zona superior de 8×10^8 UFC/g y en la zona inferior de 3×10^8 UFC/g. Por último, cabe destacar que aunque a 6 °C (**Figura 32**) puede observarse un crecimiento notablemente más lento que para las dos temperaturas anteriores, la temperatura de refrigeración no inhibe el desarrollo de *S. warneri*, llegando a alcanzar a las 144 horas una concentración en la parte superior de 10^8 UFC/g y en la parte inferior de 7×10^7 UFC/g.

En los tres casos (**Figuras 33, 34 y 35**) el crecimiento de la flora acompañante control fue poco significativo al detectarse concentraciones muy inferiores (en torno a 10^3) a las de *S. warneri*.

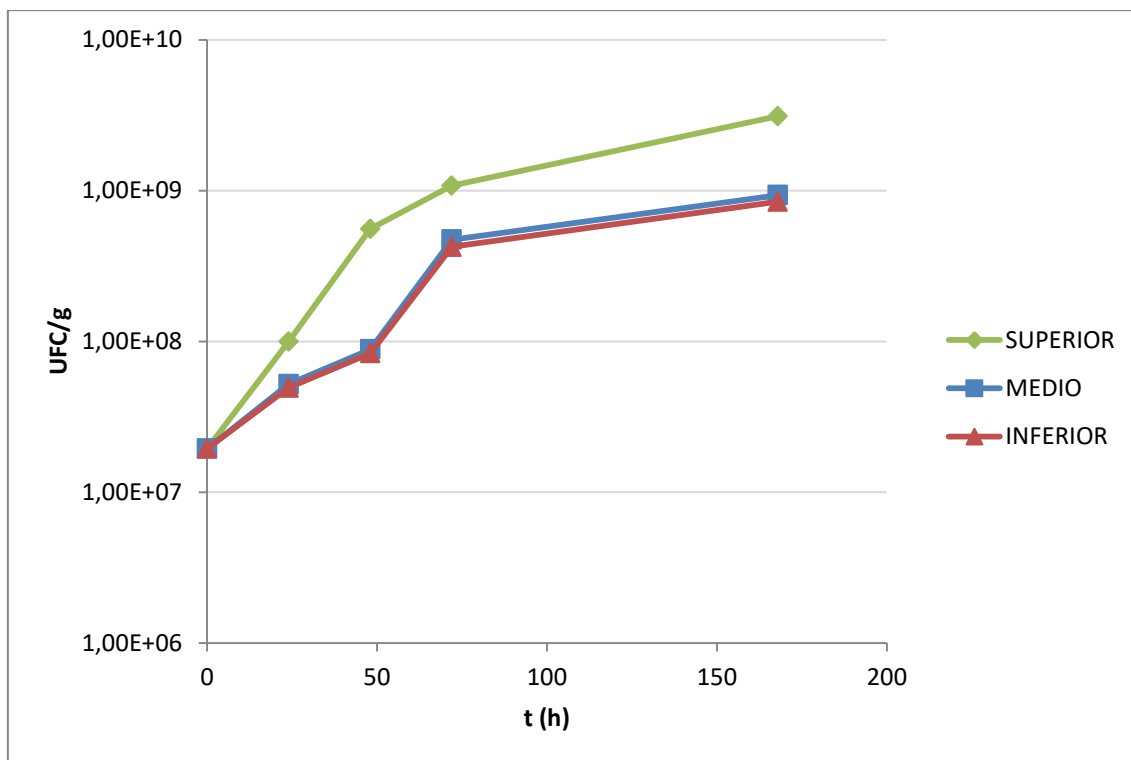


Figura 30. Crecimiento de *S. warneri* en crema de brazo de Fabiola incubada a 30 °C (II). Coeficiente de variación < 5%. Los datos corresponden con la media de las muestras tomadas por triplicado.

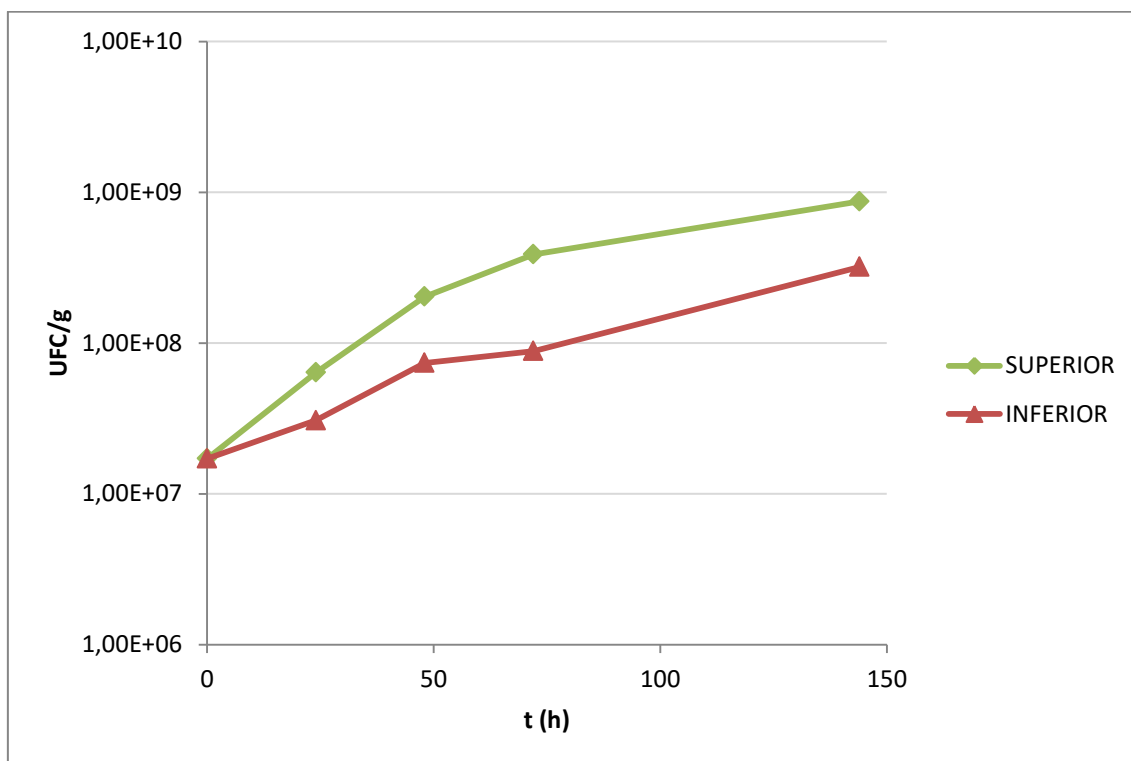


Figura 31. Crecimiento de *S. warneri* en crema de brazo de Fabiola incubada a 20 °C. Coeficiente de variación < 5%. Los datos corresponden con la media de las muestras tomadas por triplicado.

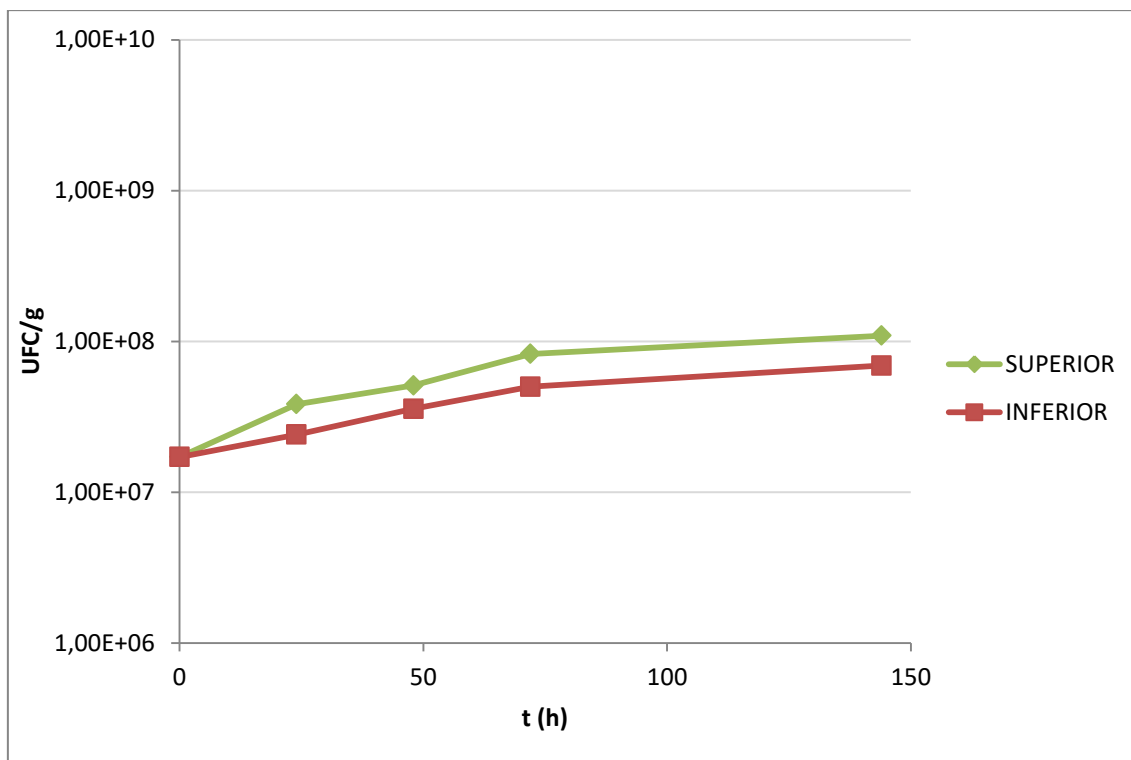


Figura 32. Crecimiento de *S. warneri* en crema de brazo de Fabiola incubada a 6 °C. Coeficiente de variación < 5%. Los datos corresponden con la media de las muestras tomadas por triplicado.

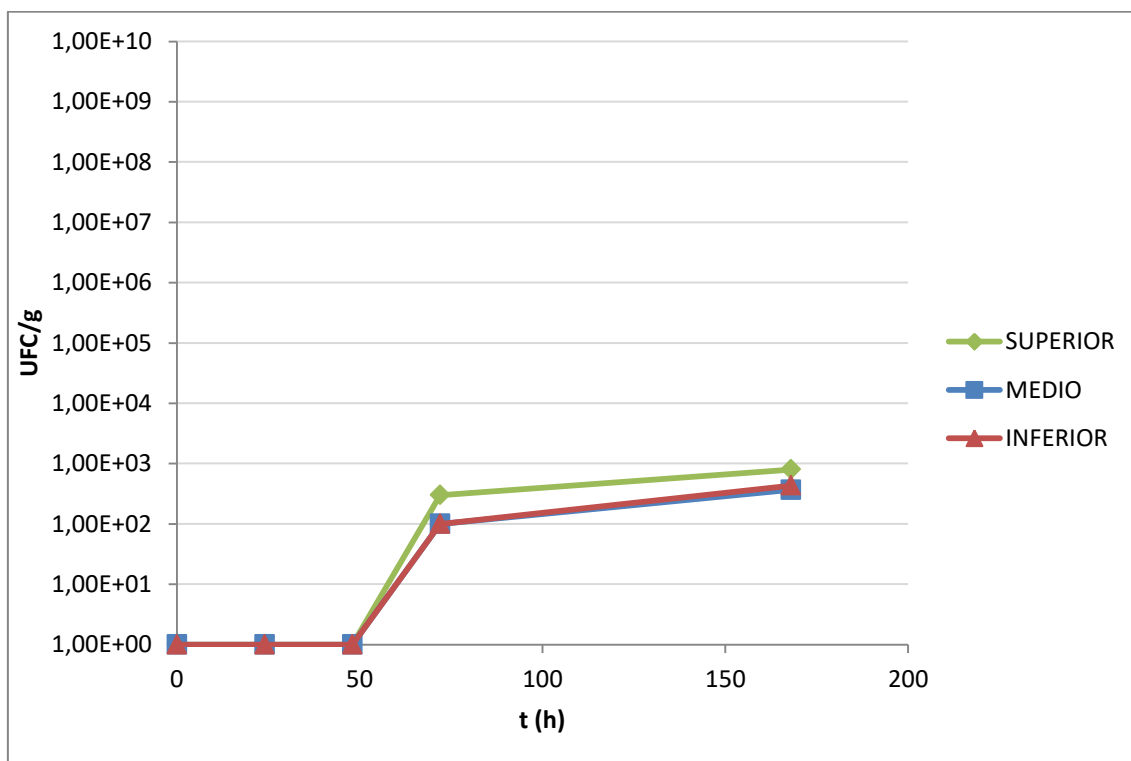


Figura 33. Crecimiento de la flora acompañante (control) en crema de brazo de Fabiola sin inocular e incubada a 30 °C (II). Coeficiente de variación < 5%. Los datos corresponden con la media de las muestras tomadas por triplicado.

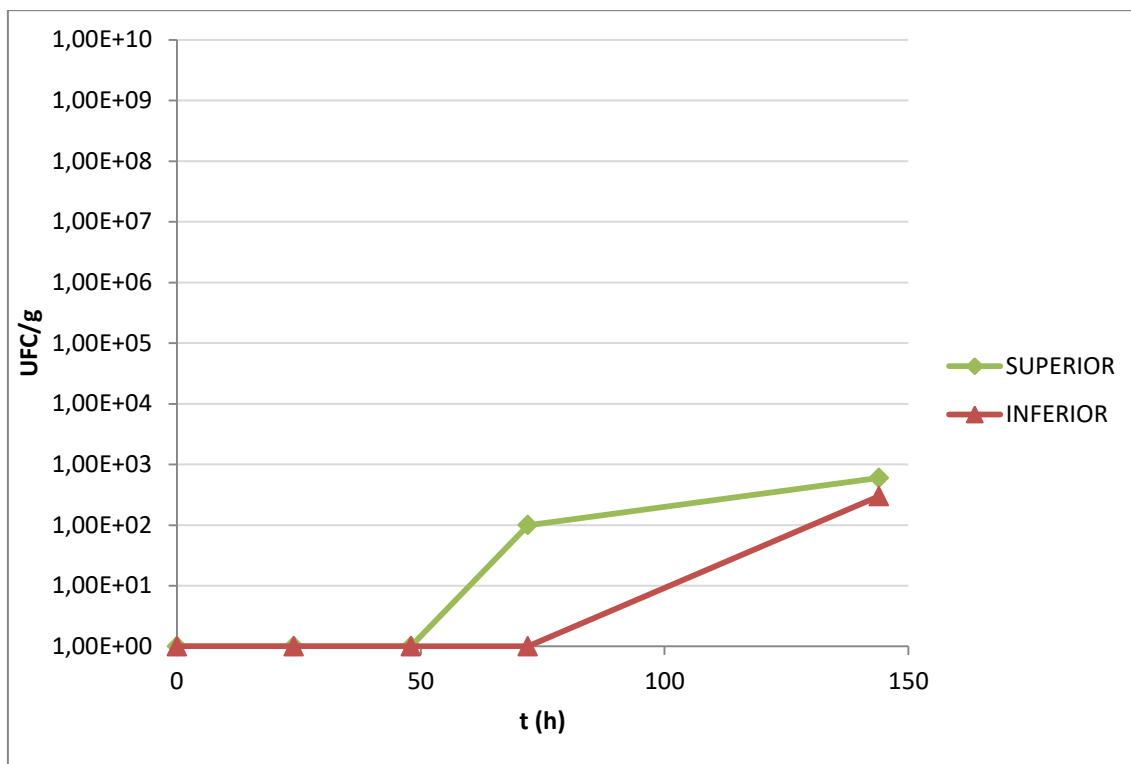


Figura 34. Crecimiento de la flora acompañante (control) en crema de brazo de Fabiola sin inocular e incubada a 20 °C. Coeficiente de variación < 5%. Los datos corresponden con la media de las muestras tomadas por triplicado.

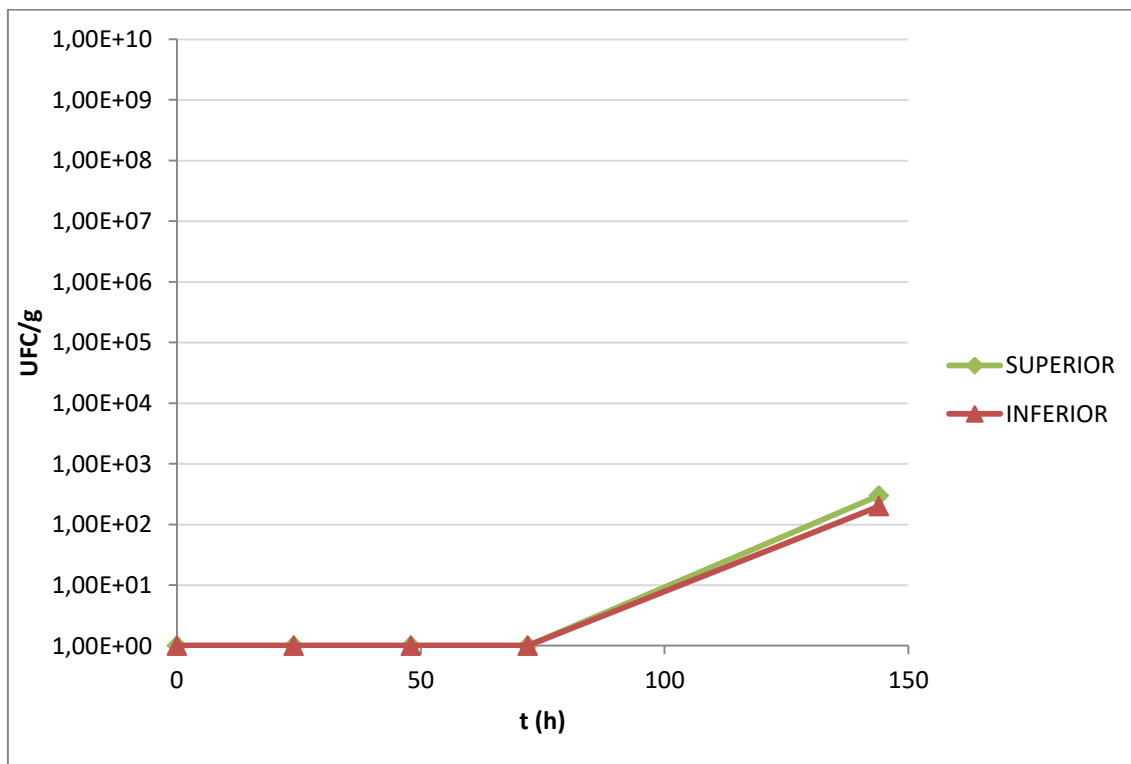


Figura 35. Crecimiento de la flora acompañante (control) en crema de brazo de Fabiola sin inocular e incubada a 6 °C. Coeficiente de variación < 5%. Los datos corresponden con la media de las muestras tomadas por triplicado.



Los datos obtenidos a las distintas temperaturas correspondientes con la fase de crecimiento exponencial ha sido ajustados, con el fin de obtener la velocidad máxima de crecimiento específico, a una ecuación de primer orden: $r_x = \frac{dX}{dt} = \mu_{\max}X$; siendo μ_{\max} la velocidad máxima de crecimiento específico y X la concentración de biomasa celular. A este tipo de crecimiento se le conoce como equilibrado o balanceado y se caracteriza porque todos los constituyentes celulares se duplican en un mismo tiempo. Es decir, que los constituyentes celulares aumentan de manera proporcional con un mismo factor (μ_{\max}) en la unidad de tiempo⁶³.

Cuando se inocula una población bacteriana en un medio fresco el crecimiento, en la mayoría de los casos, no empieza de inmediato sino después de transcurrir un tiempo de adaptación llamado fase de latencia (lag). Además, la población bacteriana no puede crecer indefinidamente de forma exponencial alcanzándose la fase de crecimiento estacionaria donde las limitaciones ocurren ya sea por el agotamiento de algún nutriente esencial, porque se alcance un elevado número de células para el medio disponible, por acumulación de sustancias tóxicas o por combinación de estas causas⁶³. La fase lag y la fase estacionaria no deben ser consideradas para calcular μ_{\max} .

En este caso (**Figuras 31, 31 y 32**) se tomaron las medidas desde tiempo 0 horas porque no se observa fase lag. Esto es debido a que el brazo de Fabiola es rico en todos los nutrientes esenciales y la bacteria inoculada fue cultivada previamente en medio NB por lo que no requiere periodo de adaptación. A las 72 horas se observa que las células ya están comenzando entrar en la fase de crecimiento estacionario, por lo que este último punto no ha sido considerado para el ajuste.

En la **Tabla 4** se muestran los valores obtenidos para μ_{\max} a las diferentes temperaturas y como se puede observar los valores obtenidos en la parte superior son más elevados que los obtenidos en los puntos internos del alimento. Los valores de R^2 indican un buen ajuste en todos los casos con valores superiores a 0,95. Existen trabajos anteriores, donde se realizaron experimentos similares utilizando muestras de tortilla de patata simulada¹¹ en los que también se obtenían valores más altos para μ_{\max} en la zona superior de las jeringas (zona aerobia) que en las zonas media e inferior (zonas anaerobias).

Los resultados demuestran que *S. warneri* es un microorganismo aerobio facultativo⁸, es decir, puede crecer tanto en presencia de oxígeno como en ausencia, aunque prefiere ambientes con disponibilidad de oxígeno donde alcanza mayores tasas



de crecimiento. Por otra parte, como era de esperar el valor de μ_{\max} va disminuyendo a medida que baja la temperatura de conservación ya que la temperatura óptima de crecimiento de *Staphylococcus* está en torno a los 37 °C.

Tabla 4. Valores del parámetro μ_{\max} obtenidos para las distintas temperaturas analizadas

Alimento modelo	T ^a (°C)	Zona	Valores de μ_{\max} (h ⁻¹)	R ²
Crema de brazo de Fabiola	30	Superior	0,0573	0,9690
		Medio	0,0421	0,9535
		Inferior	0,0407	0,9532
	20	Superior	0,0438	0,9790
		Inferior	0,0242	0,9510
	6	Superior	0,0209	0,9602
Inferior		0,0037	0,9991	

IV.2.3. Efecto de la estructura

Los valores obtenidos para la crema de brazo de Fabiola en la **Figura 36** muestran valores de A y z similares para 20 y 30 °C siendo muy distintos a 6 °C lo que muestra que se produce un cambio importante en la estructura a esta temperatura. Suponiendo que el efecto estructural fuera similar para 20 y 30 °C y que se cumpliera una dependencia de temperatura tipo Arrhenius se podría realizar un ajuste lineal a la ecuación: $\mu_{\max} = A \times e^{-\frac{B}{T}}$ (A= -2385,2 h⁻¹ y B= 150,29 K) (**Figura 37**).

Se obtiene por tanto la siguiente ecuación: $\ln(\mu_{\max}) = -\left(\frac{2385}{T}\right) + 5$ y a partir de ella se puede estimar un valor para 6 °C en la zona superior de la jeringa de $\mu_{\max} = 0.0287$ siendo su valor real de $\mu_{\max} = 0,0209$ h⁻¹. De manera que el valor real es más bajo del valor que debería obtenerse, lo que se debe a la diferente estructura de la matriz alimentaria a 6 °C ya que a esta temperatura el alimento modelo está totalmente sólido (por la presencia de margarina entre sus ingredientes) lo que supone una limitación para la difusión de sustancias.

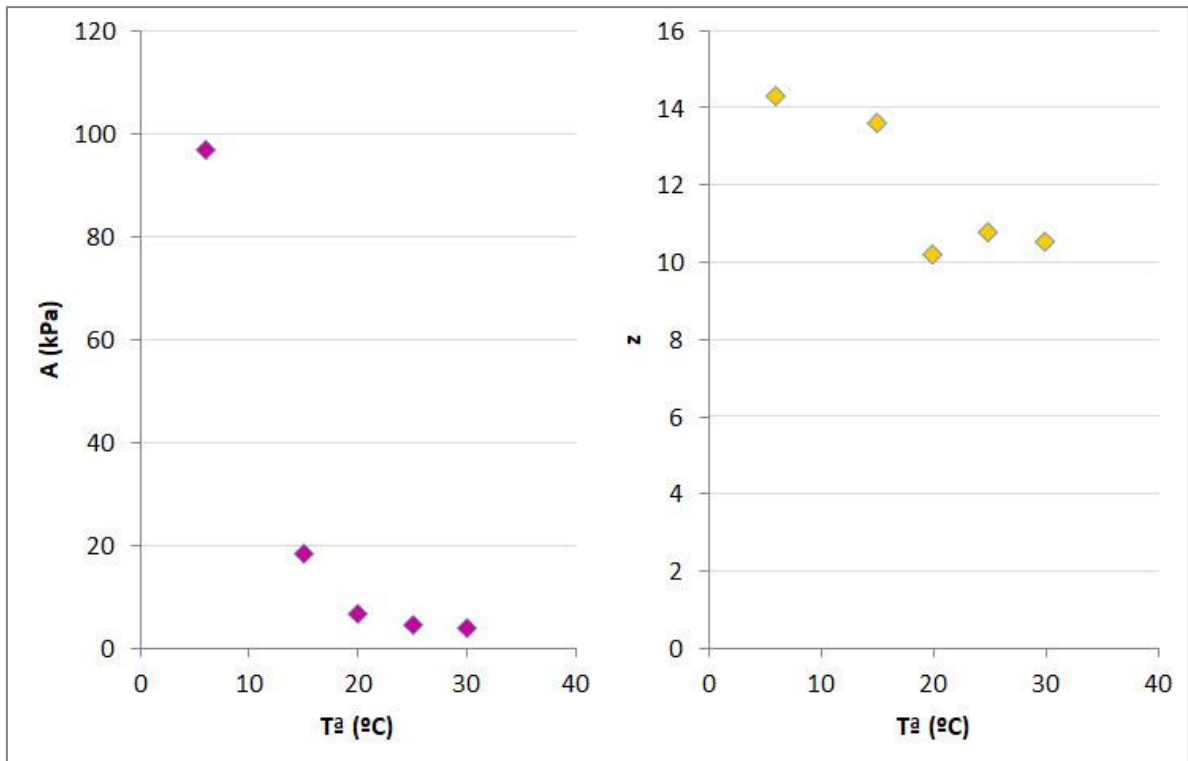


Figura 36. Valores de los parámetros A y z obtenidos para la crema de Brazo de Fabiola a las distintas temperaturas analizadas.

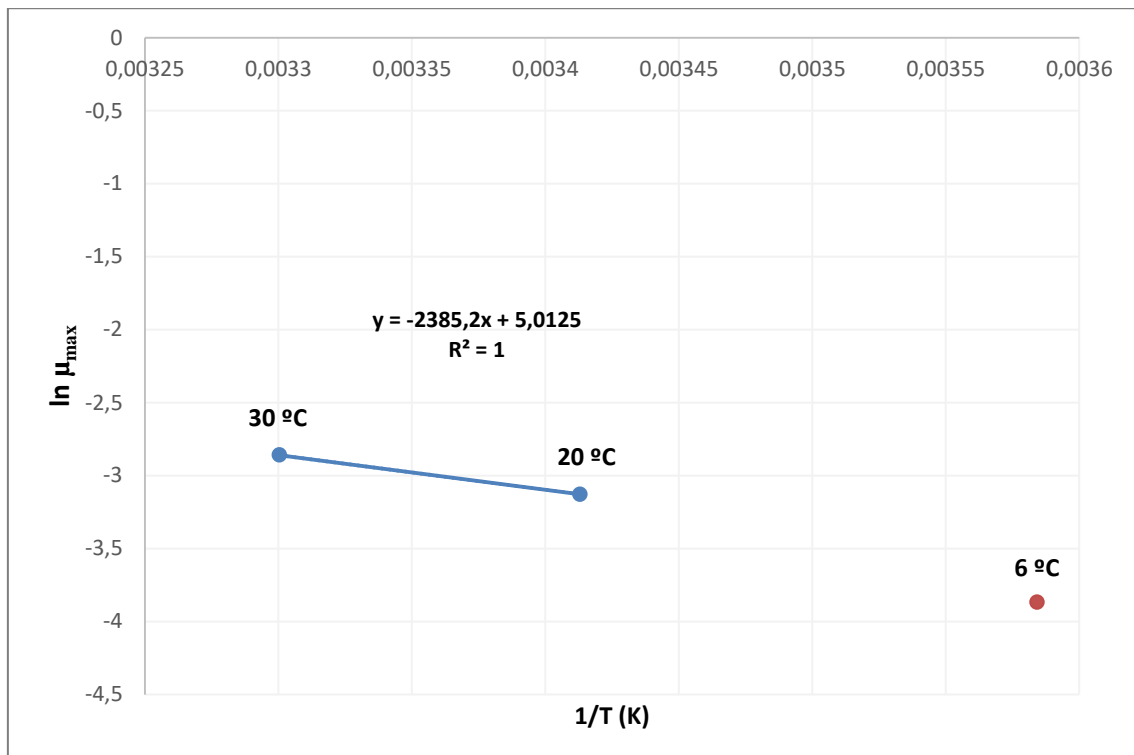


Figura 37. Ajuste para la ecuación de Arrhenius a 20 y 30 °C (Izquierda). Valor para 6 °C no incluido en el ajuste (Derecha).



V. CONCLUSIONES

El presente trabajo permite obtener las siguientes conclusiones:

- ❖ El pH es un parámetro determinante respecto a la viabilidad de *Staphylococcus*. Concretamente, las salsas (mayonesas) estudiadas, que presentaban valores de pH entre 3 y 4, inhiben el crecimiento de *S. warneri* alcanzando desde 10^8 UFC/g hasta valores no detectables de células viables en menos de 48 horas, incluso a temperaturas de almacenamiento de 30 °C.
- ❖ *S. warneri* crece en la crema de tiramisú ensayada donde se combinan como ingredientes huevo y queso, siendo enmascarada su presencia por el rápido desarrollo de las BAL a 30 °C.
- ❖ En el caso de la crema de brazo de Fabiola, se observó que aunque *S. warneri* crece ligeramente mejor en puntos más próximos a la superficie, donde la disponibilidad de oxígeno es mayor, también se desarrolla en zonas internas al tratarse de un organismo facultativo.
- ❖ Respecto a la temperatura de conservación para el relleno de brazo de Fabiola, aunque a temperatura de refrigeración (6 °C) se reduce el crecimiento de *S. warneri* no se llega a conseguir la inhibición aumentando casi un orden magnitud en tres días.
- ❖ En el caso de la crema de brazo de Fabiola, además del efecto de la temperatura también afecta el efecto de la estructura al crecimiento de *Staphylococcus*, obteniéndose a bajas temperaturas valores μ_{\max} de inferiores a los esperados como consecuencia de un importante cambio detectado en sus propiedades estructurales.



VI. REFERENCIAS

1. Miranda, J. M. *et al.* Egg and egg-derived foods: effects on human health and use as functional foods. *Nutrients* **7**, 706–729 (2015).
2. Abín, R., Laca, A., Laca, A. & Díaz, M. Environmental assesment of intensive egg production: a Spanish case study. *J. Clean. Prod.* **179**, 160–168 (2018).
3. Asociación Española de Productoras de Huevos (ASEPRHU). Available at: <http://www.aseprhu.es/>. (Accessed: 30th April 2018)
4. Instituto de Estudios del Huevo (IEH). Available at: <http://www.institutohuevo.com/>. (Accessed: 30th April 2018)
5. Prieto, M., Colin, P., Fernández-Escámez, P. & Alvarez-Ordóñez, A. Epidemiology, detection, and control of foodborne microbial pathogens. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–2 (2015).
6. Espinosa, L., Varela, C., Martínez, E. & Cano, R. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2008-2011 (excluye brotes hídricos). *Boletín Epidemiológico Sem.* **22**, 130–136 (2014).
7. Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W. & Gutiérrez, G. Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. In: *Informe técnico sobre ingeniería agrícola y alimentaria*, chapter 6. Rosell, C. (ed) FAO (2009).
8. Portillo, M. E. & del Pozo, J. L. Infecciones por estafilococo. *Medicine.* **12**, 2890–2894 (2018).
9. Hait, J., Tallent, S., Melka, D., Keys, C. & Bennett, R. Prevalence of enterotoxins and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from a bakery involved in a second staphylococcal food poisoning occurrence. *J. Appl. Microbiol.* **117**, 866–875 (2014).
10. Hennekinne, J.-A., Herbin, S., Firmesse, O. & Auvray, F. European food poisoning outbreaks involving meat and meat-based products. *Procedia Food Sci.* **5**, 93–96 (2015).
11. Sánchez Suárez-Otero, M. Seguridad alimentaria: desarrollo de microorganismos en ovoproductos. Trabajo Fin de Máster (2017).
12. Li, L. *et al.* Dynamic predictive model for growth of *Salmonella* spp. in scrambled egg mix. *Food Microbiol.* **64**, 39–46 (2017).
13. Noriega, E., Laca, A. & Díaz, M. *Listeria* growth under diffusional limitations in



- synthetic meats. *Int. J. Food Sci. Technol.* **44**, 725–734 (2009).
14. Noriega, E., Laca, A. & Díaz, M. Modelling of diffusion-limited growth for food safety in simulated cheeses. *Food Bioprod. Process.* **86**, 122–129 (2008).
 15. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Available at: <http://www.fao.org/>. (Accessed: 13th April 2018)
 16. Montagna, M. T. *et al.* Prevention of foodborne diseases and home safety. *Ann. di Ig. Med. Prev. e di Comunità* **25**, 191–200 (2013).
 17. Mafu, A. A., Plumety, C., Deschênes, L. & Goulet, J. Adhesion of pathogenic bacteria to food contact surfaces: influence of pH of culture. *Int. J. Microbiol.* **2011**, 1–10 (2011).
 18. McEntire, J. Foodborne disease. The global movement of food and people. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **27**, 687–693 (2013).
 19. Wills, W. J., Meah, A., Dickinson, A. M. & Short, F. ‘*I don’t think I ever had food poisoning*’. A practice-based approach to understanding foodborne disease that originates in the home. *Appetite* **85**, 118–125 (2015).
 20. Ameme, D. K. *et al.* Foodborne disease outbreak in a resource-limited setting: a tale of missed opportunities and implications for response. *Pan Afr. Med. J.* **23**, 1–9 (2016).
 21. Cortés-Sánchez, A., Díaz-Ramírez, M. & Salgado-Cruz, M. *Bacillus cereus*: food, health and biotechnology. *Agroproductividad* **10**, 3–9 (2017).
 22. AECOSAN (Agencia Española de Consumo Seguridad Alimentaria y Nutrición). Available at: <http://www.aecosan.msssi.gob.es/>. (Accessed: 23rd April 2018)
 23. Schirone, M. *et al.* Assessment of knowledge and applications of hygiene practices in the food service sector. *J. Food Saf.* **38**, 1–6 (2018).
 24. Boletín Oficial del Estado (BOE). Available at: <https://www.boe.es/>. (Accessed: 13th April 2018)
 25. Luis, M. & Martínez, G. Nasal and pharyngeal asymptomatic carriers of *Staphylococcus aureus* in pediatric-hospital workers. *Ciencias Médicas Pinar del Río* **20**, 298–305 (2016).
 26. OMS (Organización Mundial de la Salud). Available at: <http://www.who.int/es>. (Accessed: 8th May 2018)
 27. Unión Europea. Reglamento (CE) N° 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de Abril de 2004, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal



- destinados al consumo humano. *D. Of. la Unión Eur.* **L226**, 83–127 (2004).
28. Neira, C., Laca, A., Laca, A. & Díaz, M. Microbial diversity on commercial eggs as affected by the production system. A first approach using PGM. *Int. J. Food Microbiol.* **262**, 3–7 (2017).
 29. Unión Europea. Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de Abril de 2004, por el que se establecen las normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. *D. Of. la Unión Eur.* **L139**, 55–206 (2004).
 30. Nimalaratne, C. & Wu, J. Hen egg as an antioxidant food commodity: a review. *Nutrients* **7**, 8274–8293 (2015).
 31. Hincke, M. T. *et al.* The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front. Biosci.* **17**, 1266–1280 (2012).
 32. Hunton, P. Research on eggshell structure and quality: an historical overview. *Brazilian J. Poult. Sci.* **7**, 67–71 (2005).
 33. Solomon, S. E. The eggshell: strength, structure and function. *Br. Poult. Sci.* **51**, 52–59 (2010).
 34. Mine, Y. & Zhang, H. Egg components in food systems. *Biochem. Foods* **5**, 215–241 (2013).
 35. Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y. & Ahn, D. U. Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents – A review. *Poult. Sci.* **92**, 3292–3299 (2013).
 36. Hirsch, D. B. *et al.* Sulfanilic acid-modified chitosan mini-spheres and their application for lysozyme purification from egg white. *Biotechnol. Prog.* **34**, 387–396 (2017).
 37. European Union. Commission Regulation (EC) N° 2073/2005, of 15 November 2005, on microbiological criteria for foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **L332**, 1–19 (2005).
 38. Kloos, W. E. & Schleifer, K. H. Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Description of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **25**, 62–79 (1975).
 39. Alves, E. *et al.* Protein profiles of *Escherichia coli* and of *Staphylococcus warneri* membrane are altered by photosensitization with cationic porphyrins. *Photochem. Photobiol. Sci.* **14**, 1169–1178 (2015).



40. Pyzik, E. & Marek, A. Characterization of bacteria of the genus *Staphylococcus* isolated from the eggs of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Pol. J. Vet. Sci.* **15**, 767–772 (2012).
41. Al-Natour, M. Q., Alaboudi, A. R., Al-Hatamelh, N. A. & Osaili, T. M. *Escherichia coli* O157:H7 facilitates the penetration of *Staphylococcus aureus* into table eggs. *J. Food Sci.* **77**, 29–34 (2012).
42. Syed, M. A. *et al.* Detection and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from table eggs in Haripur, Pakistan. *Foodborne Pathog. Dis.* **15**, 86–93 (2017).
43. Gole, V. C. *et al.* Effect of egg washing and correlation between cuticle and egg penetration by various *Salmonella* strains. *Int. J. Food Microbiol.* **9**, 1–33 (2014).
44. Perry, J. J. & Yousef, A. E. *Salmonella* Enteritidis in shell eggs. Evolving concerns and innovative control measures. *Adv. Appl. Microbiol.* **81**, 243–274 (2012).
45. Dearborn, D. C., Page, S. M., Dainson, M., Hauber, M. E. & Hanley, D. Eggshells as hosts of bacterial communities: An experimental test of the antimicrobial egg coloration hypothesis. *Ecol. Evol.* **7**, 9711–9719 (2017).
46. Artime, A., Laca, A., Laca, A. & Díaz, M. Alcoholic beverage from the egg yolk aqueous fraction. *J. Inst. Brew.* **122**, 729–735 (2016).
47. Gurtler, J. B. *et al.* *Salmonella* isolated from ready-to-eat pasteurized liquid egg products: thermal resistance, biochemical profile, and fatty acid analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **206**, 109–117 (2015).
48. Chousalkar, K., Gast, R., Martelli, F. & Pande, V. Review of egg-related salmonellosis and reduction strategies in United States, Australia, United Kingdom and New Zealand. *Crit. Rev. Microbiol.* **44**, 290–303 (2017).
49. FDA (Food and Drug Administration). Available at: <https://www.fda.gov/>. (Accessed: 2nd July 2018)
50. Jokić, M. T. S. & Aladić, D. Š. K. Rheological characteristics salad mayonnaise with hens and quail egg yolks. **XVII**, 166–171 (2015).
51. Keerthirathne, T., Ross, K., Fallowfield, H. & Whiley, H. A review of temperature, pH, and other factors that influence the survival of *Salmonella* in mayonnaise and other raw egg products. *Pathogens* **5**, 63 (2016).
52. Kowalik, J., Lobacz, A., Zulewska, J. & Dec, B. Analysis and mathematical modelling of the behaviour of *Escherichia coli* in the mascarpone cheese during



- cold storage. *Int. J. Food Sci. Technol.* **53**, 1–8 (2018).
53. Lorenzo, J. M. *et al.* Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability. *Innov. Technol. Food Preserv.* **2018**, 53–107 (2018).
 54. Augusto, P. E. D., Soares, B. M. C. & Castanha, N. Conventional technologies of food preservation. *Innov. Technol. Food Preserv.* **2018**, 3–23 (2018).
 55. Ayala, A. A., Serna, L. & Mosquera, E. Freeze-drying in yellow pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). *VITAE, Rev. la Fac. química Farm.* **17**, 121–127 (2010).
 56. Aguilar Morales, J. *Métodos de conservación de alimentos. Red Tercer Milenio* (2012).
 57. Kou, X., Li, R., Hou, L., Zhang, L. & Wang, S. Identifying possible non-thermal effects of radio frequency energy on inactivating food microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **269**, 89–97 (2018).
 58. Alkawareek, M. Y., Gorman, S. P., Graham, W. G. & Gilmore, B. F. Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. *Int. J. Antimicrob. Agents* **43**, 154–160 (2014).
 59. Baier, M., Ehlbeck, J., Knorr, D., Herppich, W. B. & Schlüter, O. Impact of plasma processed air (PPA) on quality parameters of fresh produce. *Postharvest Biol. Technol.* **100**, 120–126 (2015).
 60. Tabilo-Munizaga, G. & Barbosa-Cánovas, G. V. Rheology for the food industry. *J. Food Eng.* **67**, 147–156 (2005).
 61. Osorio, J. F., Ciro, H. J. & Mejía, L. G. Rheological and textural characterization of the Edam cheese. *Dyna.Unalmed.Edu.Co* **72**, 33–45 (2005).
 62. Schramm, G. *A Practical Approach to Rheology and Rheometry. Karlsruhe: Haake* (1994).
 63. Neira Solís, C. Microbiota en huevos y derivados: identificación y desarrollo. Trabajo Fin de Máster (2016).
 64. Yokoi, K. J. *et al.* Molecular properties and extracellular processing of the lipase of *Staphylococcus warneri* M. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 167–176 (2012).
 65. Yokoi, K. J. *et al.* Aureolysin of *Staphylococcus warneri* M accelerates its proteolytic cascade, and participates in biofilm formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 1238–1242 (2016).
 66. Dimitriadí, D., Charitidou, C. & Charvalos, E. Urinary tract infection due to beta-



- lactams-resistant *Staphylococcus warneri*: a case report. *Int. Arab. J. Antimicrob. Agents* **4**, 1–4 (2014).
67. Dong, Z. Y. *et al.* Antibacterial activity of silver nanoparticles against *Staphylococcus warneri* synthesized using endophytic bacteria by photo-irradiation. *Front. Microbiol.* **8**, 1–8 (2017).
68. Kuvhenguhwa, M. S., Belgrave, K. O., Shah, S. U., Bayer, A. S. & Miller, L. G. A case of early prosthetic valve endocarditis caused by *Staphylococcus warneri* in a patient presenting with congestive heart failure. *Cardiol. Res.* **8**, 236–240 (2017).
69. Alves, E. *et al.* Photodynamic oxidation of *Staphylococcus warneri* membrane phospholipids: new insights based on lipidomics. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **27**, 1607–1618 (2013).
70. Laca, A., Sáenz, M. C., Paredes, B. & Díaz, M. Rheological properties, stability and sensory evaluation of low-cholesterol mayonnaises prepared using egg yolk granules as emulsifying agent. *J. Food Eng.* **97**, 243–252 (2010).
71. Directo al Paladar. Cómo hacer tiramisú casero. Available at: <https://www.directoalpaladar.com/postres/como-hacer-tiramisu-casero-receta>. (Accessed: 29th April 2018)
72. Comida unComo. Cómo hacer un brazo de Fabiola. Available at: <https://comida.uncomo.com/receta/como-hacer-un-brazo-de-galletas-o-fabiola-6637.html>. (Accessed: 13th May 2018)
73. Mancini, F., Montanari, L., Peressini, D. & Fantozzi, P. Influence of alginate concentration and molecular weight on functional properties of mayonnaise. *Food Sci. Technol.* **35**, 517–525 (2002).
74. Smith, A. C. & Hussey, M. A. Gram stain protocols. *Am. Soc. Microbiol.* **2005**, 1–9 (2005).
75. Migliori, M., Gabriele, D., Baldino, N., Lupi, F. R. & De Cindio, B. Rheological properties of batter dough: effect of egg level. *J. Food Process Eng.* **34**, 1266–1281 (2011).
76. Ivić, I., Karanović, J. & Pavičić-Ivelja, M. Sepsis with multiple abscesses caused by *Staphylococcus warneri*: a case report. *Cent. Eur. J. Med.* **8**, 45–47 (2013).
77. Carminati, D., Perrone, A. & Neviani, E. Inhibition of *Clostridium sporogenes* growth in mascarpone cheese by co-inoculation with *Streptococcus thermophilus* under conditions of temperature abuse. *Food Microbiol.* **18**, 571–579 (2001).