

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRÒNOMICA I DEL MEDI NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

ESTUDIO DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE UN NUEVO ALIMENTO: TULIVA

Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

AUTORA: LUCÍA CANO SALES

TUTORA: SALUT BOTELLA GRAU

COTUTORA EXTERNA: AYA BOUKHAROUBA

Curso académico 2020 – 2021

Valencia, Julio de 2021

RESUMEN

En este trabajo se planifica el control de calidad microbiológica, así como los distintos controles organolépticos que condicionan la aceptabilidad de un nuevo envase comestible, siguiendo los criterios establecidos para este tipo de alimentos. Se tratan todos los métodos normalizados existentes para que el nuevo producto pueda llegar a los consumidores con las condiciones necesarias de Seguridad Alimentaria. Tuliva es el nuevo alimento presentado por la empresa Cruixents, una StartUp formada por cuatro alumnas de Ciencia y Tecnología de los alimentos; una alumna del Grado de Diseño; y un alumno del grado de Administración y Dirección de empresas.

Se trata de un nuevo envase comestible que fue diseñado con la finalidad de reducir el empleo de envases de un solo uso y así ayudar, en la medida de lo posible, a la sostenibilidad del planeta. Al tratarse de un nuevo producto alimentario, ha de pasar por los controles microbiológicos necesarios, es por ello por lo que en este trabajo se planifican los distintos controles microbiológicos y organolépticos que condicionan la aceptabilidad del producto. Además, se detalla la elaboración de Tuliva y cómo ha sido la aceptación de este nuevo alimento.

Palabras clave: Tuliva, Cruixents, envase comestible, snack, galleta, control microbiológico, humedad, análisis sensorial.

RESUM

En aquest treball es planifica el control de qualitat microbiològica, així com diferents controls organolèptics que condicionen l'acceptabilitat d'un nou envàs comestible, seguint els criteris establerts per a aquesta mena d'aliments. Es tracten tots els mètodes normalitzats existents perquè el nou producte pugui arribar als consumidors amb les condicions necessàries de Seguretat Alimentària.

Tuliva és el nou aliment presentat per l'empresa Cruixents, una StartUp formada per quatre alumnes de Ciència i Tecnologia dels aliments; una alumna del Grau de Disseny; i un alumne del grau d'Administració i Direcció d'empreses.

Es tracta d'un nou envàs comestible que va ser dissenyat amb la finalitat de reduir l'ús d'envasos d'un sol ús i així ajudar, en la mesura que siga possible, a la sostenibilitat del planeta. En tractar-se d'un nou producte alimentari, ha de passar pels controls microbiològics necessaris, és per això que en aquest treball es planifiquen els diferents controls microbiològics i organolèptics que condicionen l'acceptabilitat del producte. A més, es detalla l'elaboració de Tuliva i com ha sigut l'acceptació d'aquest nou aliment.

Paraules clau: Tuliva, Cruixents, envàs comestible, snack, galeta, control microbiològic, humitat, anàlisi sensorial.

Study of the microbiological quality of a new foodstuff: Tuliva

ABSTRACT

In this work the microbiological quality control is planned, as well as the different organoleptic controls that condition the acceptability of a new edible package, following the criteria established for this type of food. All the existing standardized methods are dealt with so that the new product can reach consumers with the necessary conditions of Food Safety. Tuliva is the new food presented by the company Cruixents, a StartUp formed by four students of Food Science and Technology; a student of the Degree in Design; and a student of the Degree in Business Administration and Management.

It is a new edible packaging that was designed with the aim of reducing the use of single-use packaging and thus help, as far as possible, to the sustainability of the planet. Since it is a new food product, it has to undergo the necessary microbiological controls, which is why in this work the different microbiological and organoleptic controls that condition the acceptability of the product are planned. In addition, the elaboration of Tuliva is detailed and how has been the acceptance of this new food.

Key words: Tuliva, Cruixents, edible packaging, snack, cookie, microbiological control, humidity, sensory analysis.

Alumno: Lucía Cano Sales
Tutora: Salut Botella Grau
Cotutora: Aya Boukharouba

VALENCIA, Julio de 2021

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer a Salut Botella por aceptar ser mi tutora sin la cual no hubiera sido posible, y por comprender lo difícil que ha sido en algunos momentos sacar el tiempo suficiente para la realización del trabajo.

A María, Rovi, Marta, Laura y Carlos, por dejarme hacer el trabajo sobre nuestro pequeño proyecto que tanto esfuerzo, tiempo y comeduras de cabeza nos ha costado.

A los compañeros de CTA, especialmente a esas grandes amigas que esta carrera me ha permitido conocer, que me han hecho mucho más llevaderos estos cuatro años los cuales no hubieran sido los mismos sin ellas.

Y en especial a mi familia, que me ha apoyado siempre y que me han dado la oportunidad de estar donde estoy a día de hoy.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Los envases comestibles	1
1.2. Un nuevo envase comestible: Tuliva	1
1.3. Calidad microbiológica de Tuliva	3
2. Objetivos	3
3. Materiales y Métodos	4
3.1. Composición y Elaboración de Tuliva.....	4
3.2. Criterio de calidad microbiológica de Tuliva.....	5
3.2.1. Recuento aerobios mesófilos según UNE-EN ISO 4833-1:2013.....	7
3.2.2. Detección y recuento enterobacterias coliformes según UNE-EN ISO 21528-1:2017.....	8
3.2.3. Enumeración de <i>Escherichia coli</i> según UNE-EN ISO 16649-3:2015.....	9
3.2.4. Recuento <i>Staphylococcus aureus</i> según UNE-EN ISO 6888-1:1999	11
3.2.5. Detección, enumeración y serotipado <i>Salmonella</i> spp. según UNE-EN ISO 6579-1:2017.....	12
3.2.6. Recuento mohos y levaduras según UNE-EN ISO 21527-2:2008	15
3.2.7. Recuento <i>Bacillus cereus</i> presuntivos según UNE-EN ISO 7932:2004	16
3.2.8. Detección y recuento estreptococos intestinales según UNE-EN ISO 7899-2:2000.....	17
3.2.9. Detección y recuento <i>Listeria monocytogenes</i> según UNE-EN ISO 11290-2:2017.....	18
3.3. Análisis de la humedad según el método de secado a vacío.....	20
4. Resultados y discusión	21
4.1. Clasificación y Criterio de calidad microbiológica de Tuliva	21
4.1.1. Recuento aerobios mesófilos según UNE-EN ISO 4833-1:2013.....	21
4.1.2. Detección y recuento enterobacterias coliformes según UNE-EN ISO 21528-1:2017.....	21
4.1.3. Enumeración de <i>Escherichia coli</i> según UNE-EN ISO 16649-3:2015.....	22
4.1.4. Recuento <i>Staphylococcus aureus</i> según UNE-EN ISO 6888-1:1999	22
4.1.5. Detección, enumeración y serotipado <i>Salmonella</i> spp. según UNE-EN ISO 6579-1:2017.....	23
4.1.6. Recuento mohos y levaduras según UNE-EN ISO 21527-2:2008	23
4.1.7. Recuento <i>Bacillus cereus</i> presuntivos según UNE-EN ISO 7932:2004	24
4.1.8. Detección y recuento estreptococos intestinales según UNE-EN ISO 7899-2:2000.....	24
4.1.9. Detección y recuento <i>Listeria monocytogenes</i> según UNE-EN ISO 11290-2:2017.....	24

4.2. Determinación humedad según método de secado a vacío.....	25
4.3. Aceptación de un nuevo producto: Tuliva	25
5. Conclusiones	29
6. Bibliografía	29

Índice Figuras

Figura 1. Pétalo de Tuliva junto con los diferentes envases.....	2
Figura 2. Envase primario junto con los envases secundarios.....	2
Figura 3. Diagrama del procedimiento para el recuento de aerobios mesófilos (UNE-EN ISO 4833:2014).	7
Figura 4. Diagrama del procedimiento para la detección y el recuento de enterobacterias coliformes (UNE-EN ISO 21528-1:2017).	8
Figura 5. Diagrama del procedimiento para la detección y el recuento de <i>Listeria monocytogenes</i> (UNE-EN ISO 11290-2:2017).....	19
Figura 6. Diagrama del procedimiento para el recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> (UNE-EN ISO 6888-1:1999).....	11
Figura 7. Diagrama del procedimiento para la detección, enumeración y serotipado de <i>Salmonella</i> spp. (UNE-EN ISO 6579-1:2017).	13
Figura 8. Diagrama del procedimiento para el recuento de mohos y levaduras (UNE-EN ISO 21527-2:2008). 15	
Figura 9. Diagrama del procedimiento para el recuento de <i>Bacillus cereus</i> (UNE-EN ISO 7932:2004).	16
Figura 10. Diagrama del procedimiento para la enumeración de <i>Escherichia coli</i> (UNE-EN ISO 16649-3:2015).	10
Figura 11. Diagrama del procedimiento para la detección y el recuento de estreptococos intestinales (UNE-EN ISO 7899-2:2000).	17
Figura 12. Ejemplos de Tuliva con diferentes acompañamientos.....	26
Figura 13. Entrega de premios Ecotrophelia 2020.	26
Figura 14. Entrevista en Informaciongastronomica.com < https://informaciongastronomica.com/tuliva-emplatados-originales-y-con-sello-km-0/ >. .	27
Figura 15. Entrevista en EAMN de la UPV < https://eamn.blogs.upv.es/2020/05/12/equipo-cruixents-la-innovacion-es-evolucion-y-la-evolucion-es-necesaria-en-la-sociedad/ >.....	27
Figura 16. Entrevista en CV Radio, en el programa El forcat de Silvia < https://www.ivoox.com/15-09-2020-tuliva-premio-se-come-audios-mp3_rf_56720384_1.html >.....	27
Figura 17. Entrevista en el blog de Adeoliva < https://adeoliva.com/tuliva-harina-hueso-de-aceituna/ >.....	28
Figura 18. Video realizado por la ETSIAMN en Facebook < https://www.facebook.com/watch/?v=1194021890982278 >.....	28
Figura 19. Puesto de Tuliva en Ftalks20.....	28

1. Introducción

1.1. Los envases comestibles

Hoy en día los plásticos son uno de los principales problemas del cambio climático. Es por esto, que cada vez se están desarrollando soluciones para combatir este problema. Una de las soluciones que más importancia está cogiendo es la fabricación en envases y platos comestibles (Ecoosfera, 2019).

Se está estudiando el uso de sustancias alimenticias como algas marinas o almidón de patata para fabricar envases y vajillas comestibles, pero estos envases presentan algunos desafíos. Como, por ejemplo, la preocupación de los consumidores ante la higiene de estos envoltorios, por lo que se opina que se deberían recubrir con un embalaje externo, que puede ser biodegradable. Otro gran desafío que se presenta es la aceptación del público ante comerse algo que normalmente se desecha (Residuos Profesional, 2020).

Es cierto que el empleo de plásticos en los envases tiene un gran impacto en el medio ambiente, sobre todo en el ecosistema marino, y se prevé que sobre el 2050 habrá más cantidad de plástico en el mar que peces, por lo que es una cuestión que preocupa mucho a la sociedad actualmente. Aunque estos plásticos son nocivos para el medioambiente, son útiles para envolver alimentos y que éstos se mantengan seguros y estables en el tiempo. Además, son fáciles de producir y se les pueden otorgar diferentes formas y diseños. Es por esto, que se está estudiando el desarrollo de nuevos polímeros que pueden tener un impacto mínimo con el medio ambiente (MERCK GROUP, 2018).

1.2. Un nuevo envase comestible: Tuliva

El Grado de Ciencia y Tecnología de los alimentos pretende formar a los estudiantes para que adquieran los conocimientos de las bases fundamentales de la alimentación, la elaboración y la conservación de los alimentos, la calidad y la seguridad alimentaria.

El grupo de Generación Espontánea formado por alumnos del Grado de Ciencia y Tecnología de los alimentos (CTA), junto a algunos profesores de la asignatura de alimentación y cultura, dietética y nutrición, seleccionaron Tuliva como uno de los representantes de la Universidad Politècnica de València (UPV) para el concurso de Ecotrophelia, concurso a nivel nacional de productos innovadores.

Mediante diversos talleres de Design Thinking, nació la idea de Cruixents, una StartUP formada por cuatro alumnas de Ciencia y Tecnología de los alimentos; María Cabrera, Lucía Cano, Marta Maravilla y María Rovira, una alumna del Grado de Diseño; Laura Junco, y un alumno del grado de Administración y Dirección de Empresas, Carlos J. Enguix.

Es esta StartUp, Cruixents, quien nos presenta el proyecto Tuliva. Se trata de un pétalo hecho a base de harina de semilla de aceituna y creada como envase comestible para presentar platos preparados de una forma diferente. Se trata de un producto con una gran versatilidad, convirtiéndose así en el mejor complemento tanto para postres dulces

como para aperitivos salados, ya que aporta un toque distintivo y exótico al plato en el que se incluya.



Figura 1. Pétalo de Tuliva junto con los diferentes envases.

Tuliva está dirigido especialmente a ser distribuido a través del canal de hoteles, restaurantes y cafeterías HORECA, aunque también se podría comprar en tienda online, y así reducir el uso de envases de un solo uso. Abarca a un gran número de nichos en la industria alimentaria, ya que, se engloban grupos más específicos como los celíacos, intolerantes a la lactosa, vegetarianos y a grupos concienciados con el medio ambiente.

Tuliva contará con un envase primario con un sistema Flow Pack, película en forma de bolsa sellada térmicamente con triple costura que envuelve al producto, se trata de una bolsa de polipropileno bio-orientado (BOPP; biaxially orientes polypropylene) que se estira en dirección transversal a la máquina y en la dirección de la máquina, sellada por triple costura para evitar que el producto se pueda reblandecer y actuando como barrera para garantizar su calidad y propiedades. En cuanto a los envases secundarios se pueden diferenciar dos:

- Para la distribución en el canal HORECA, se emplea una caja de cartón ondulado de fondo y tapa, en su interior encontraremos unas separaciones para colocar 10 paquetes Flow Pack de 10 unidades de pétalos de Tuliva cada uno.
- Para la venta online, se emplea un envase tubular de cartón donde se introducirá un único paquete Flow Pack de 10 pétalos de Tuliva.

Actualmente Cruixents propone el empleo de un plástico biodegradable para el sistema Flow Pack, ya que con la tecnología actual se permite que plásticos hechos a través de fuentes vegetales puedan emplearse en las máquinas de envasado.



Figura 2. Envase primario junto con los envases secundarios.

1.3. Calidad microbiológica de Tuliva

El Reglamento CE 2073/2004 D.O.U.E. 22/12/2005 modificado por el Reglamento CE 1441/2007 D.O.U.E. 07/12/2007 define:

-Criterio microbiológico: criterio que define la aceptabilidad de un producto o lote de productos alimenticios o un proceso basándose en la ausencia, presencia o número de microorganismos, y/o en la cantidad de sus toxinas/metabolitos, por unidad de masa, volumen, superficie o lote.

-Criterio de seguridad alimentaria: criterio que define la aceptabilidad de un producto o un lote de productos alimenticios y es aplicable a los productos comercializados.

-Criterio de higiene de proceso: criterio que indica que el funcionamiento aceptable del proceso de producción: este criterio, que no es aplicable a los productos comercializados, establece un valor de contaminación indicativo por encima del cual se requieren medidas correctoras para mantener la higiene del proceso conforme a la legislación alimentaria.

-Cumplimiento de los criterios microbiológicos: la obtención de resultados satisfactorios o aceptables, según lo establecido, al efectuar pruebas comparando con los valores fijados para los criterios, mediante la toma de muestras, la realización de análisis y la aplicación de acciones correctoras, de conformidad con la legislación alimentaria y las instrucciones de la autoridad competente.

Para determinar el criterio de calidad microbiológica que hay que seguir para ofrecer un producto seguro se debe determinar en qué tipo de alimento se encuentra el producto.

La legislación alimentaria española es extensa y se ha consultado para la realización de este trabajo de base bibliográfica. Nos hemos basado en la Recopilación de Normas microbiológicas de los alimentos y asimilados y otros parámetros físico-químicos de interés sanitario actualizada a 1 de enero de 2021 y elaborada desde 1998 hasta la actualidad por Moragas y Valcárcel (2021).

2. Objetivos

El objetivo principal de este Trabajo Final de Grado consiste en determinar el criterio microbiológico de calidad para un nuevo alimento, Tuliva. Para ello, se han seleccionado las categorías en las que se podría clasificar el producto y los distintos parámetros a analizar. Para conseguir cumplir el objetivo principal, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

1. Presentar el nuevo alimento, su composición y proceso de elaboración.
2. Determinar en qué grupo de alimentos se clasifica Tuliva.
3. Describir el criterio microbiológico para garantizar la seguridad alimentaria y detallar los parámetros microbiológicos que se han de analizar y recopilar los métodos normalizados UNE-EN-ISO actualizados para poder realizar correctamente cada análisis, así como los límites permitidos de cada grupo de microorganismos que puedan estar presentes en el producto.

4. Cuantificar el contenido en humedad de Tuliva, y así garantizar una buena práctica de fabricación y de conservación ante una pérdida de valor nutricional y de desarrollo de microorganismos.
5. Recopilar los diferentes actos para la aceptación de Tuliva, mediante los resultados obtenidos en diferentes concursos y la realización de entrevistas para la presentación del producto.

3. Materiales y Métodos

3.1. Composición y Elaboración de Tuliva

Para cumplir el primer objetivo de este trabajo detallamos las materias primas y los equipos y utensilios necesarios para elaborar el producto, así como los pasos necesarios para su elaboración.

Materias primas

- Aceite de Girasol.
- Azúcar.
- Clara de Huevo.
- Esencia de Vainilla.
- Harina de semilla de aceituna.
- Maizena.
- Sirope de Agave.

Equipos

- Amasadora.
- Barquillera.
- Báscula.
- Tamiz.
- Vaso medidor.

Utensilios

- Espátula.
- Molde circular.
- Molde de forma cónica.

Preparación de Tuliva

- Pesar y añadir a la amasadora los ingredientes secos previamente tamizados (Maizena, harina de semilla de aceituna y azúcar) y mezclar.
- Medir y añadir a la mezcla anterior los ingredientes húmedos (aceite de girasol, esencia de vainilla, sirope de agave y clara de huevo), batir hasta conseguir una masa homogénea.
- Introducir la masa en la barquillera previamente precalentada. Dejar cocinar el pétalo 3 minutos aproximadamente.
- Retirar el pétalo de la barquillera, enrollarla en el molde rápidamente para que adquiera la forma que se desea y dejarla enfriar.

3.2. Criterio de calidad microbiológica de Tuliva

En la Recopilación de Normas microbiológicas de los alimentos de Moragas y Valcárcel (2021) se detallan todos los parámetros microbiológicos que habría que valorar en los distintos tipos de alimentos que podemos encontrar, pero Tuliva, al ser un producto nuevo, se puede considerar como un alimento incluido dentro del grupo de galletas simples ya que su composición es muy similar a éstas, y también lo consideramos como productos de aperitivo, ya que es un alimento perfecto para saciar el hambre que nos entra a media mañana o media tarde.

La reglamentación y las normas que se han consultado para determinar cuál es el criterio microbiológico para este nuevo producto ha valorado ambas posibilidades.

Para el caso de las galletas simples, se ha consultado el Real Decreto 1124/1982, incluido en el BOE 4/6/82, en el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración Fabricación, Circulación y Comercio de galletas, y el Real Decreto 135/2010, incluido en el BOE 25/2/10, por el que se derogan disposiciones relativas a los criterios microbiológicos de los productos alimenticios, y en el Real Decreto 176/2013, por el que se derogan total o parcialmente determinadas reglamentaciones técnico-sanitarias y normas de calidad referidas a productos alimenticios.

Para el caso de los productos de aperitivo, se ha consultado el Real Decreto 126/89, incluido en el BOE 8/2/89, en el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y comercialización de patatas fritas y productos de aperitivo, y en el Real Decreto 135/2010, incluido en el BOE 25/2/10, por el que se derogan disposiciones relativas a los criterios microbiológicos de los productos alimenticios.

El criterio microbiológico actualizado únicamente se refiere al análisis de *Listeria monocytogenes*, que se ha de realizar para ambos grupos de alimentos, según el Reglamento (CE) nº 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, y el Reglamento (CE) nº 1441/2007, que modifica al reglamento anteriormente citado, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Aunque el criterio microbiológico para Tuliva, según las reglamentaciones que hemos consultado, solamente valoraría la presencia de *Listeria monocytogenes*, el hecho de mantener en las recopilaciones anuales los parámetros analizados anteriormente, muchos fabricantes quieren seguir analizando todos los parámetros al menos, en el inicio de las elaboraciones para asegurar la calidad microbiológica de sus productos.

Por otro lado, para determinar el procedimiento (Métodos) que emplearemos para analizar los parámetros microbiológicos, los métodos normalizados UNE-EN ISO para la detección y/o recuento de los diferentes microorganismos, éstos se han recopilado mediante la herramienta de la Biblioteca online de la UPV, AENORMás, plataforma que ayuda a encontrar las últimas versiones de las normas mediante palabras clave, que en este caso han sido los propios nombres de los microorganismos y el sector de la alimentación (AENORMás online, UPV Intranet).

En el caso de las galletas simples, consultando el Real Decreto 1124/1982, el Real Decreto 135/2010, el Real Decreto 176/2013, el Reglamento (CE) nº 2073/2005, el Reglamento (CE) nº 1441/2007 y las diferentes normas UNE-EN ISO para cada microorganismo, los parámetros regulados y los valores máximos permitidos son los siguientes:

- Norma UNE-EN ISO 4833-1:2013 para el recuento de aerobios mesófilos. Siendo el límite máximo permitido 10^3 unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de muestra.
- Norma UNE-EN ISO 21528-1:2017 para la detección y el recuento de enterobacterias coliformes. Ausencia.
- Norma UNE-EN ISO 16649-3:2015 para la enumeración de *Escherichia coli*. Ausencia.
- Norma UNE-EN ISO 6888-1:1999 para el recuento de *Staphylococcus aureus*. Ausencia.
- Norma UNE-EN ISO 6579-1:2017 para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella* spp. Ausencia en 25 gramos.
- Norma UNE-EN ISO 21527-2:2008 para el recuento de mohos y levaduras. Siendo el límite máximo permitido 2×10^2 ufc por gramo de producto.
- Norma UNE-EN ISO 7932:2004 para el recuento de *Bacillus cereus* presuntivos. Ausencia.
- Norma UNE-EN ISO 11290-2:2017 para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*, realizando un plan de muestreo de cinco muestras, teniendo en cuenta que ninguna de ellas puede superar las 100 ufc por gramo de producto.

En el caso de los productos de aperitivo, consultando el Real Decreto 126/89, el Real Decreto 135/2010, el Reglamento (CE) nº 2073/2005, el Reglamento (CE) nº 1441/2007 y las diferentes normas UNE-EN ISO para cada microorganismo, los parámetros regulados y los valores máximos permitidos son los siguientes:

- Norma UNE-EN ISO 21528:2018 para la detección de enterobacterias coliformes. Ausencia.
- Norma UNE-EN ISO 6888-1:1999 para el recuento de *Staphylococcus aureus*. Ausencia.
- Norma UNE-EN ISO 6579-1:2017 para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella* spp. Ausencia en 25 gramos.
- Norma UNE-EN ISO 7899-2:2000 para la detección y el recuento de estreptococos fecales, teniendo que el recuento debe ser inferior a 10^2 ufc por gramo de producto.
- Norma UNE-EN ISO 11290-2:2017 para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*, realizando un plan de muestreo de cinco muestras, teniendo en cuenta que ninguna de ellas puede superar las 100 ufc por gramo de producto.

Recopilando la información obtenida, los parámetros que se deberían analizar, al menos al inicio de la producción de Tuliva, serían:

- Norma UNE-EN ISO 4833-1:2013 para el recuento de aerobios mesófilos. Siendo el límite máximo permitido 10^3 unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de muestra.
- Norma UNE-EN ISO 21528-1:2017 para la detección y el recuento de enterobacterias coliformes. Ausencia.
- Norma UNE-EN ISO 16649-3:2015 para la enumeración de *Escherichia coli*. Ausencia.
- Norma UNE-EN ISO 6888-1:1999 para el recuento de *Staphylococcus aureus*. Ausencia.
- Norma UNE-EN ISO 6579-1:2017 para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella* spp. Ausencia en 25 gramos.

- Norma UNE-EN ISO 21527-2:2008 para el recuento de mohos y levaduras. Siendo el límite máximo permitido 2×10^2 ufc por gramo de producto.
- Norma UNE-EN ISO 7932:2004 para el recuento de *Bacillus cereus* presuntivos. Ausencia.
- Norma UNE-EN ISO 7899-2:2000 para la detección y el recuento de estreptococos fecales, teniendo que el recuento debe ser inferior a 10^2 ufc por gramo de producto.
- Norma UNE-EN ISO 11290-2:2017 para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*, realizando un plan de muestreo de cinco muestras, teniendo en cuenta que ninguna de ellas puede superar las 100 ufc por gramo de producto.

3.2.1. Recuento aerobios mesófilos según UNE-EN ISO 4833-1:2013

Para realizar el recuento de microorganismos aerobios mesófilos se emplea el método descrito en la norma UNE-EN ISO 4833-1 de febrero de 2014, referente a la microbiología de la cadena alimentaria, concretamente método horizontal para el recuento de colonias a $30\text{ }^\circ\text{C}$ mediante la técnica de siembra en profundidad.

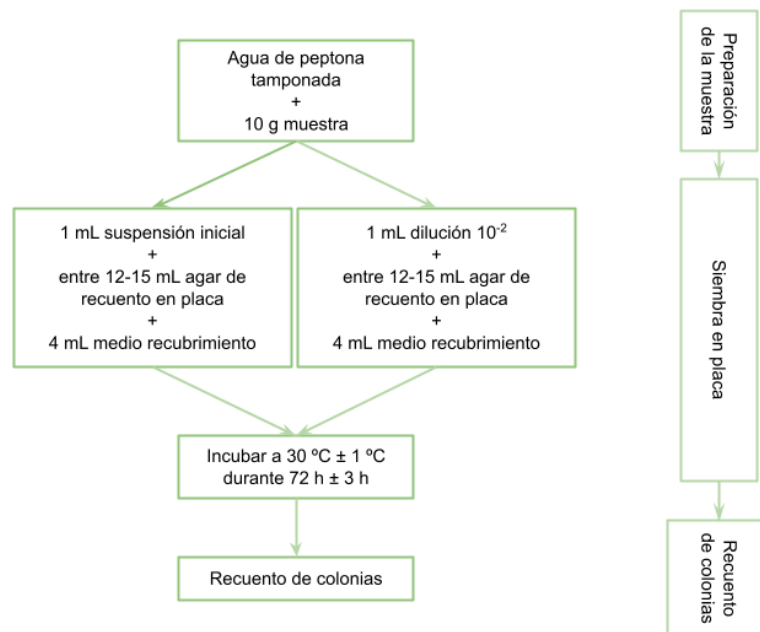


Figura 3. Diagrama del procedimiento para el recuento de aerobios mesófilos (UNE-EN ISO 4833:2014).

Preparación de la muestra

- Pesar 10 gramos de muestra y añadir 90 gramos de APT.
- Llevar a un stomacher durante 1 minuto.

Siembra en placa

- Añadir a dos placas Petri 1 mL de la suspensión obtenida anteriormente con una pipeta graduada.
- Realizar una dilución 10^{-2} de la suspensión inicial e introducir 1 mL de ésta en otra placa Petri.

- Verter en cada placa entre 12 mL y 15 mL de agar PCA, rotar las placas cuidadosamente para mezclar de forma adecuada el inóculo con el medio y dejar solidificar.
- Verter 4 mL de medio de recubrimiento a cada placa para evitar el crecimiento de microorganismos en la superficie del medio.
- Invertir las placas y llevar a incubar durante $72 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Recuento de colonias

-Transcurrido el tiempo de incubación, se realiza el recuento de colonias observando las placas Petri bajo una luz indirecta. Hay que tener en cuenta que las placas han de contener más de 15 pero menos de 300 colonias.

3.2.2. Detección y recuento enterobacterias coliformes según UNE-EN ISO 21528-1:2017

Para realizar la detección y el recuento de enterobacterias coliformes se emplea el método descrito en la norma UNE-EN ISO 21528-1 de marzo de 2018, referente a la microbiología de la cadena alimentaria, concretamente al método horizontal para la detección y el recuento de *Enterobacteriaceae*, donde se realiza la detección de *Enterobacteriaceae*.

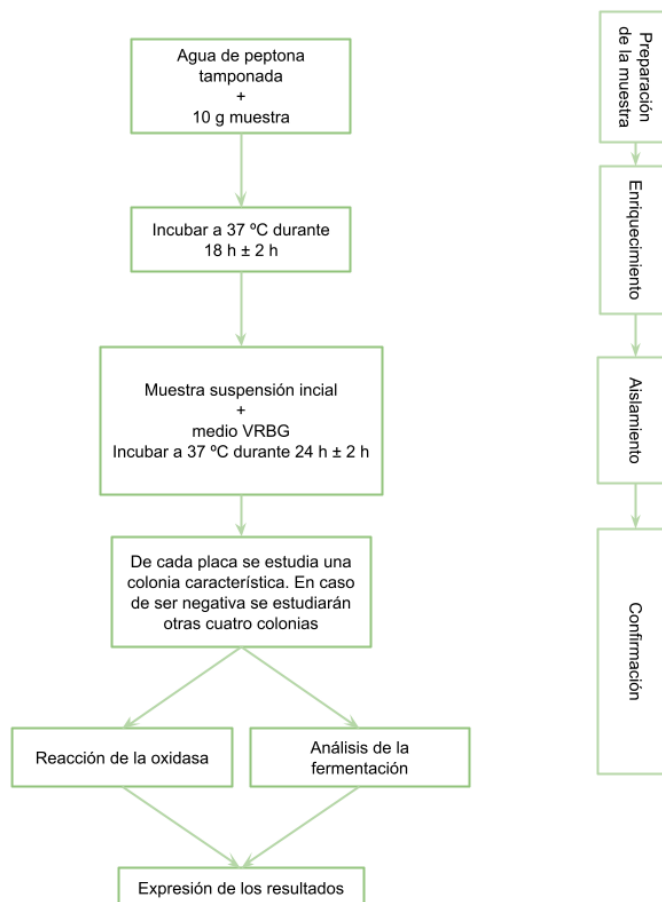


Figura 4. Diagrama del procedimiento para la detección y el recuento de enterobacterias coliformes (UNE-EN ISO 21528-1:2017).

Preparación de la muestra

- Pesar 10 gramos de muestra y añadir 90 gramos de APT.
- Llevar a un stomacher durante 1 minuto.

Enriquecimiento

- La suspensión obtenida anteriormente se lleva a incubar a 37 °C durante 18 h ± 2 h.

Aislamiento

- Empleando un asa de siembra se siembran estrías de la suspensión inicial incubada en una placa Petri con el medio VRBG.
- Se invierten las placas y se llevan a incubar a 37 °C durante 24 h ± 2 h.

Confirmación y subcultivo de las colonias escogidas

- Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionan las colonias de color rosa o púrpura, las cuales pueden tener o no halo de precipitación.
- Las colonias escogidas se siembran en estrías en placas de agar nutritivo.
- Las placas se llevan a incubar a 37 °C durante 24 h ± 2 h.
- Transcurrido el tiempo de incubación se selecciona una colonia bien aislada para realizar los análisis de confirmación bioquímica.

Confirmación bioquímica: reacción de la oxidasa

- La colonia aislada se extiende, empleando un alambre de inoculación, sobre un papel de filtro humedecido en el reactivo de oxidasa.
- Se observan los cambios que se puedan producir en el papel de filtro.

Confirmación bioquímica: análisis de la fermentación

- Las colonias aisladas que resultan negativas en la reacción de la oxidasa se inoculan utilizando un alambre de inoculación en tubos con medio de glucosa.
- Se recubre la superficie del medio con aceite mineral estéril hasta una altura de 1 cm como mínimo.
- Se lleva a incubar a 37 °C durante 24 h ± 2 h.
- Transcurrido el tiempo de incubación se observan los cambios producidos en el tubo.

3.2.3. Enumeración de *Escherichia coli* según UNE-EN ISO 16649-3:2015

Para realizar la enumeración de *Escherichia coli* se emplea el método descrito en la norma UNE-EN ISO 16649-3 de diciembre de 2017, referente a la microbiología de la cadena alimentaria, concretamente método horizontal para la enumeración de *Escherichia coli* beta-glucoronidasa positiva. Parte 3: Detección y técnica del número más probable utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indol beta-D-glucoronato. En este caso, se va a emplear el método para la detección.

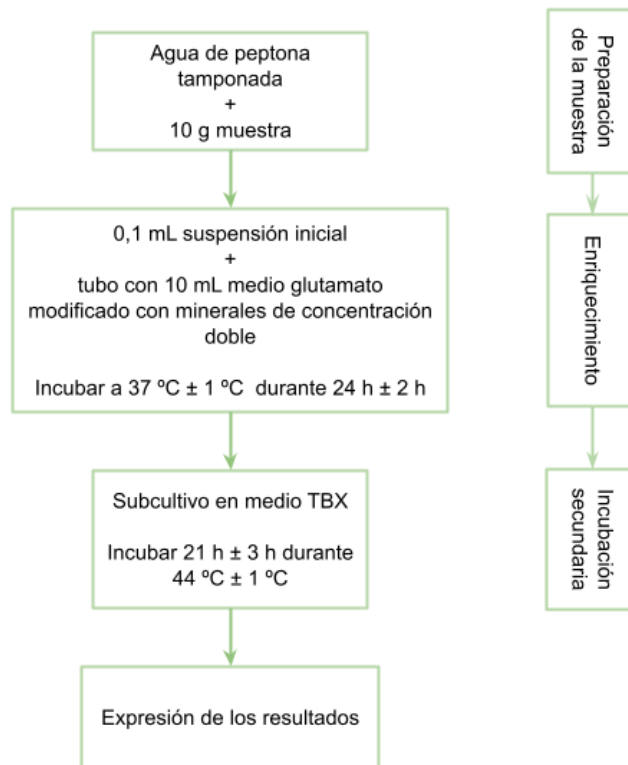


Figura 10. Diagrama del procedimiento para la enumeración de *Escherichia coli* (UNE-EN ISO 16649-3:2015).

Preparación de la muestra

- Pesar 10 gramos de muestra y añadir 90 gramos de APT.
- Llevar a un stomacher durante 1 minuto.

Enriquecimiento

- Añadir 10 mL de la suspensión obtenida antes a tres tubos de 10 mL con media glutamato modificado con minerales de concentración doble.
- Los tubos se llevan a incubar a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Incubación secundaria

- Tras la incubación se seleccionan aquellos tubos en los que haya aparecido una coloración amarilla debido a la presencia de ácido.
- Se cultivan empleando un asa de siembra en estrías en una placa con agar TBX.
- Las placas se llevan a incubar durante $21\text{ h} \pm 3\text{ h}$ a $44\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.
- Tras la incubación se observan las placas.

Examen de placas

- Transcurrido el tiempo de incubación, se observan las placas en búsqueda de presencia de colonias con sombra de color azul claro, oscuro o verdeazulado.

3.2.4. Recuento *Staphylococcus aureus* según UNE-EN ISO 6888-1:1999

Para realizar el recuento de *Staphylococcus aureus* se emplea el método descrito en la norma UNE-EN ISO 6888 de abril de 2019, referente a la microbiología de los alimentos para consumo humano y animal, concretamente método horizontal para el recuento de estafilococos coagulasa-positivos (*Staphylococcus aureus* y otras especies). Parte 1: Técnica que utiliza el medio agar de Baird-Parker.

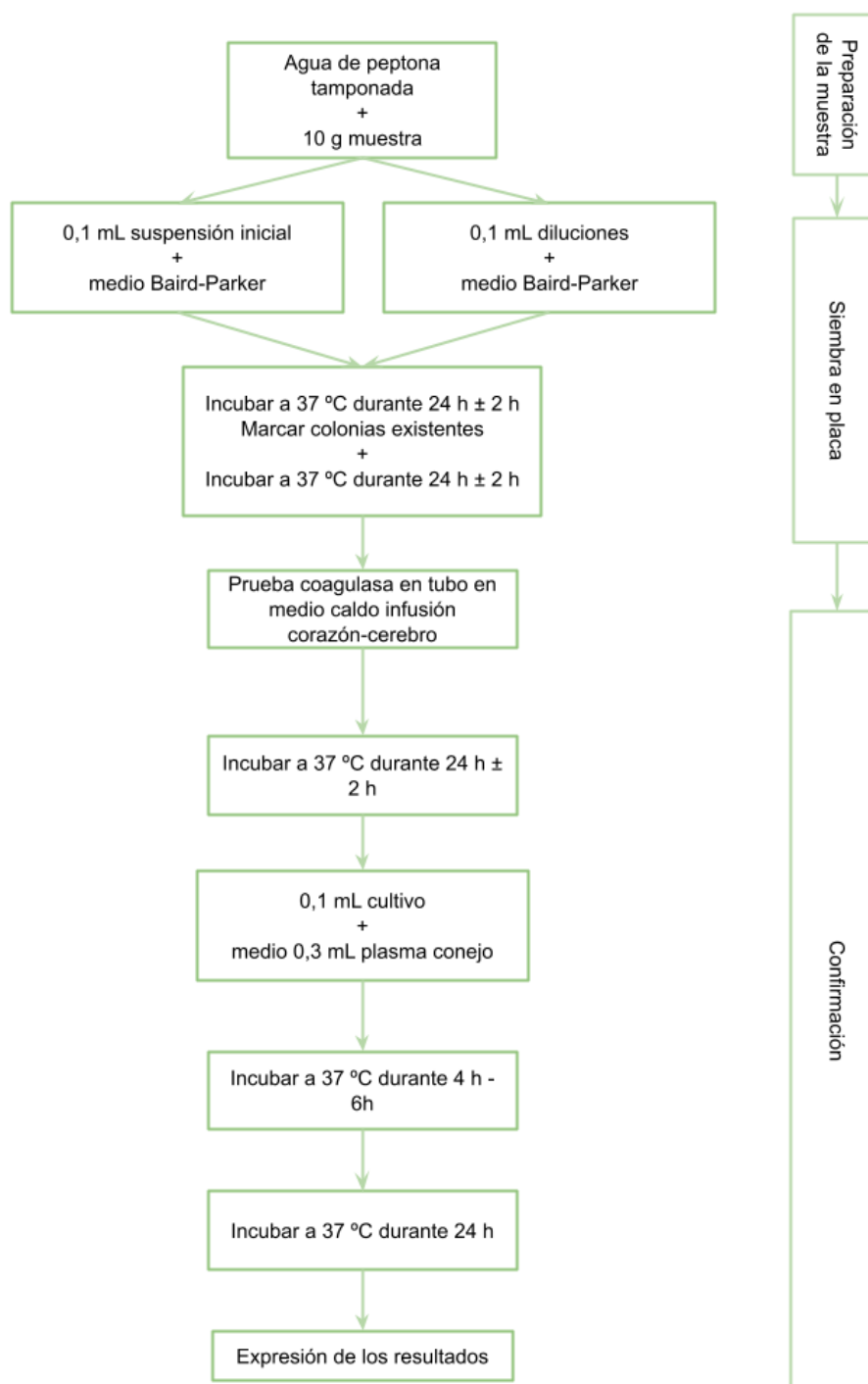


Figura 6. Diagrama del procedimiento para el recuento de *Staphylococcus aureus* (UNE-EN ISO 6888-1:1999).

Preparación de la muestra

- Pesar 10 gramos de muestra y añadir 90 gramos de APT.
- Llevar a un stomacher durante 1 minuto.

Siembra en placa

- Realizar dos diluciones decimales de la suspensión inicial obtenida anteriormente.
- Se toma 0,1 mL de la suspensión inicial y 0,1 mL de las diluciones que hemos realizado, empleando pipeteas estériles para cada dilución se distribuye el volumen en placas Petri de Baird-Parker, y se extiende con asa de plástico estéril.
- Se deja secar el inóculo durante 15 minutos y se llevan a incubar durante 24 h \pm 2h a 37 °C.
- Tras esta primera incubación se marcan las colonias características presentes.
- Se lleva a incubar por segunda vez durante otras 24 h \pm 2 h.

Confirmación *Staphylococcus aureus*: prueba de coagulasa en tubo

- Se toma una colonia característica empleando un asa de siembra estéril y se transfiere a un tubo con caldo de infusión corazón-cerebro.
- Se lleva a incubar a 37 °C durante 24 h \pm 2 h.
- Tras la incubación se toma 0,1 mL de cada cultivo y se añade a 0,3 mL de plasma de conejo.
- Se lleva a incubar a 37 °C, se realiza una primera observación de los tubos pasadas las 4 h – 6 h, en caso de ser negativo se vuelve a observar después de 24 h de incubación.
- Transcurrido el tiempo de incubación se observan los cambios producidos o no en los tubos.
- Paralelamente se realiza un control añadiendo 0,1 mL de caldo infusión corazón-cerebro estéril en 0,3 mL plasma conejo, se lleva a incubar a 37 °C durante 4 h – 6 h y se confirma la no aparición de coagulo en el tubo.

3.2.5. Detección, enumeración y serotipado *Salmonella* spp. según UNE-EN ISO 6579-1:2017

Para realizar la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella* spp. se emplea el método descrito en la norma UNE-EN ISO 6579 de julio de 2017, referente a la microbiología de la cadena alimentaria, concretamente el método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella*. Parte 1: Detección de *Salmonella* spp.

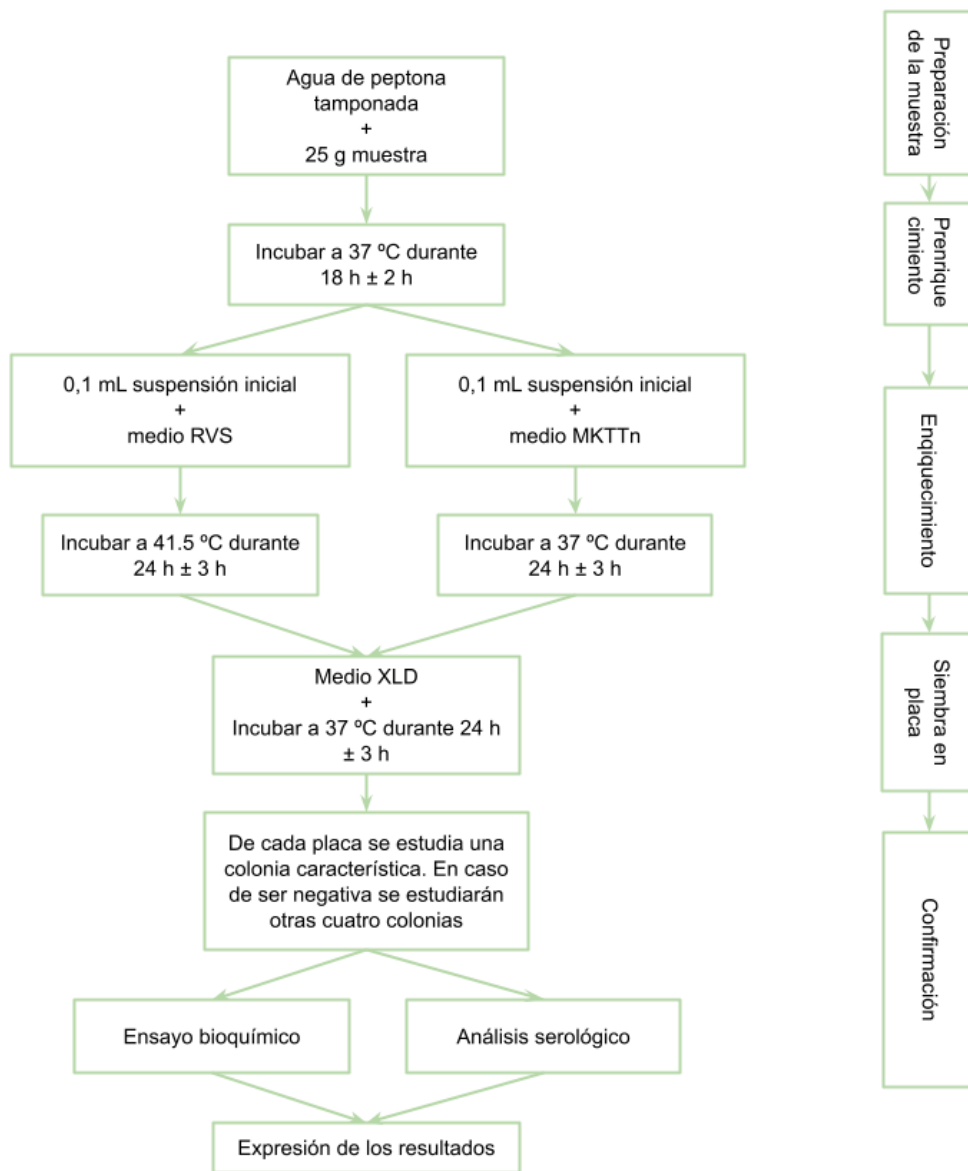


Figura 7. Diagrama del procedimiento para la detección, enumeración y serotipado de *Salmonella* spp. (UNE-EN ISO 6579-1:2017).

Preparación de la muestra

- Pesar 25 gramos de muestra y añadir 225 mL de APT.
- Llevar a un stomacher durante 1 minuto.

Preenriquecimiento

- La suspensión obtenida anteriormente se incuba a 37 °C durante 18 h ± 2 h.

Enriquecimiento

- Se transfiere 0,1 mL del preenriquecimiento en un tubo con 10 mL del medio RVS.
- Se incuba a 41,5 °C durante 24 h ± 3 h.

-De forma paralela se transfieren 0,1 mL del preenriquecimiento a un tubo con 10 mL del medio MKTTn.

-Se incuba a 37 °C durante 24 h ± 3 h.

Siembra en placa

-Empleando un asa de siembra se inocula el cultivo que se ha obtenido en el medio RVS sobre la superficie de una placa XLD.

-Se repite el procedimiento para el cultivo obtenido en el medio MKTTn.

-Se invierten las placas XLD y se llevan a incubar a 37 °C durante 24 h ± 3 h.

Confirmación

-Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionan las colonias sospechosas.

-En el medio XLD las colonias tienen una zona central negra y una zona ligeramente transparente de color rojo.

-A las colonias sospechosas se les van a realizar ensayos bioquímicos y análisis serológicos para confirmar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp.

Ensayo bioquímico: Agar TSI

-Se siembran las colonias sospechosas de ambos medios en la superficie de un agar inclinado en estrías y se inocula el fondo del agar introduciendo el asa de siembra en el interior del agar.

-Se lleva a incubar a 37 °C durante 24 h ± 3 h.

Ensayo bioquímico: Agar de urea

-Se siembran las colonias sospechosas de ambos medios en la superficie de un agar inclinado en estrías.

-Se lleva a incubar a 37 °C hasta 24 h.

Ensayo bioquímico: medio LDC

-Se inoculan las colonias sospechosas de ambos medios por debajo de la superficie del medio líquido.

-Se lleva a incubar a 37 °C durante 24 h ± 3 h.

Análisis serológicos: eliminación de las cepas auto-aglutinantes

-Se dispersa parte de la colonia sospechosa obtenida de los medios sobre una gota de disolución salina en un portaobjetos.

-Se dispersa durante 5 s a 60 s hasta obtener una suspensión turbia y homogénea.

Análisis serológicos: examen de los antígenos-O

-Se realiza el mismo procedimiento que en el análisis anterior, pero dispersando la colonia sobre suero anti-O polivalente.

Análisis serológicos: examen de los antígenos-H

-Se realiza el mismo procedimiento que los dos análisis anteriores, pero dispersando la colonia sobre suero anti-H polivalente.

3.2.6. Recuento mohos y levaduras según UNE-EN ISO 21527-2:2008

Para realizar el recuento de mohos y levaduras se emplea el método descrito en la norma UNE-EN ISO 21527-2 de julio de 2008, referente a la microbiología de alimentos y piensos, concretamente el método horizontal para el recuento de levaduras y mohos. Parte 2: Técnica de recuento de colonias en productos con actividad de agua inferior o igual a 0,95.

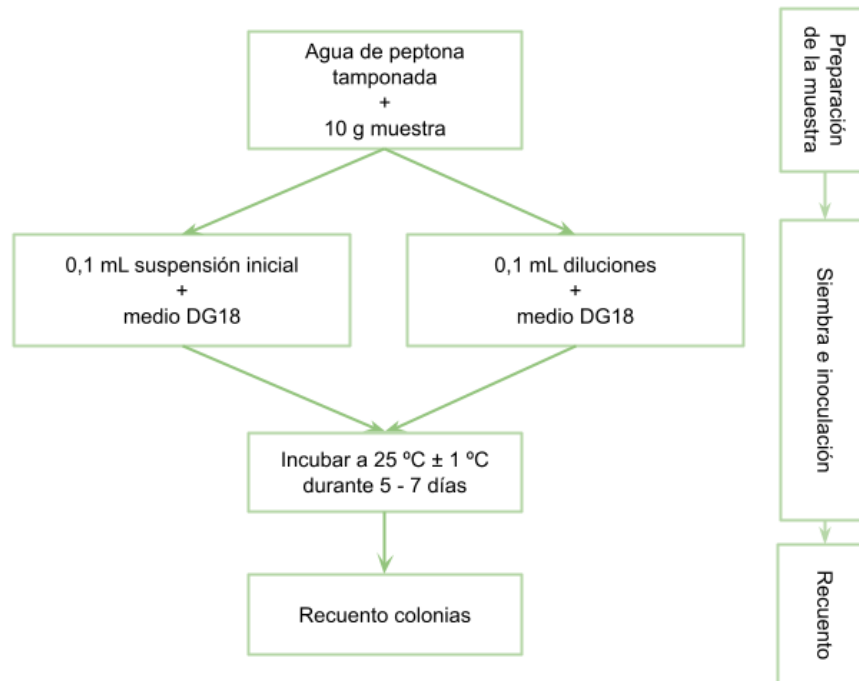


Figura 8. Diagrama del procedimiento para el recuento de mohos y levaduras (UNE-EN ISO 21527-2:2008).

Preparación de la muestra

- Pesar 10 gramos de muestra y añadir 90 gramos de APT.
- Llevar a un stomacher durante 1 minuto.

Siembra e inoculación

- Se transfiere 0,1 mL de la suspensión inicial a una placa con Agar DG18.
- Se realiza una dilución 10^{-2} de la suspensión inicial y se introduce 0,1 mL de ésta en otra placa Petri.
- Se incuban las placas Petri de forma aerobia boca arriba a $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante entre 5 y 7 días.

Recuento colonias

- Transcurrido el tiempo de incubación, se seleccionan las placas que tengan menos de 150 colonias.

3.2.7. Recuento *Bacillus cereus* presuntivos según UNE-EN ISO 7932:2004

Para realizar el recuento de *Bacillus cereus* se emplea el método descrito en la norma UNE-EN ISO 7932 de septiembre de 2005, referente a la microbiología de los alimentos para consumo humano y animal, concretamente método horizontal para el recuento de *Bacillus cereus* presuntivos. Empleando la técnica de recuento de colonias a 30 °C.

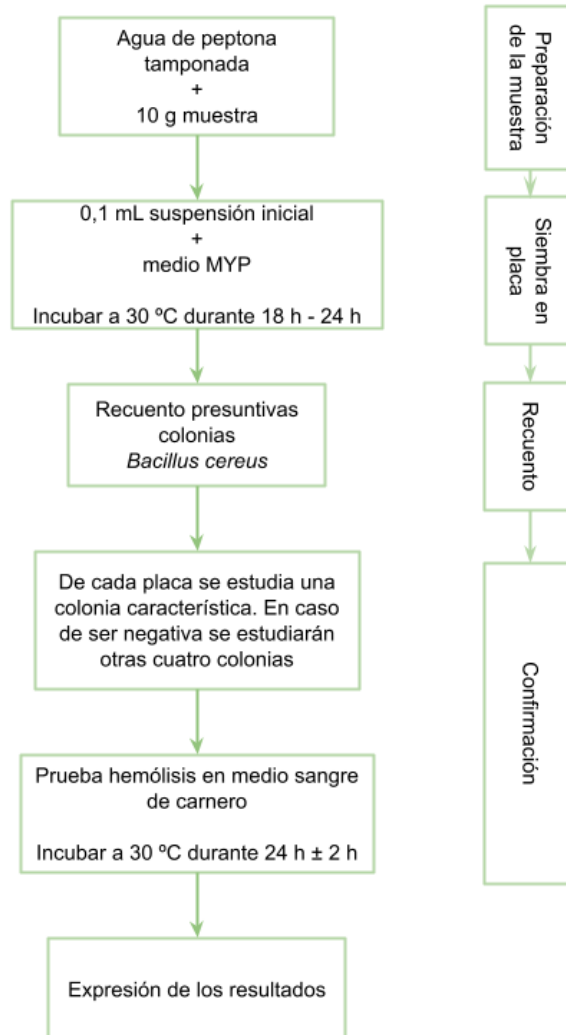


Figura 9. Diagrama del procedimiento para el recuento de *Bacillus cereus* (UNE-EN ISO 7932:2004).

Preparación de la muestra

- Pesar 10 gramos de muestra y añadir 90 gramos de APT.
- Llevar a un stomacher durante 1 minuto.

Siembra en placa

- Empleando una pipeta estéril se transfieren a la superficie de dos placas con agar MYP, 0,1 mL de la suspensión que hemos obtenido anteriormente.
- Se extiende el inóculo con un asa estéril de plástico y se deja secar.
- Se llevan las placas invertidas a incubar a 30 °C entre 18 h y 24 h.

Recuento de colonias

-Transcurrido el tiempo de incubación, se realiza el recuento de colonias observando las placas Petri bajo una luz indirecta. Hay que tener en cuenta que las placas han de contener más de 15 pero menos de 300 colonias.

Confirmación: Prueba hemólisis en agar sangre de carnero

-Transcurrido el tiempo de incubación se seleccionan cinco colonias de cada placa de color rosa bien aisladas.

-Las colonias escogidas se siembran por estrías en la superficie de agar sangre de carnero.

-Las placas se llevan a incubar a 30 °C durante 24 h ± 2 h.

-Transcurrido el tiempo de incubación se selecciona una colonia bien aislada para realizar los análisis de confirmación bioquímica.

3.2.8. Detección y recuento estreptococos intestinales según UNE-EN ISO 7899-2:2000

Para realizar la detección y el recuento de enterococos intestinales se emplea el método descrito en la norma UNE-EN ISO 7899-2 de mayo de 2001, referente a la calidad del agua, concretamente a la detección y el recuento de enterococos intestinales. Parte 2: Método de filtración en membrana.

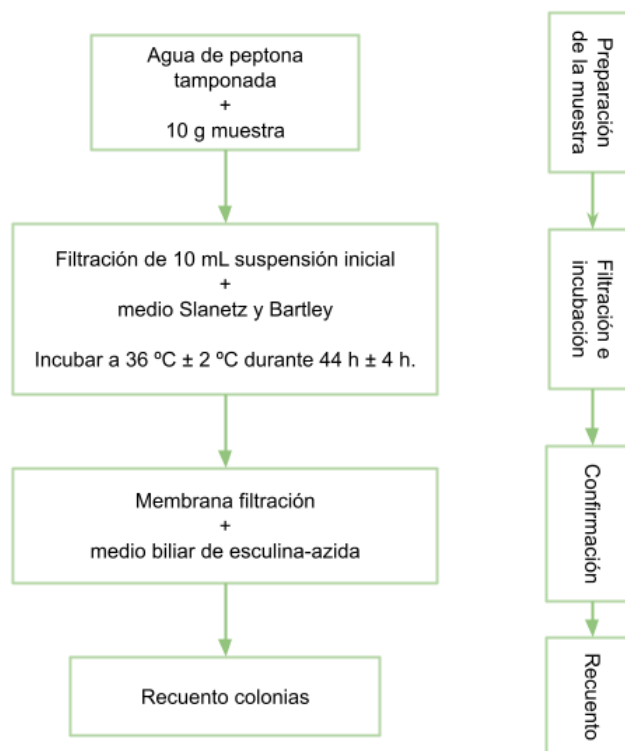


Figura 11. Diagrama del procedimiento para la detección y el recuento de estreptococos intestinales (UNE-EN ISO 7899-2:2000).

Preparación de la muestra

- Pesar 10 gramos de muestra y añadir 90 gramos de APT.
- Llevar a un stomacher durante 1 minuto.

Filtración e incubación

- Se toman 10 mL de la suspensión obtenida en la preparación de la muestra y filtra a través de un filtro de membrana.
- El filtro se lleva al medio Slanetz y Bartley y se lleva a incubar las placas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$.

Confirmación: Agar biliar de esculina-azida

- Transcurrido el tiempo de incubación, se observan si las colonias muestran color rojo, marrón o rosa en el centro o por toda la colonia.
- En caso afirmativo, se transfiere la membrana, sin invertirla, en una placa con agar biliar de esculina-azida.
- Se llevan a incubar las placas a $44\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 h.

Recuento de colonias

- Tras la incubación se lee la placa inmediatamente, considerando que las colonias sospechosas de enterococos intestinales tienen un color entre marrón y negro, y alrededor de las colonias se muestra reacción positiva.

3.2.9. Detección y recuento *Listeria monocytogenes* según UNE-EN ISO 11290-2:2017

Para realizar la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* se emplea el método descrito en la norma UNE-EN ISO 11290-2 de enero de 2018, referente a la microbiología de la cadena alimentaria, concretamente método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria* spp. Parte 2: Método de recuento.

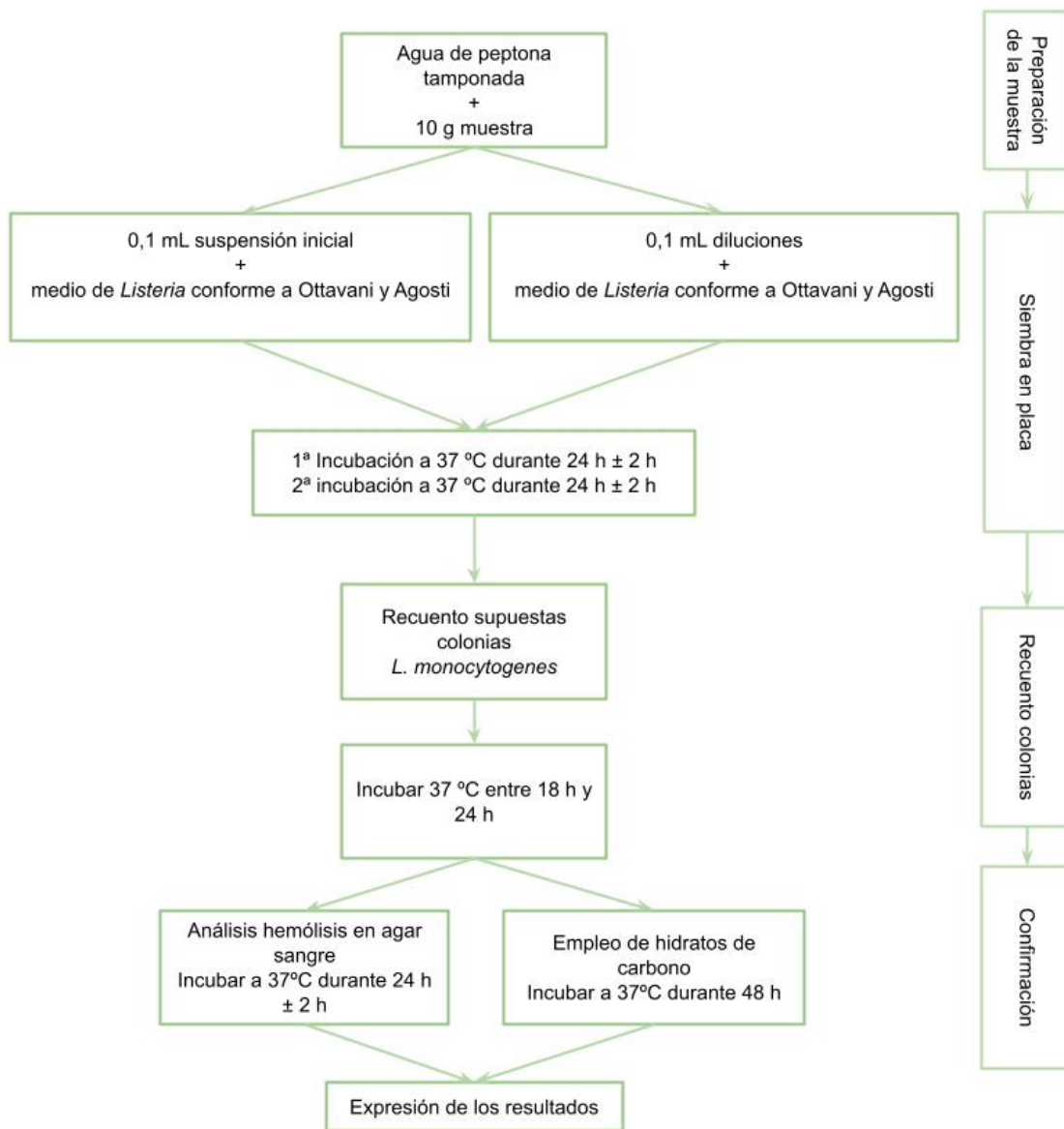


Figura 5. Diagrama del procedimiento para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* (UNE-EN ISO 11290-2:2017).

Preparación de la muestra

- Pesar 10 gramos de muestra y añadir 90 gramos de APT.
- Llevar a un stomacher durante 1 minuto.

Siembra en placa

- Realizar cuatro diluciones decimales de la suspensión inicial obtenida anteriormente.
- Se toma 0,1 mL de la suspensión inicial y 0,1 mL de las diferentes diluciones que hemos realizado, empleando pipeteas estériles para cada dilución se distribuye el volumen en placas Petri de Agar de *Listeria* conforme a Ottavani y Agosti, y se extiende con asa de plástico estéril.

-Se deja secar el inóculo durante 15 minutos, se invierten las placas y se llevan a incubar durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, seguida de una segunda incubación adicional a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante otras $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

Enumeración de colonias características

-Se cuentan las colonias sospechosas de todas las placas Petri que contengan menos de 150 colonias características de *L. monocytogenes*.

Confirmación de *Listeria monocytogenes*

-Se seleccionan cinco colonias sospechosas de *L. monocytogenes* de cada placa Petri que representa cada dilución y se siembran en estrías sobre placas de agar nutritivo.

-Se lleva a incubar las placas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ entre 18 h y 24 h.

Confirmación: análisis de hemólisis en agar sangre

-Transcurrido el tiempo de incubación se selecciona una colonia de la placa de agar nutritivo y se inocular en una parte del agar sangre. En la misma placa se inoculan cultivos positivos y negativos de *L. monocytogenes*.

-Se llevan a incubar las placas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

-Transcurrido el tiempo de incubación se observan las cepas de análisis.

Confirmación: empleo de hidratos de carbono

-Transcurrido el tiempo de incubación se inoculan los medios de utilización de hidratos de carbono junto con los cultivos obtenidos en el medio de agar nutritivo empleando un asa de siembra en tubos que contengan por un lado L-ramnosa y, por otro lado, D-Xilosa.

-Se lleva a incubar a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h.

-Una vez ha transcurrido el tiempo de incubación se observan los cambios producidos o no en los tubos.

3.3. Análisis de la humedad según el método de secado a vacío

Materiales y equipos

-Estufa secado a vacío a $70 \text{ }^\circ\text{C}$.

-Balanza analítica.

-Cápsula de vidrio.

-Arena de mar.

-Varilla de vidrio.

Procedimiento

-Se pesa la cápsula de vidrio junto con la varilla de vidrio y unos 30 g de arena de mar para obtener la masa inicial (m_0).

-Se pesan 5-10 g de muestra triturada junto con la cápsula, la varilla y la arena y se mezcla todo.

-Se vuelve a pesar todo el conjunto para obtener m_1 .

-Se introduce la cápsula junto con todo lo anteriormente citado en una estufa a vacío a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ entre 3 h y 6 h.

- Transcurrido el tiempo se saca la cápsula y se introduce en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente. Una vez alcanzada se pesa para obtener m_2 .
- Se repite el procedimiento de introducir en la estufa hasta que dos pesadas salgan el mismo valor (GARCÍA et al., 2012).

4. Resultados y discusión

4.1. Clasificación y Criterio de calidad microbiológica de Tuliva

4.1.1. Recuento aerobios mesófilos según UNE-EN ISO 4833-1:2013

Una vez realizado el recuento de colonias de las placas Petri, teniendo en cuenta que estas deben tener más de 15 pero menos de 300 colonias, hemos de expresar los datos obtenidos para ello, vamos a emplear el método descrito en la norma UNE-EN ISO 7218 de febrero de 2008, en el que se describen los requisitos generales y las guías para el examen microbiológico de los alimentos para el consumo humano y para la alimentación animal.

Para calcular el número de microorganismos vamos a emplear la ecuación 1;

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

Siendo:

- $\sum C$ la suma total de las colonias en ambas placas.
- V el volumen inoculado que hemos empleado en cada placa (en mililitro).
- d la dilución que corresponde a la primera dilución escogida.

Una vez calculado el resultado se ha de redondear a dos cifras significativas (preferiblemente un número entre 1,0 y 9,9) multiplicado por la potencia de 10 apropiada, en el caso de que la tercera cifra sea inferior a 5, no se modifica la cifra anterior, y en el caso de que sea mayor o igual a 5, la cifra anterior se incrementa una unidad.

El resultado se expresará como el número de microorganismos N por gramo.

Empleando como referencia el R.D. 1124/1982, referente a la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración Fabricación, Circulación y Comercio de galletas, se indica que el contenido de aerobios mesófilos no puede superar las 10^3 ufc/g de muestra. Por ello, valores por encima pueden indicar una incorrecta manipulación durante los procesos de elaboración del producto, una contaminación de una o varias materias primas, una posible existencia de patógenos y/o una alteración del alimento (Food News Latam, 2015).

4.1.2. Detección y recuento enterobacterias coliformes según UNE-EN ISO 21528-1:2017

Una vez se han realizado los dos análisis bioquímicos que se describen en la norma UNE-EN ISO 21528-1:2017, se expresan los resultados.

Reacción oxidasa

Tras extender la colonia sobre el papel de filtro humedecido en el reactivo oxidasa se observan si dicho papel adquiere una coloración púrpura en aproximadamente 10 s, en caso de eso suceda se considera que el análisis ha dado positivo en presencia de enterobacterias coliformes.

Análisis de fermentación

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se observan los tubos, si aparece una coloración amarillenta a lo largo del tubo, se considera que el análisis de fermentación es positivo y, por tanto, hay presencia de enterobacterias coliformes en la muestra.

Empleando como referencia el R.D. 1124/1982, referente a la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración Fabricación, Circulación y Comercio de galletas y el R.D. 126/1989, referente a la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración Fabricación, Circulación y Comercialización de patatas fritas y productos de aperitivo, se indica que en estos alimentos debe haber ausencia de enterobacterias coliformes.

4.1.3. Enumeración de *Escherichia coli* según UNE-EN ISO 16649-3:2015

Una vez transcurrido el tiempo de incubación y habiendo observado las placas, se considera que el resultado de presencia de *E. coli* es positivo cuando en las placas encontramos colonias azules o verdeazuladas.

Empleando como referencia el R.D. 1124/1982, referente a la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración Fabricación, Circulación y Comercio de galletas, se indica que debe haber ausencia de *Escherichia coli*.

4.1.4. Recuento *Staphylococcus aureus* según UNE-EN ISO 6888-1:1999

Una vez realizada la prueba de confirmación para *Staphylococcus aureus* descrita en la norma UNE-EN ISO 6888-1:2000, se expresan los resultados.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, si al observar los tubos si en ellos aparece un coágulo que ocupa un volumen superior a la mitad del volumen original que ocupaba el líquido se considera positivo.

Empleando como referencia el R.D. 1124/1982, referente a la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración Fabricación, Circulación y Comercio de galletas y el R.D. 126/1989, referente a la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración Fabricación, Circulación y Comercialización de patatas fritas y productos de aperitivo, se indica que en estos alimentos debe haber completa ausencia de *Staphylococcus aureus*.

Una presencia de *S. aureus* en alimentos nos puede indicar que el alimento no ha sido cocinado de forma adecuada y que, por tanto, puede estar contaminado con toxinas producidas por el microorganismo, las cuales son muy difíciles de eliminar y producen toxiinfecciones (ELIKA, 2021).

4.1.5. Detección, enumeración y serotipado *Salmonella* spp. según UNE-EN ISO 6579-1:2017

Una vez se han realizado los diferentes análisis para determinar la confirmación de *Salmonella* que se describen en la norma UNE-EN ISO 6579-1:2017, se expresan los resultados:

Agar TSI

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se observa la superficie y el fondo de la placa. En la mayoría de los cultivos de *Salmonella*, la superficie inclinada es de color rojizo, el fondo de la placa es de color amarillo y se puede observar la formación de gas y de sulfuro de hidrógeno el cual ennegrece el agar.

Agar de urea

Se considera que la prueba es positiva cuando se observa un cambio de color de rojo a rosáceo y posteriormente a color cereza debido a la hidrólisis de la urea liberando amoníaco.

Medio LDC

Se considera que la prueba es positiva cuando el medio líquido se encuentra enturbiado y de color púrpura. En el caso de que el medio líquido cambiara a color amarillo la prueba sería negativa.

Eliminación de las cepas auto-aglutinantes

Se considera que la prueba es positiva si tras haber dispersado la colonia sobre el suero se forman gránulos en la suspensión debido a la auto-aglutinación.

Examen antígeno-O y examen antígenos-H

Se considera que las pruebas son positivas si tras haber dispersado la colonia sobre el suero se observa aglutinación.

Se consideran que las cepas son *Salmonella* si las reacciones bioquímicas son las típicas, no se ha producido auto-aglutinación y las pruebas de antígenos-O y -H son positivas.

Empleando como referencia el R.D. 1124/1982, referente a la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración Fabricación, Circulación y Comercio de galletas y el R.D. 126/1989, referente a la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración Fabricación, Circulación y Comercialización de patatas fritas y productos de aperitivo, se indica que en estos alimentos debe haber completa ausencia de *Salmonella* spp. por cada 25 g de producto.

4.1.6. Recuento mohos y levaduras según UNE-EN ISO 21527-2:2008

Una vez se ha realizado el recuento de colonias de mohos y levaduras, descrito en la norma UNE-EN ISO 21527-2:2008, se expresan los resultados empleando el mismo método descrito en el apartado 4.1.1.

Empleando como referencia el R.D. 1124/1982, referente a la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración Fabricación, Circulación y Comercio de galletas, se indica que el contenido de mohos y levaduras no puede superar las 2×10^2 ufc/g de muestra.

4.1.7. Recuento *Bacillus cereus* presuntivos según UNE-EN ISO 7932:2004

Una vez se ha realizado el recuento en placa de colonias y el análisis de confirmación descrito en la norma UNE-EN ISO 7932:2004, se expresan los resultados:

Recuento en placa

Las colonias características de *Bacillus cereus* son grandes, de color rosa y rodeadas por una zona de precipitación. Se expresan los resultados mediante el mismo método descrito en el apartado 4.1.1.

Prueba hemólisis en agar sangre de cabra

Se considera que la prueba de confirmación ha sido positiva si se produce una zona de hemólisis alrededor de la zona de inoculación.

Si ambas pruebas son positivas se confirma que en la muestra encontramos *Bacillus cereus* presuntivo.

Empleando como referencia el R.D. 1124/1982, referente a la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración Fabricación, Circulación y Comercio de galletas, se indica que debe haber completa ausencia de *Bacillus cereus*.

4.1.8. Detección y recuento estreptococos intestinales según UNE-EN ISO 7899-2:2000

Una vez se ha realizado el recuento de colonias de mohos y levaduras, descrito en la norma UNE-EN ISO 7899-2:2001, se expresan los resultados empleando el mismo método descrito en el apartado 4.1.1.

Empleando como referencia el R.D. 126/1989, referente a la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración Fabricación, Circulación y Comercialización de patatas fritas y productos de aperitivo, se indica que el contenido en estreptococos fecales no puede superar las 10^2 ufc por gramo de muestra.

4.1.9. Detección y recuento *Listeria monocytogenes* según UNE-EN ISO 11290-2:2017

Una vez se han realizado los tres análisis que confirman *Listeria monocytogenes* descritos en la norma UNE-EN ISO 11290-2:2018, se expresan los resultados.

Análisis de hemólisis en agar de sangre

En el caso de que aparezcan zonas estrechas, claras y limpias alrededor de la zona de inoculación determina que se trata de *L. monocytogenes*, si no apareciera ninguna zona clara alrededor se trata de *L. innocua*.

Empleo de hidratos de carbono

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se observan los tubos, si estos han adquirido un color amarillo, se debe a que se ha generado ácido y por tanto la reacción ha sido positiva.

Para la *L. monocytogenes* se ha determinado que el análisis de L-ramnosa es positivo, mientras que el análisis de D-xilosa es negativo.

Enumeración de colonias

Una vez se ha determinado con los análisis que las supuestas colonias eran realmente colonias de *L. monocytogenes*, se han de expresar los resultados del recuento de colonias sobre las placas Petri. Las colonias características son de color verde azulado rodeadas por un halo opaco.

Para expresar los resultados vamos a emplear el mismo método descrito en el apartado 4.1.1.

Empleando como referencia el Reglamento (CE) nº 2073/2005 y el Reglamento (CE) nº 1441/2007, ambos relativos a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

El contenido en *Listeria monocytogenes* no puede superar las 100 ufc/g de muestra, unos niveles superiores a estos pueden infectar al consumidor provocando listeriosis, enfermedad producida por *Listeria monocytogenes*, que puede provocar abortos espontáneos en mujeres embarazadas, meningitis, septicemias entre otros síntomas (MUÑOZ et al., 2011).

4.2. Determinación humedad según método de secado a vacío

Para calcular la humedad de un alimento se calcula por diferencia de peso, empleando la ecuación:

$$\% \text{ Humedad (g agua / 100 g muestra)} = \frac{m1 - m2}{m1 - m0} \times 100$$

Empleando como referencia el R.D. 1124/1982, referente a la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración Fabricación, Circulación y Comercio de galletas, la humedad no debe exceder los 6 g de agua/100 g muestra. Por otro lado, empleando el R.D. 126/1989, referente a la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración Fabricación, Circulación y Comercialización de patatas fritas y productos de aperitivo, se indica que en este tipo de alimento no se pueden superar el 5 % de humedad.

Por tanto, se determina que el producto no puede superar una humedad superior al 5%.

4.3. Aceptación de un nuevo producto: Tuliva

Tuliva fue seleccionado como finalista para los Premios de Ecotrophelia de España en el año 2020 por la Federación Española de Industria de Alimentación y Bebidas (FIAB). En Ecotrophelia se presentó Tuliva con distintos acompañamientos, tanto dulces como salados, como es el hummus de garbanzos o la crema catalana, para así demostrar su gran versatilidad como envase comestible.



Figura 12. Ejemplos de Tuliva con diferentes acompañamientos.

Gracias a ser un producto apto para vegetarianos, celíacos e intolerantes a la lactosa, además de ser innovador por la introducción de una harina hecha a partir de un residuo de la industria aceitera, el equipo Cruixents consiguió ser subcampeón en Ecotrophelia.



Figura 13. Entrega de premios Ecotrophelia 2020.

A raíz del premio conseguido en el concurso, el equipo Cruixents se presentó a StartUPV, que se trata de un programa que favorece la creación de startups por alumnos y graduados de la UPV, para ir un paso más allá e intentar emprender con Cruixents. En este concursó Tuliva se presentó en la modalidad de premios idea, donde consiguió uno de los terceros premios en la categoría de proyecto empresarial, categoría donde participan aquellas ideas de negocio que cuentan con un desarrollo bastante avanzado. (IdeasUPV, 2021).

Debido a conseguir ser subcampeonas de Ecotrophelia, el grupo Cruixents tuvo la oportunidad de realizar diferentes entrevistas en diversos blogs dedicados a la alimentación e incluso en un programa de radio. A continuación, se muestran algunas de las entrevistas realizadas:

Entrevista en el blog Información gastronómica, el saber del sabor



Figura 14. Entrevista en Informaciongastronomica.com <<https://informaciongastronomica.com/tuliva-emplatados-originales-y-con-sello-km-0/>>.

Entrevista en el blog EAMN (escuela agraria y del medio natural)

Equipo Cruixents: «La innovación es evolución y la evolución es necesaria en la sociedad»

12 MAYO, 2020 / MJOFALLA

El equipo **Cruixents**, formado por las estudiantes de nuestra Escuela, María Cabrera, Lucía Cano, Laura Junco, Marta Maravilla y María Rovira, ha sido seleccionado por la **Federación Española de Industrias de Alimentación y Bebidas (FIAB)** para participar en el certamen **Ecotrophelia España 2020**.

Figura 15. Entrevista en EAMN de la UPV <<https://eamn.blogs.upv.es/2020/05/12/equipo-cruixents-la-innovacion-es-evolucion-y-la-evolucion-es-necesaria-en-la-sociedad/>>.

Entrevista en la radio en El forcat de Silvia

Por CV Ràdio > EL FORCAT DE SILVIA

15/09/2020- Tuliva, un premio que se come

18/09/2020 | 19 | 0 | 0

Ciencia y naturaleza

REPRODUCIR SUSCRIBIRSE

00:00 13:51

Figura 16. Entrevista en CV Radio, en el programa El forcat de Silvia <https://www.ivoox.com/15-09-2020-tuliva-premio-se-come-audios-mp3_rf_56720384_1.html>.

Entrevista en Adeoliva

Tuliva, innovador alimento creado con harina de hueso de aceituna

Nace **TULIVA**, un alimento hecho a base de **harina de hueso de aceituna**, con forma de tulipa, y con un potencial **uso en el sector gastronómico** para acompañar platos y servir de base para elaboraciones.



Figura 17. Entrevista en el blog de Adeoliva <<https://adeoliva.com/tuliva-harina-hueso-de-aceituna/>>.

Video realizado por la ETSIAMN



Figura 18. Video realizado por la ETSIAMN en Facebook <<https://www.facebook.com/watch/?v=1194021890982278>>.

Gracias al impulso que adquirió Cruixents con ambos concursos y a las diversas entrevistas realizadas, el grupo obtuvo la oportunidad de presentarse con un pequeño puesto en Ftalks20, una feria sobre alimentación y productos innovadores de la Comunitat Valènciana (Ftalks, 2020).



Figura 19. Puesto de Tuliva en Ftalks20.

5. Conclusiones

1. En este trabajo se ha presentado un nuevo alimento, Tuliva, su composición y proceso de elaboración.
2. Tuliva se ha clasificado en dos grupos de alimentos: galletas y productos de aperitivo.
3. El criterio microbiológico para garantizar la inocuidad de Tuliva según el grupo de alimento en el que se ha clasificado, establece que, realizando un plan de muestreo de cinco muestras, ninguna de ellas puede superar las 100 ufc de *Listeria monocytogenes* por gramo de producto.
4. Para realizar este análisis se recomienda seguir las indicaciones de la Norma UNE-EN ISO 11290-2:2017 para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*.
5. Recomendamos asegurar la calidad microbiológica de sus productos al inicio de una producción a gran escala, analizando también otros parámetros microbiológicos como la Presencia/Ausencia de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. o *Bacillus cereus*, así como el recuento de indicadores como aerobios mesófilos, o mohos y levaduras, entre otros.
6. Se debe cuantificar el contenido en humedad de Tuliva para garantizar una buena fabricación y conservación, ante una pérdida de valor nutricional y para evitar la proliferación de microorganismos.
7. Hemos presentado diferentes actos que justifican la aceptación de Tuliva: concursos y entrevistas para la presentación del producto.
8. Podemos concluir que Tuliva ha tenido una buena aceptación tanto a nivel alimentario, debido a la obtención del premio en Ecotrophelia y a las diferentes entrevistas y entradas en blogs destinados a la alimentación y a nuevos productos alimentarios, como a nivel empresarial, por la obtención de uno de los premios en StartUPV, ya que plantea un modelo de negocio apto para poder emprender como nueva empresa emergente.

6. Bibliografía

- ABC PACK. *Los envases comestibles, envases del futuro*. <<https://www.abc-pack.com/enciclopedia/los-envases-comestibles-envases-del-futuro-2/>> [Consulta: 22 de marzo de 2021]
- Adeoliva (2020). *Tuliva, innovador alimento creado con harina de hueso de aceituna*. <<https://adeoliva.com/tuliva-harina-hueso-de-aceituna/>> [Consulta: 9 de junio de 2021]
- AENORMÁS. <<http://aenormas.aenor.es>> [Consulta: 30 de junio de 2021]
- Biosait Europe – Laboratorio de análisis. *Microorganismos mesófilos en alimentos*. <<https://biosait.com/microorganismos-mesofilos-alimentos/>> [Consulta: 22 de mayo de 2021]
- EAMN (2020). *Equipo Cruixents: “La innovación es evolución y la evolución es necesaria en la sociedad”* <<https://eamn.blogs.upv.es/2020/05/12/equipo-cruixents-la-innovacion-es-evolucion-y-la-evolucion-es-necesaria-en-la-sociedad/>> [Consulta: 9 de junio de 2021]
- Economía Sustentable. *Envases comestibles: oportunidades y desafíos*. <<https://economiasustentable.com/noticias/empaques-comestibles-oportunidades-y-desafios>> [Consulta: 9 de junio de 2021]

Ecoosfera. *Platos y envases comestibles: una opción deliciosa para comenzar a vivir en el futuro.* <<https://ecoosfera.com/platos-envases-comestibles-biodegradables-contaminacion-plasticos/>> [Consulta: 9 de junio de 2021]

Ecotrophelia (2020). *Premios Ecotrophelia 2020* <<http://ecotrophelia.blogspot.com/2020/09/ecotrophelia-espana-2020-en-directo.html?m=1>> [Consulta: 9 de junio de 2021]

ELIKA (2021). *Staphylococcus aureus* <<https://seguridadalimentaria.elika.eus/staphylococcus-aureus/>> [Consulta: 12 de junio de 2021]

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica y del Medi Natural UPV, "Las protagonistas de Tuliva, ganadoras del segundo premio en el certamen nacional Ecotrophelia España..." 23 de septiembre de 2020 [Facebook] <<https://www.facebook.com/watch/?v=1194021890982278>> [Consulta: 30 de junio de 2021]

Food News Latam. *¿Qué son los AEROBIOS MESÓFILOS?* <<https://www.foodnewslatam.com/paises/74-bolivia/2499-%C2%BFque-son-los-aerobios-mesofilos.html>> [Consulta: 27 de mayo de 2021]

Ftalks (2021). *A closer look at what we eat.* <<https://www.ftalksfoodsummit.com/>> [Consulta: 9 de junio de 2021]

GARCÍA, E; FERNÁNDEZ, I. (2012). *Determinación de la humedad de un alimento por un método gravimétrico indirecto por desecación.* Departamento de Tecnología de Alimentos. ETSIAMN. Universitat Politècnica de València.[Consulta: 23 de junio de 2021]

IdeasUPV (2020). *Ganadores VII Edición del Concurso Emprendedor Universitario STARTUPV 2k20.* <<https://www.ideas.upv.es/vii-edicion-del-concurso-emprendedor-universitario-startupv-2k20/>> [Consulta: 9 de junio de 2021]

Información gastronómica (2020). *Tuliva, emplatados originales y con sello Km 0.* <<https://informaciongastronomica.com/tuliva-emplatados-originales-y-con-sello-km-0/>> [Consulta: 9 de junio de 2021]

INSTITUTO NACIONAL DE SEGURIDAD E HIGIENE EN EL TRABAJO. *Listeria monocytogenes.* <<https://www.insst.es/documents/94886/353495/Listeria+monocytogenes+2017.pdf/208c08ac-07fb-4d57-8012-dd77d138d9e1?version=1.0&t=1531401632545>> [Consulta: 8 de junio de 2021]

IVOOX (2020). *Tuliva, un premio que se come.* <https://www.ivoox.com/15-09-2020-tuliva-premio-se-come-audios-mp3_rf_56720384_1.htm> [Consulta: 9 de junio de 2021]

MERCACEI (2020). *Tuliva, innovador envase con harina de semilla de aceituna.* <<https://www.mercacei.com/noticia/52672/actualidad/tuliva-un-innovador-envase-con-harina-de-semilla-de-aceituna.html>> [Consulta: 9 de junio de 2021]

MERCK GROUP. *Envases comestibles. ¿Es posible que nuestra curiosidad colectiva por un futuro sostenible pueda revolucionar la industria del envasado de alimentos y reducir la producción de residuos?* <<https://www.merckgroup.com/es-es/stories/human-disposal.html>> [Consulta: 22 de marzo de 2021]

MORAGAS, M. y VALCÁRCEL, S. (2021). Recopilación de Normas microbiológicas de los alimentos y asimilados y otros parámetros físico-químicos de interés sanitario actualizada a 1 de enero de 2021. P. 30 y 51. [Consulta 9 de abril de 2021]

MUÑOZ, A; VARGAS, M; OTERO, L; DÍAZ, G; GUZMÁN, V. (2011). "Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de

mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008” en *Biomédica*. Vol. 31, p. 428-439.

OBREGÓN, D.; ZAMBRANO, Z. (2017). *Evaluación microbiológica (aerobios mesófilos, Bacillus cereus y Staphylococcus aureus) y química – toxicológica de metales pesados (ph, hg) en leche para consumo humano en el distrito de Puente Piedra – Lima*. Trabajo final de grado. Lima: Universidad nacional mayor de San Marcos. <<https://core.ac.uk/download/pdf/323341338.pdf>> [Consulta: 20 de mayo de 2021]

PASCUAL, M.; CALDERÓN, V. (1999). *Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*. Ed. Diaz De Santos. Madrid. 464 pp. 2ª edición.

Poscosecha (2020). *Un equipo de la EAMN logra el segundo puesto en Ecotrophelia España con un envase comestible para presentar platos preparados*. <https://www.poscosecha.com/es/noticias/un-equipo-de-la-eamn-logra-el-segundo-puesto-en-ecotrophelia-espana-con-un-envase-comestible-para-presentar-platos-preparados/_id:80965/> [Consulta: 9 de junio de 2021]

REAL DECRETO 1124/1982, de 30 de abril, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y comercio de Galletas. *BOE*, de 4 de junio de 1982, núm. 133, p. 15069-15072.

REAL DECRETO 126/1989, de 3 de febrero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la elaboración y comercialización de patatas fritas y productos de aperitivo. *BOE*, de 8 de febrero de 1989, núm. 33, p. 3795-3799.

REGLAMENTO (CE) nº 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el REGLAMENTO (CE) nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Eurlex*, 7 de diciembre de 2007, OJ L 322, p. 19-29.

REGLAMENTO (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Eurlex*, 22 de diciembre de 2005, OJ L 338, p. 1-26.

Residuos profesional. *Los envases comestibles se abren paso*. <<https://www.residuosprofesional.com/envases-comestibles-se-abren-paso/>> [Consulta: 22 de marzo de 2021]

UNE-EN ISO 7899-2:2000. Calidad del agua. Detección y recuento de enterococos intestinales. Parte 2: Método de filtración de membrana.

UNE-EN ISO 7932:2005. Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de *Bacillus cereus* presuntivos. Técnica de recuento de colonias a 30 °C.

UNE-EN ISO 21527-2:2008. Microbiología de alimentos y piensos. Método horizontal para el recuento de levaduras y mohos. Parte 2: Técnica de recuento de colonias en productos con actividad de agua inferior o igual a 0,95.

UNE-EN ISO 7218:2008. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico.

UNE-EN ISO 4833-1:2014. Microbiología de la cadena Alimentaria. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Parte 1: Recuento de colonias a 30 °C mediante la técnica de siembra en profundidad.

UNE-EN ISO 16649-3:2015. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la enumeración de *Escherichia coli* beta-glucuronidasa positiva. Parte 3: Detección y técnica del número más probable utilizando 5-bromo-4-cloro-3-indol beta-D-glucuronato.

UNE-EN ISO 6887-1:2017. Microbiología de la cadena alimentaria. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales.

UNE-EN ISO 21528-1:2017. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de *Enterobacteriaceae*. Parte 1: Detección de *Enterobacteriaceae*.

UNE-EN ISO 11290-2:2017. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. Parte 2: Método de recuento.

Universidad Politécnica de Valencia. Grado de Ciencia y Tecnología de los alimentos. <[32](http://www.upv.es/titulaciones/GCTA/index-es.html#:~:text=El%20Grado%20en%20Ciencia%20y,y%20el%20binomio%20alimentaci%C3%B3n%20salud.> [Consulta: 10 de abril de 2021]</p></div><div data-bbox=)