

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



TESIS DOCTORAL

**TERMORRESISTENCIA DE CEPAS DE
SALMONELLA NATIVAS EN ALBÚMINA
DE HUEVO DESHIDRATADA Y
PASTEURIZADA. EFECTO DE LA
ACTIVIDAD DE AGUA Y DEL CHOQUE
TÉRMICO.**

Presentada por:

Liliana Haydée Lound

Dirigida por:

Dra. Leda Giannuzzi

Dr. Raul Grau Meló

Tesis Doctoral convenio UPV – UNER, Argentina. Junio 2014.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Este trabajo de tesis es fruto de varios años de mi vida en los cuales he tenido la posibilidad de estar acompañada de personas generosas que me han ayudado y me han apoyado. Quiero expresar mi reconocimiento y mi gratitud particularmente a los que hicieron posible que pudiera hoy escribir estas palabras:

A la Universidad Politécnica de Valencia que me brindó la posibilidad de cursar el Programa de Doctorado en Ciencia, Tecnología y Gestión Alimentaria y que, con el apoyo del Programa de Cooperación al desarrollo de la Generalitat Valenciana, me ha concedido ayuda de alojamiento para la defensa de esta tesis doctoral.

A la Universidad Nacional de Entre Ríos, a la Facultad de Bromatología y a la Facultad de Ciencias de la Alimentación por el aporte económico brindado y por ofrecerme esta posibilidad de desarrollo y crecimiento profesional.

A la Dra. Leda Giannuzzi por su orientación y dedicación en la dirección de esta tesis. Agradecerle especialmente todo el esfuerzo y tiempo dedicado.

Al Dr. Raul Grau Meló por su apoyo y la asistencia para que pueda concretar la defensa de tesis en la Universidad Politécnica de Valencia.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Microbiología: Daniel Tanaro, Mercedes Piaggio, Leticia Broggi y Ramiro Tesouro y en especial a Horacio Aleu y Viviana Genaro porque sin su colaboración no hubiese podido hacer las investigaciones.

A los estudiantes de prácticas o trabajo final de carrera que han formado parte del laboratorio y han dejado una huella: Renzo Sanchez, Julio Manzocco, Santiago Araujo, Silvana Plem, Fernanda Martinez, Leonardo Favre y Enzo Tofolón.

A los investigadores del INTA Concepción del Uruguay: Dr-Dante Bueno y Mg. Mario Soria.

A los Dres. Susana Bruno y Pablo Rogé del laboratorio de Producción de Biológicos del Instituto “Carlos G. Malbrán”

A mi esposo Luis Chesini y a mis hijos Dalina, Mariana y Dino por su amor y porque sin su ayuda no hubiese podido desarrollar mi profesión.

Y aunque no puedo dejar de ponerme nostálgica y sensible, quiero terminar feliz, agradecida de Dios y de todas las personas que me quieren.

Liliana

RESUMEN

SUMMARY

RESUM

Resumen

La albúmina de huevo es una compleja mezcla de proteínas que contiene todos los aminoácidos esenciales. Es utilizada como suplemento alimenticio, por sí sola o mezclada con otros componentes. La industria de productos de huevo elabora, según la temperatura de pasteurización que utilice, productos con propiedades de batido y con capacidad de formar geles firmes. La optimización de los tratamientos térmicos requiere disponer de datos precisos del grado y biovariabilidad de la resistencia al calor de los microorganismos, teniendo en cuenta también las posibles respuestas de adaptación que pueden desarrollar cuando han sido sometidos a condiciones adversas.

En los últimos años se ha relacionado a los alimentos secos con brotes de salmonelosis, lo que obliga a reconsiderar el concepto de alimentos de baja humedad con seguridad microbiológica. Por estas razones se determinaron las cinéticas de muerte térmica de tres serotipos de *Salmonella enterica*: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Montevideo*, todas aisladas de huevo e inoculadas en albúmina de huevo deshidratada.

Los estudios de muerte térmica se llevaron a cabo a las temperaturas de pasteurización industrial: 72, 77 y 82°C. La

cinética de muerte también se estudió en un cóctel de las cepas y en inóculos mixtos compuestos por las cepas más termorresistentes de cada serotipo.

Adicionalmente se evaluó la respuesta a un choque térmico previo calentamiento a 50°C durante 30 minutos. Se encontró que la termorresistencia estuvo condicionada por factores genéticos ya que *S. Enteritidis* mostró mayor resistencia térmica que *S. Typhimurium* y ambos serotipos resultaron ser más resistentes que *S. Montevideo*. Esta termorresistencia fue dependiente de la actividad de agua e independiente del choque térmico. *S. Enteritidis* aumentó, a 72°C, la termorresistencia 60 veces más en albúmina de huevo deshidratada que en caldo nutritivo, *S. Typhimurium* 50 veces más, y *S. Montevideo* 25 veces más, probablemente por el efecto sinérgico de las proteínas y la baja actividad de agua de este producto (0,338-0,374).

Los cócteles de cepas de los inóculos mixtos de distintos serotipos, incluyendo el tratamiento de choque térmico, no generaron un incremento en la resistencia térmica. Los valores de D resultaron ser de 3,5 horas y 30 minutos a 72°C y a 82°C respectivamente.

Estos resultados son importantes en el campo de la tecnología de alimentos y la seguridad alimentaria, dado que aportan tiempos y temperaturas de muerte térmica de *Salmonella* en albúmina de huevo deshidratada, lo que permitirá a la industria reducir de manera más eficiente y eficaz el riesgo de contaminación con *Salmonella* en productos de bajo contenido de humedad.

Summary

Egg albumin is a complex mixture of proteins containing all essential amino acids. It is used as a dietary supplement, alone or mixed with other components. The egg industry produces products with whipping properties and ability to form firm gels.

The optimization of thermal treatments requires accurate data on the extent and biovariability to heat resistance of microorganisms, considering also the possible adaptive responses that may develop when they have been subjected to adverse conditions.

In recent years dry foods have been linked to with outbreaks of salmonellosis, which forcing to reconsider the concept of low moisture foods as microbiologically safe.

For these reasons the kinetics of thermal death of three serotypes of *Salmonella enterica* were studied. *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* and *S. Montevideo* isolated from eggs and inoculated in dried egg albumin.

Thermal death was studied at three pasteurization temperatures: 72, 77 and 82°C.

The kinetics of death was also studied in a mixture of strains and mixed inocula composed by the most heat-resistant strains of each serotype.

Furthermore the response to a previous thermal shock heating at 50°C for 30 minutes was evaluated. Heat resistance was conditioned by genetic factors as *S. Enteritidis* showed higher thermal resistance than *S. Typhimurium* and both serotypes proved to be much more resistant than *S. Montevideo*. This heat resistance was dependent on the water activity and independent of thermal shock.

Heat resistance of *S. Enteritidis* at 72°C increased 60 times more in egg albumin than nutrient broth, *S. Typhimurium*, increased 50 times and *S. Montevideo* increased 25 times, probably due to the synergistic effect of the proteins and low water activity of the product (0.338-0.374).

The mixture of strains mixed of different serotypes, including the heat shock treatment, did not produce an increase in thermal resistance.

The D values were 3.5 hours and 30 minutes at 72°C and 82°C respectively.

Summary

These results are important in the field of food technology and food security, as they inform about times and temperatures of *Salmonella* thermal death in dried egg albumin, allowing the industry to more efficiently and effectively reduce the risk of *Salmonella* contamination in products with low moisture content.

Resum

L'albumina d'ou és una complexa mescla de proteïnes que conté tots els aminoàcids essencials. És utilitzada com a suplement alimentari, per si sol o mesclat amb altres components. La indústria de productes d'ou elabora, segons la temperatura de pasteurització que utilitza, productes amb propietats de batut i amb capacitat de formar gels fermes. L'optimització dels tractaments tèrmics requereix disposar de dades precises del grau i biovariabilitat de la resistència a l'abric dels microorganismes, tenint en compte també les possibles respostes d'adaptació que poden desenvolupar quan han sigut sotmesos a condicions adverses.

En els últims anys s'ha relacionat als aliments secs amb brots de salmonel·losi, la qual cosa obliga a reconsiderar el concepte d'aliments de baixa humitat amb seguretat microbiològica. Per estes raons es van determinar les cinètiques de mort tèrmica de tres serotips de *Salmonella enterica*: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* i *S. Montevideo*, totes aïllades d'ou i inoculades en albumina d'ou deshidratada.

Els estudis de mort tèrmica es van dur a terme a les temperatures de pasteurització industrial: 72, 77 i 82°C. La cinètica de mort

també es va estudiar en un còctel dels ceps i en inòculos mixtos compostos pels ceps més termoresistents de cada serotip.

Addicionalment es va avaluar la resposta a un xoc tèrmic previ calfament a 50°C durant 30 minuts. Es va trobar que la termorresistència va estar condicionada per factors genètics ja que *S. Enteritidis* va mostrar major resistència tèrmica que *S. Typhimurium* i ambdós serotips van resultar ser més resistents que *S. Montevideo*. Esta termorresistència va ser dependent de l'activitat d'aigua i independent del xoc tèrmic. *S. Enteritidis* va augmentar, a 72°C, la termorresistència 60 vegades més en albúmina d'ou deshidratada que en caldo nutritiu, *S. Typhimurium* 50 vegades més, i *S. Montevideo* 25 vegades més, probablement per l'efecte sinèrgic de les proteïnes i la baixa activitat d'aigua d'este producte (0.338-0.374).

Els còctels de ceps dels inòculos mixtos de distints serotips, incloent el tractament de xoc tèrmic, no van generar un increment en la resistència tèrmica. Els valors de D van resultar ser de 3.5 hores i 30 minuts a 72°C i a 82°C respectivament.

Estos resultats són importants en el camp de la tecnologia d'aliments i la seguretat alimentària, atés que aporten temps i temperatures de mort tèrmica de *Salmonella* en albúmina d'ou

deshidratada, la qual cosa permetrà a la indústria reduir de manera més eficient i eficaç el risc de contaminació amb *Salmonella* en productes de davall contingut d'humitat.

ÍNDICE

Índice

RESUMEN	6
SUMMARY	6
RESUM	6
ÍNDICE.....	16
Índice	17
Índice de Figuras	24
Índice de Tablas	29
ABREVIATURAS	31
INTRODUCCIÓN.....	34
Introducción.....	35
1. Albúmina de huevo.....	35
1.1. Formación de la albúmina en el huevo infértil	36
1.2. Composición de la albúmina de huevo.....	38
1.3. Proceso de elaboración de albúmina de huevo	46
1.3.1. Productos derivados de albúmina de huevo	49
1.4. Producción mundial de productos de huevo.....	52
2. Contaminación por <i>Salmonella</i> en albúmina de huevo	54
2.1. El género <i>Salmonella</i>	55
2.2. Contaminación de la albúmina en el huevo.....	59
2.3. Fuentes de contaminación de la albúmina de huevo en la industria procesadora	65
2.4. Incidencia de la salmonelosis	69
2.4.1. Incidencia en la Unión Europea	70
2.4.2. Incidencia en América.....	71

2.4.3. Incidencia en Argentina	74
2.5. Fisiología del género <i>Salmonella</i>	74
2.5.1. Resistencia a la acidez.....	74
2.5.2. Supervivencia en alimentos de baja actividad de agua	76
2.5.3. Resistencia térmica.....	78
2.6. Cinética de muerte.....	83
OBJETIVOS	87
II.1. OBJETIVO GENERAL.....	88
II. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	88
CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE LAS ALBÚMINAS DE HUEVO DESHIDRATADAS Y PASTEURIZADAS	90
MATERIALES Y MÉTODOS.....	93
I.1. Materiales	94
I.2. Metodología utilizada para la caracterización de las muestras de albúmina de huevo.....	95
I.2.1. Caracterización físico-química.....	95
I.2.1.1. Determinación de nitrógeno proteico y/o proteína	95
I.2.1.2. Determinación de pH	96
I.2.1.3. Determinación de cenizas	97
I.2.1.4. Determinación del contenido graso.....	97
I.2.1.5. Determinación del contenido de humedad.....	97
I.2.1.6. Medida del color	98
I.2.1.7. Temperaturas y entalpías de desnaturalización.....	99
I.2.1.8. Identificación de proteínas	99

I.2.2. Caracterización funcional.....	104
I.2.2.1. Capacidad espumante y estabilidad de la espuma....	104
I.2.2.2. Análisis de perfil de textura	106
I.2.2.3. Determinación de la capacidad de retención de agua	109
I.2.2.4. Determinación de la actividad acuosa de las muestras de albúmina de huevo y de la capacidad de adsorción de agua	109
I.2.3. Análisis microbiológico	112
I.2.3.1. Enumeración de microorganismos aerobios mesófilos	113
I.2.3.2. Enumeración de coliformes totales	113
I.2.3.3. Enumeración de hongos y levaduras.....	114
I.2.3.4. Enumeración de <i>Bacillus cereus</i>	114
I.2.3.5. Investigación de <i>Salmonella</i> spp.....	115
I.2.4. Análisis estadístico.....	117
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	118
I.1. Caracterización de las albúminas de huevo deshidratadas y pasteurizadas.....	119
I.1.1. Caracterización físico-química.....	119
I.1.1.1. Composición proximal.....	119
I.1.1.2. Evaluación del color	120
I.1.1.3. Determinación de las temperaturas y entalpías de desnaturalización.....	121
I.1.1.4. Análisis proteico por electroforesis.....	123
I.1.1.5. Identificación de las proteínas por mapeo peptídico	129

I.1.1.6. Identificación de péptidos bioactivos.....	135
I.1.2. Caracterización funcional.....	137
I.1.2.1. Evaluación de la capacidad espumante y estabilidad de la espuma	137
I.1.2.2. Perfil de textura de geles por compresión	140
I.1.2.3. Determinación de la adsorción de agua.....	142
I.1.3. Análisis microbiológico	146
CAPITULO II: CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE SALMONELLA, TOLERANCIA A ÁCIDO Y MUERTE TÉRMICA EN CALDO NUTRITIVO Y ALBÚMINA DE HUEVO DESHIDRATADA.....	147
MATERIALES Y MÉTODOS.....	152
II.1. Materiales.....	153
II.2. Metodología	153
II.2.1. Aislamiento y tipificación de cepas de <i>Salmonella</i>	153
II.2.2. Conservación de cepas tipificadas	157
II.2.3. Resistencia a los antibióticos	157
II.2.4. Respuesta de tolerancia al ácido	159
II.2.5. Estudios de resistencia térmica	162
II.2.5.1. En caldo nutritivo	162
II.2.5.2. Efecto de la actividad acuosa dada por diferentes tipos de albúmina de huevo deshidratada sobre la resistencia térmica de diferentes cepas de <i>Salmonella</i>	164
II.2.6. Evaluación de la cinética de muerte.....	167
II.2.7. Diseño experimental	168
II.2.8. Gráficas de supervivencia	169
II.2.9. Análisis estadístico	169

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	170
II.1. Elección y caracterización de las cepas de <i>Salmonella</i>	171
II.2. Pruebas bioquímicas	173
II.3. Serotipificación	174
II.4. Pruebas de resistencia a los antibióticos	175
II.5. Evaluación de la adaptación a ácido en caldo nutritivo con glucosa y respuesta de tolerancia a ácido a pH 3,5 en ácido acético	176
II.6. Estudios de resistencia térmica	181
II.6.1. Resistencia térmica en caldo nutritivo	181
II.6.2. Resistencia térmica en albúmina de huevo deshidratada de diferentes aw	186
II.6.2.1. En albúmina de huevo deshidratada con propiedades de batido ($a_w = 0,374$)	186
II.6.2.2. En albúmina de huevo deshidratada con propiedades gelificantes ($a_w = 0,338$)	190
CAPITULO III: RESISTENCIA TÉRMICA DE UN COCTEL DE CEPAS E INÓCULO MIXTO DE SALMONELLA EN ALBÚMINA DE HUEVO DESHIDRATADA CON PROPIEDADES GELIFICANTES. EFECTO DEL CHOQUE TÉRMICO.	203
MATERIALES Y MÉTODOS	209
III.1. Materiales	210
III.1.1. Inóculos	210
III.1.2. Matriz de calentamiento	210
III.2. Metodología	211
III.2.1. Estudios de inactivación térmica de un cóctel de cepas de un mismo serotipo en albúmina a $a_w = 0,338$...	211

III.2.2. Estudios de inactivación térmica de un inóculo mixto formado por cepas de diferentes serotipos	213
III.2.3. Resistencia térmica de inóculos sometidos a shock térmico.....	214
III. 2.4. Evaluación de la cinética de muerte:	214
III.2.5. Diseño experimental	215
III.2.6. Supervivencia de <i>Salmonella</i> en albúmina de huevo con propiedades gelificantes ($a_w= 0,338$)	216
III.2.7. Curvas de supervivencia bacteriana	217
III.2.8. Análisis estadístico	217
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	218
III.1. Inactivación térmica de un cóctel de cepas del mismo serotipo en albúmina de huevo deshidratada con propiedades gelificantes ($a_w= 0,338$)	219
III.2. Inactivación térmica de un inóculo mixto de distintos serotipos.....	225
III.3. Inactivación térmica de inóculo sometido a choque térmico a 50°C por 30 minutos.....	228
III.3.1. Inóculos de cócteles de cepas de igual serotipo ..	228
III.3.2. Inóculo mixto de distintos serotipos	231
III.4. Supervivencia de las cepas seleccionadas en albúmina de huevo deshidratada con propiedades gelificantes ($a_w= 0,338$).....	238
CONCLUSIONES.....	241
REFERENCIAS	248
ANEXO I.....	277
Comparación de suplementos y medios selectivos para la recuperación de bacterias injuriadas.....	278

Índice de Figuras

Figura 1. Corte transversal del huevo infértil y sus partes.	36
Figura 2. Esquema de formación del huevo de gallina.....	37
Figura 3. Diagrama de flujo de obtención de albúmina de huevo deshidratada.	47
Figura 4. Factores de virulencia representativos de <i>Salmonella</i>	58
Figura 5. Factores de virulencia representativos de <i>Salmonella</i>	64
Figura 6. Casos de salmonelosis en humanos, huevos y número de brotes causados por huevos en la UE desde 2007-2010.	71
Figura 7. Fotografía de las muestras de albúmina de huevo.	95
Figura 8. Escala de color CIE L*, a*, b*.....	98
Figura 9. Gráfica general del análisis del perfil de textura de una muestra.	107
Figura 10. Equipo para medición de actividad de agua.....	111
Figura 11. Picos de temperatura de desnaturalización (°C) y entalpía de desnaturalización (J/g) de las muestras de albúmina deshidratada sin pasteurizar (ADNP), albúmina de huevo con propiedades de batido (AAE) y albúmina de huevo con propiedades gelificantes (AAG).	122
Figura 12. Electroforesis PAGE con gel de poliacrilamida al 10%.....	124

Figura 13. Electroforesis PAGE con urea	126
Figura 14. Electroforesis PAGE con gel de poliacrilamida al 12%	128
Figura 15. Bandas recortadas para los estudios proteómicos ..	129
Figura 16. Espectro de masas obtenido en modo reflector positivo para la banda proteica N° 1	131
Figura 17. Resultado del análisis, estadísticamente significativo, utilizando el motor de búsqueda Mascot. A) Cadena A de ovoalbúmina, B) Cadena A de ovotransferrina unida a Aluminio, C) Ovotransferrina tipo BB de <i>Gallus gallus</i>	132
Figura 18. Secuencia aminoacídica de: A) cadena A de ovoalbúmina, B) ovoalbúmina relacionada al gen Y	135
Figura 19. Estabilidad de la espuma en albúmina de huevo deshidratada con propiedades espumantes (AAB) y albúmina de huevo deshidratada no pasteurizada (ADNP).....	139
Figura 20. Curva representativa del PTC: A) en albúmina de huevo con propiedades gelificantes, B) en albúmina de huevo sin pasteurizar	140
Figura 21. Gráficas de adsorción ajustadas según las ecuaciones de a) GAB y b) Oswin en albúmina de huevo deshidratada sin pasteurizar (ADNP), albúmina de huevo con propiedades de batido (AAB) y albúmina de huevo con propiedades gelificantes (AAG).....	142
Figura 22. Diagrama de flujo del proceso de tipificación serológica.....	155

Figura 23. Imágenes del termostato utilizado en los estudios térmicos	166
Figura 24. Supervivencia de los inóculos simples de <i>Salmonella</i> en caldo nutritivo acidificado a pH 3,5 con ácido acético, a) <i>S. Enteritidis</i> , b) <i>S. Typhimurium</i> , c) <i>S. Montevideo</i>	177
Figura 25. Supervivencia de <i>S. Enteritidis</i> en caldo nutritivo de a) cepa 1, b) cepa 2, c) cepa 3, a 72, 77 y 82°C.....	181
Figura 26. Supervivencia de <i>S. Typhimurium</i> en caldo nutritivo de a) cepa 1, b) cepa 2, a 72, 77 y 82°C.	182
Figura 27. Supervivencia de <i>S. Montevideo</i> en caldo nutritivo de a) cepa 1, b) cepa 2, a 72, 77 y 82°C.	182
Figura 28. Supervivencia de <i>S. Enteritidis</i> en albúmina de huevo deshidratada ($a_w=0,374$) a) cepa 1, b) cepa 2, c) cepa 3, a 72,77 y 82°C.....	187
Figura 29. Supervivencia de <i>S. Typhimurium</i> en albúmina de huevo deshidratada ($a_w= 0,374$) de a) cepa 1, b) cepa 2, a 72,77 y 82°C.....	187
Figura 30. Supervivencia de <i>S. Montevideo</i> en albúmina de huevo deshidratada ($a_w= 0,374$), a) cepa 1, b) cepa 2, a 72,77 y 82°C.....	188
Figura 31. Supervivencia de <i>S. Enteritidis</i> en albúmina de huevo deshidratada ($a_w=0,338$): a) cepa 1, b) cepa 2, c) cepa 3, a 72,77 y 82°C.....	191
Figura 32. Supervivencia de <i>S. Typhimurium</i> en albúmina de huevo deshidratada ($a_w=0,338$) de a) cepa 1, b) cepa 2, a 72,77 y 82°C.....	191

Figura 33. Supervivencia de <i>S. Montevideo</i> en albúmina de huevo deshidratada ($a_w=0,338$), de a) cepa 1, b) cepa 2, a 72,77 y 82°C.....	192
Figura 34. Supervivencia de los cócteles de a) <i>S. Enteritidis</i> ; b) <i>S. Typhimurium</i> y c) <i>S. Montevideo</i> en albúmina de huevo deshidratada ($a_w=0,338$), a 72, 77 y 82°C.	220
Figura 36. Tiempos de reducción decimal de los inóculos simples y el cóctel de <i>S. Enteritidis</i>	222
Figura 36. Tiempos de reducción decimal de los inóculos simples y el cóctel de <i>S. Typhimurium</i>	223
Figura 37. Tiempos de reducción decimal de los inóculos simples y el cóctel de <i>S. Montevideo</i>	224
Figura 38. Supervivencia del inóculo mixto de serotipos de <i>Salmonella</i> en albúmina de huevo deshidratada ($a_w= 0,338$), a 72, 77 y 82°C.....	226
Figura 39. Tiempos de reducción decimal de los inóculos simples más termorresistentes y el inóculo mixto	227
Figura 40. Supervivencia de los cócteles de cepas de <i>Salmonella</i> a) <i>S. Enteritidis</i> ; b) <i>S. Typhimurium</i> y c) <i>S. Montevideo</i> sometidos a choque térmico en albúmina de huevo deshidratada ($a_w=0,338$), a 72, 77 y 82°C.....	229
Figura 41. Tiempos de reducción decimal de los cócteles de cepas	230
Figura 42. Supervivencia del cultivo mixto de serotipos de <i>Salmonella</i> sometido a choque térmico en albúmina de huevo deshidratada ($a_w= 0,338$), a 72, 77 y 82°C.	232

Figura 43. Tiempos de reducción decimal del inóculo mixto a 72,77 y 82°C234

Figura 44. Supervivencia de *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium y Montevideo en albúmina de huevo deshidratada (aw= 0,338) durante un año.....238

Índice de Tablas

Tabla 1. Composición y propiedades de las proteínas de la albúmina de huevo.....	39
Tabla 2. Caracteres diferenciales de especies y subespecies de <i>Salmonella</i>	56
Tabla 3. Principales serovariedades aisladas en países sudamericanos, en orden de frecuencia de aislamiento.	73
Tabla 4. Ecuaciones utilizadas para el ajuste de las isothermas de adsorción de la albúmina de huevo deshidratada.	112
Tabla 5. Composición proximal de las muestras de albúmina	119
Tabla 6. Parámetros de color de las muestras de albúmina de huevo.	120
Tabla 7. Listado de las proteínas identificadas con resultado estadísticamente significativo.....	133
Tabla 8. Expansión de la espuma en albúmina de huevo sin pasteurizar y en albúmina con propiedades de batido	138
Tabla 9. Parámetros del PTC y retención de agua.....	141
Tabla 10. Resumen de datos obtenidos para los ajuste según los modelos de GAB y Oswin en las tres muestras.....	144
Tabla 11. Resultados análisis microbiológicos.....	146
Tabla 13. Respuesta de las cepas de <i>Salmonella</i> seleccionadas frente a los antimicrobianos ensayados	175

Tabla 14. Tiempos de reducción decimal obtenidos para cada una de las cepas en caldo de cultivo a pH 3,5	179
Tabla 14. Tiempos de reducción decimal obtenidos para cada una de las cepas en caldo nutritivo a las temperaturas de 72,77 y 82°C	184
Tabla 15. Tiempos de reducción decimal obtenidos para cada una de las cepas en albúmina de huevo deshidratada ($a_w= 0,374$) en los estudios de muerte térmica a 72, 77 y 82°C.....	189
Tabla 16. Tiempos de reducción decimal D (minutos), para cada una de las cepas de <i>Salmonella</i> en albúmina de huevo deshidratada ($a_w= 0,338$) en los estudios de muerte térmica a 72, 77 y 82°C.....	193
Tabla 17. Tiempos de reducción decimal D (minutos) y diferencial de temperatura z (°C), para cada una de las cepas de <i>Salmonella</i> en caldo nutritivo, albúmina de huevo deshidratada ($a_w=0,374$) y albúmina de huevo deshidratada ($a_w=0,338$). ..	196
Tabla 18. Tiempos de reducción decimal D (minutos) y diferencial de temperatura z (°C), para cada uno de los cócteles del mismo serotipo e inóculo mixto de los serotipos con y sin tratamiento térmico a 50°C por 30 minutos.	235

ABREVIATURAS

Abreviaturas

- AAB: Albúmina de huevo con propiedades de batido
AAG: albúmina de huevo con propiedades gelificantes
ADN: ácido desexiribonucleico
ADNP: albúmina de huevo deshidratada no pasteurizada
ANVISA: Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil
AOAC: Asociación Oficial de Químicos Analíticos
APR: agar para recuento en placa
ARN: ácido ribonucleico
ATS: agar tripteína de soja
AVB: agar verde brillante
Aw: actividad de agua
BRVL: agar bilis rojo violeta lactosa
CDC: Centro de Control de Enfermedades y Prevención de Estados Unidos
CIE: Comisión Internacional de Iluminación
CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio de Estados Unidos
CNG: caldo nutritivo con glucosa
CTS: caldo tripteína de soja
D: tiempo de reducción decimal a una temperatura dada
DS: desviación estándar
ECA: enzima convertidora de angiotensina
EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EL: extracto de levadura
ETA: Enfermedades Transmitidas por Alimentos
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GAB: Ecuación de Guggenheim, Anderson y Boer

ICMSF: Instituto de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos

INEI-ALNIS: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud, Argentina

LNRE: Laboratorio Nacional de Referencia de Enterobacterias, Argentina

2-ME: 2-mercaptoetanol

OGY: agar oxitetraciclina gentamicina extracto de levadura glucosa

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

PVC: policloruro de vinilo

RCR: Reacción en cadena de la polimerasa

S: Salmonella

SDS: dodecilsulfatosódico

TD: temperatura de desnaturalización

TFA: anhídrido trifluoracético

TSI: agar hierro triple azúcar

UE: Unión Europea

UFC: unidades formadoras de colonias

USDA-FSIS: Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos

UV: ultra violeta

VBNC: bacterias viables no cultivables

z: diferencial de temperatura necesario para disminuir el tiempo de reducción decimal un factor de 10

INTRODUCCIÓN

Introducción

1. Albúmina de huevo

La albúmina o clara de huevo consiste en capas concéntricas que rodean la yema y que están compuestas básicamente de 87,1% de agua y 11,6% de proteínas (Argenfood, 2010). Es transparente y en ella se distinguen dos partes, según su densidad: la albúmina densa y la fluida. La albúmina densa rodea a la yema y es la principal fuente de proteínas del huevo. Presenta dos zonas: densa interna (chalazas) y densa externa que solo se diferencian en que la segunda es más estable debido a que presenta una concentración cuatro veces superior en ovomucina.

La albúmina fluida también presenta dos zonas: interna y externa. La interna está rodeada por la albúmina densa y la externa está en contacto con las membranas testáceas y se visualiza al abrir el huevo. A medida que el huevo pierde frescura, la albúmina densa es menos consistente y termina por confundirse con la fluida.

En la Figura 1 se pueden observar las partes del huevo con indicación de las distintas estructuras de la albúmina de huevo.

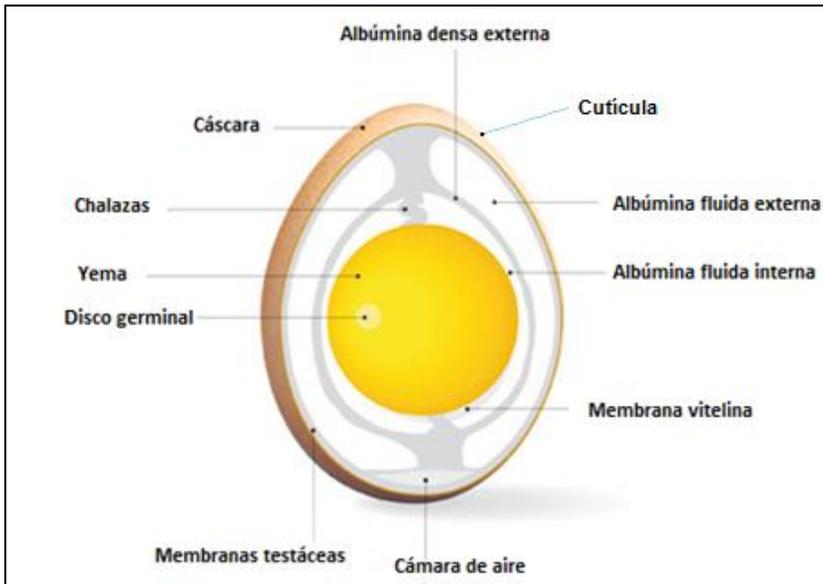


Figura 1. Corte transversal del huevo infértil y sus partes.

Fuente: adaptado de Huevo.org.es¹

1.1. Formación de la albúmina en el huevo infértil

En el sistema reproductor de la gallina (ovario y oviducto), el magno es la sección más larga y presenta distintos tipos de células que sintetizan las proteínas de la albúmina. Cuando el huevo sale del magno, la albúmina presenta un aspecto gelatinoso y denso debido a que solo contiene un 50% del agua total. El proceso de hidratación y estructuración se completa y

¹ Esta imagen fue seleccionada por ser la más adecuada para mostrar las partes del huevo.

finaliza en el útero. En la Figura 2 se presenta un esquema de la formación del huevo en la gallina.

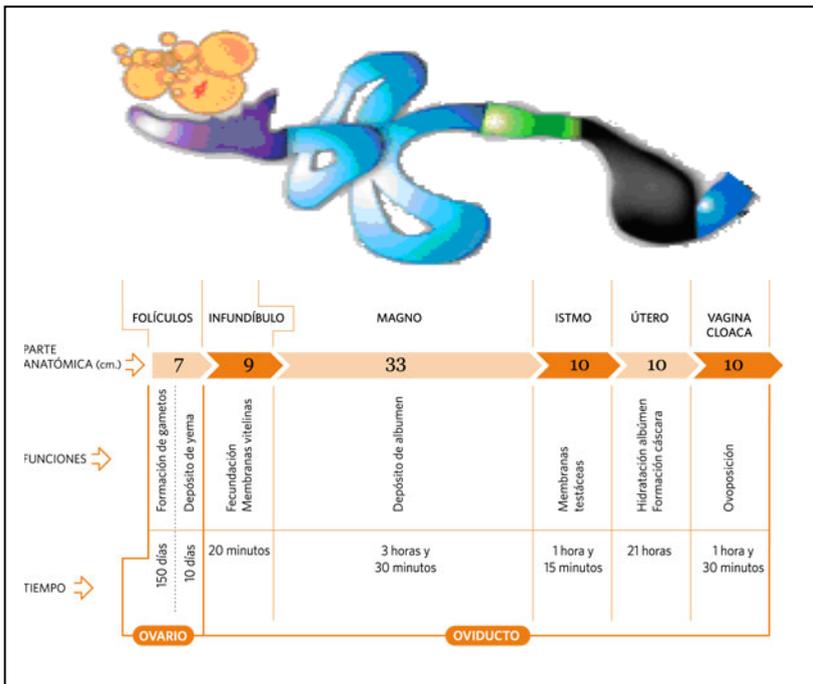


Figura 2. Esquema de formación del huevo de gallina.

Fuente: adaptado de Huevo.org.es

Al llegar al istmo la albúmina empieza a rodearse de las dos membranas testáceas. En el útero o glándula cascarógena se produce una rotación del huevo dando lugar a la torsión de las fibras proteicas de la albúmina densa interna. El huevo

permanece en el útero de 18 a 22 horas hasta que se produce la formación de la cáscara.

Una vez formado el huevo se produce la expulsión a través de la cloaca o vagina. El huevo sale con fuerza gracias a las contracciones de la musculatura lisa que rodea a la mucosa.

1.2. Composición de la albúmina de huevo

La albúmina de huevo se puede considerar un sistema constituido por proteínas en agua. Las que se encuentran en mayor proporción son: ovoalbúmina: 54%, ovotransferrina: 12-13%, ovomucoide: 11%, ovomucina: 1,5- 3,5%, y lisozima: 3,4-3,5% (Mine, 1995).

La albúmina de huevo contiene, además, otras proteínas como la ovoglobulina, la ovoflavoproteína, ovomacroglobulina, avidina y nuevas o identificadas en los últimos años como: lipocalinas, proteína extracelular unida a ácidos grasos, lipocalina gamma, ovoglicoproteína, clusterina, entre otras (Guérin-Dubiard y Nau, 2007).

En la Tabla 1 se presenta la composición general y propiedades de las principales proteínas de la albúmina de huevo.

Tabla 1. Composición y propiedades de las proteínas de la albúmina de huevo.

Proteína	% P/P	pI	PM(KDa)	Td (°C)	-SH/S-S
Ovoalbúmina		4,5-4,9			
S-ovoalbúmina				75-84	
A1	54	4,94	45	92	4/1
A2		4,89			
A3		4,75			
Ovotransferrina		6,0		61-63	
Ovot.-Fe	12-13	6,6	77,7	66-76	0/15
Ovot.-2Fe		6,2		80-86	
Ovomucoide	11	4,1	28	77	0/9
Ovomucina					
β	1,5-3,5	4,5-5	~720		0/3?
α1			~135		
α2			230,9		192/3
Lisozima	3,4-3,5	10,7	14,3-14,6	69-77	0/4
Ovoglobulina G2	1,0	4,9-5,5			
Ovoglobulina G3	1,0	4,8-5,8			
Ovoflavoproteína	0,8	4	32-35, 80		0/2
Ovostatina	0,5	4,5-4,7	760-900		
Cistatina	0,05	5,1	12		
Avidina	0,05	10			0/1

pI: punto isoeléctrico; Td: temperatura de desnaturalización

Fuente: adaptado de Weijers M., (2005), Hammershøj *et al.*, (2006).

Muchas de las proteínas, una vez sintetizadas son sujetas a un gran número de modificaciones postransduccionales como glicosilación o fosforilación. Se ha reportado que la ovoalbúmina, ovotransferrina, ovomucoide y lisozima existen en múltiples isoformas, formas poliméricas o variantes genéticas

derivadas de un precursor molecular y que, a menudo, difieren en sólo uno o dos aminoácidos ácidos en la secuencia primaria (Raikos *et al.*, 2006).

La albúmina de huevo es reconocida como una excelente fuente natural de proteínas, que contiene todos los aminoácidos esenciales con alta biodisponibilidad que se incrementa de 65% en el huevo crudo a 95% cuando se somete a tratamientos térmicos. Presenta, además, una serie de lípidos en forma de trazas (0,02%) y carbohidratos que están presentes en forma libre y representan un 0,4% del peso total. La mayor porción inorgánica de la albúmina de huevo la representan azufre, potasio, sodio y cloro. (Seuss-Baum, 2007).

Las principales proteínas se describen a continuación:

Ovoalbúmina: Es la proteína más abundante y central en las propiedades funcionales de la albúmina de huevo. Es una fosfoglicoproteína globular homotetramérica formada por 386 aminoácidos, la mitad de ellos, hidrofóbicos. La secuencia incluye 6 cisteínas (cys) y tanto estos aminoácidos como el puente disulfuro y los sulfidrilos libres, se encuentran en el interior de la proteína (Huntington *et al.*, 2001).

La estructura terciaria de la ovoalbúmina incluye cuatro moléculas de ovoalbúmina cristalográficamente independientes y denominadas A, B, C y D que varían por 2-3 Å la posición del rulo central reactivo (Stein *et al.*, 1991).

Se ha encontrado que la ovoalbúmina purificada contiene tres tipos de moléculas: A1, A2, y A3 en la relación de 85:12:3, que se diferencian por la cantidad de sitios fosforilados: dos, uno y ninguno respectivamente. El grado de fosforilación es probablemente el responsable de los múltiples puntos observados en la electroforesis de la ovoalbúmina (Guérin Dubiard *et al.*, 2006).

La ovoalbúmina se expresa a partir de genes X e Y con Y-polimorfismo que ocurren debido a procesos de empalme alternativo en eventos casuales que llevan a saltarse un exón. (Guérin-Dubiard *et al.*, 2006). Estos genes se expresan en el oviducto de gallina bajo el control de hormonas esteroideas (Heilig *et al.*, 1980, Guérin-Dubiard *et al.*, 2006, Lechevalier *et al.*, 2007). Se encuentran en una región de 40 kb en el genoma de la gallina en el orden 5'-X-Y-ovoalbúmina-3' y comparten secuencias homólogas que han evolucionado de un ancestro común por eventos de duplicación. Los genes se expresan en

una proporción de ovoalbúmina:Y:X de 100:10:1. (Lechevalier *et al.*, 2007).

Por otra parte y producto del envejecimiento de los huevos se ha encontrado una forma alternativa de la ovoalbúmina con mayor grado de estabilidad y conocida como S-ovoalbúmina con mayor temperatura de desnaturalización.

La ovoalbúmina tiene muchas de las propiedades de una proteína alergénica ya que es resistente a la digestión enzimática, es soluble en agua y se mantiene estable frente a los tratamientos térmicos. La reacción más común a esta proteína es un tipo de reacción que involucra la inmunoglobulina E. Solo la pérdida de la estructura secundaria afecta la alergenicidad (Mine y Zhang, 2002). Hasta ahora para evitar la alergia se debe prescindir del consumo de huevo o productos que lo contienen (Mine y Yang, 2008).

A partir de la hidrólisis enzimática de ovoalbúmina se han identificado péptidos bioactivos, en su mayoría con actividad antihipertensiva espontánea en ratas: ovokinina (FRADHPFL: Phe-Arg-Ala-Asp-His-Pro-Phe-Leu) y ovokinina 2-7(RADHPF: Arg-Ala-Asp-His-Phe-Leu) con actividad inhibitoria media (IC₅₀) de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), de 3,2

μM y $6,2 \mu\text{M}$ respectivamente. La ovokinina resulta en la formación de RADHP, que posee una IC_{50} de $257 \mu\text{M}$ (Miguel *et al.*, 2006). Por otra parte Dávalos *et al.*, (2004) reportan el péptido YAEERYPIL (Tyr-Arg-Glu-Glu-Arg-Tyr-Pro-Ile-Leu), que además de ser un fuerte inhibidor de la ECA con una IC_{50} de $4,7 \mu\text{M}$) mostró alta actividad de captación de radicales libres equivalente a $3,8 \mu\text{M}$ de trolox por micromol de péptidos y el péptido IVF (Ile-Val-Phe) con una IC_{50} de $33,1 \mu\text{M}$.

También Chen *et al.*, (2012) han identificado dos secuencias de péptidos con actividad antioxidante: YLGAK (Tyr-Leu-Gly-Ala-Lys) de $551,54 \text{ Da}$ y GGLEPINFQ (Gly-Gly-Leu-Glu-Pro-Ile-Asn-Phe-Gln) de $974,55 \text{ Da}$ que mostraron $7,48$ y $6,02$ veces mayor actividad captadora de radicales en comparación con 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) y Pellegrini *et al.* (2004) péptidos con actividad antimicrobiana: SALAM (residuos 36-40), SALAMVY (residuos 36-42), YPILPEYLQ (residuos 111-119), ELINSW (residuos 143-148) y NVLQPSS (residuos 159-165), AEERYPILPEYL (residuos 127-138), GIIRN (residuos 155-159) y TSSNVMEER (residuos 268-276). Estos investigadores demostraron que estos péptidos fueron muy activos frente a *Bacillus subtilis*.

Ovotransferrina: Es una glicoproteína monomérica que consiste en 686 aminoácidos. Está constituida por una sola cadena polipeptídica y puede existir en equilibrio bajo tres formas de diferente contenido: dos, uno o ningún átomo de Fe (III) por molécula (Carraro, 2006).

Se forma en el oviducto proximal (mago e istmo) y en menor magnitud en el oviducto distal (istmo y útero) y una de sus funciones es evitar el crecimiento de *Salmonella* y otros microorganismos en la albúmina (Gantois *et al.*, 2008).

Puede presentarse con diferentes formas poliméricas, Kinoshita *et al.*, (2002) han reportado fenotipos electroforéticos derivados de tres secuencias genéticas: A, B y C.

Estudios recientes han identificado en esta proteína el péptido bioactivo RVPSL con actividad inhibidora de ECA en IC₅₀ de 20 μM (Liu *et al.*, 2010).

La ovotransferrina es sensible a la desnaturalización térmica pero menos sensible a la desnaturalización superficial que la ovoalbúmina (Donovan *et al.*, 1975).

Ovomucoide: Es una glicoproteína viscosa altamente glicosilada constituye un mecanismo de defensa antimicrobiano

al inhibir tripsina y otras serín-proteasas bacterianas (Winiarska y Kwiecién, 2007).

Ovomucina: es una glicosulfoproteína con un 30% de carbohidratos que contribuye a la estructura gelatinosa de la albúmina. Se asocia con frecuencia a otras proteínas de la clara como la ovoalbúmina, la ovotransferrina y especialmente, la lisozima.

Es una proteína de alto peso molecular, insoluble que contribuye a la estabilidad de la espuma de albúmina de huevo.

Lisozima: Es una proteína básica que presenta una estructura globular constituida por una sola cadena polipeptídica con cuatro hélices α y una lámina β . La secuencia de aminoácidos es de 129 residuos unidos por cuatro puentes disulfuro, que contribuyen a su estabilidad, pero ningún grupo sulfidril libre. Posee estructura tridimensional y una actividad enzimática β -glucosaminidasa que actúa sobre los enlaces glucosídicos de la pared celular bacteriana (Carraro, 2006).

La reducción de más de 2 de los enlaces disulfuro resulta en una pérdida de bioactividad, sin embargo, mejora significativamente las propiedades funcionales incluyendo la gelificación y la formación de espuma (Hoppe, 2010).

1.3. Proceso de elaboración de albúmina de huevo

Los productos derivados de la albúmina se obtienen previa eliminación de la cáscara, las membranas y la yema de huevo. La conversión de albúmina líquida en polvo es un proceso específico que comienza con el desglucosado por bacterias o levaduras o mediante la enzima glucosa oxidasa para evitar las reacciones de Maillard entre las proteínas y la glucosa.

El proceso de secado por atomización (secado spray) se inicia con la introducción de la albúmina de huevo líquida, en la cámara de pulverización, en forma de fino aerosol donde entra en contacto con una corriente de aire caliente. El tamaño de las pequeñas gotas (10-200 micras) permite el uso de tiempos cortos de secado. La albúmina de huevo en polvo se recoge en la parte inferior de la cámara y pasa a través de un sistema de serpentines de enfriamiento, después se envasa en bolsas o cajas de cartón y se coloca en estanterías de acero. Finalmente se pasteuriza en salas de aislamiento a temperaturas entre 50-85°C durante un máximo de 10 días, mediante corriente de aire con un contenido de humedad adecuado, que favorece la formación de agregados solubles, proveniente de arocalentadores con vapor saturado. El producto tiene una humedad del 6%, y un pH entre 7 y 9. En la Figura 3 se muestra el diagrama del proceso:

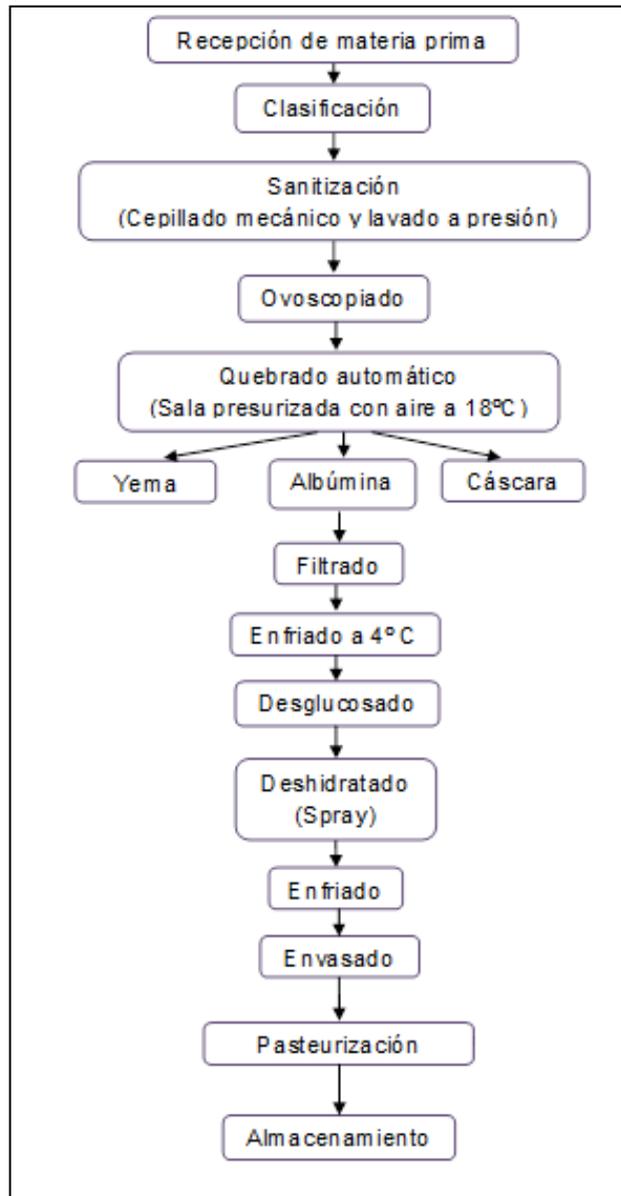


Figura 3. Diagrama de flujo de obtención de albúmina de huevo deshidratada.

En Argentina, recién en este año, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria definió y normatizó estos productos en el Reglamento de Inspección de Productos, Subproductos y derivados de origen animal, capítulo 22, mediante la Resolución N° 154 del 16/04/2013, como se detalla:

“Ovoproductos

22.5.1 Se entiende por ovoproductos a los productos obtenidos a partir del contenido de los huevos, despojados de sus cáscaras.

Los componentes desprovistos de sus membranas, podrán estar en diferentes proporciones con o sin el agregado de aditivos autorizados.

Se podrán presentar en estado líquido, concentrado, deshidratado, en escamas, congelado o ultra congelado.

Ovoproductos deshidratados

22.5.4 Se entiende por huevo deshidratado o desecado, al huevo líquido privado de la mayor parte de su humedad.

Ovoproductos deshidratados comestibles

22.5.5 Al obtenido a partir de huevos comestibles, procesados en forma adecuada y que hayan sido sometidos a la acción de un proceso térmico de pasteurización.

Pasteurización de ovoproductos deshidratados

22.5.7 Consiste en el tratamiento térmico del ovoproducto deshidratado en especial albúmina, a una temperatura de por lo

menos cincuenta y cinco grados centígrados (55°C) durante siete (7) días ininterrumpidos, o hasta la desaparición de microorganismos patógenos”.

1.3.1. Productos derivados de albúmina de huevo

Para obtener albúmina con propiedades de batido, la clara de huevo se deshidrata conjuntamente con estabilizantes y agentes espumantes, para luego ser pasteurizada. Se obtiene un polvo que demuestra muy buenas propiedades de formar espumas, comparables a los de la albúmina de huevo líquida, con el mismo pH. Se usa principalmente en productos de panadería y repostería así como en dulces (turrónes, merengues, espumas de chocolate, baños de alfajores, postres especiales de merengues italianos, fondant, etc.) que requieren propiedades de batido y estabilidad de la espuma.

Las proteínas de la albúmina de huevo son, indudablemente, los principales agentes espumantes en muchos productos alimentarios, debido a que son fuertemente adsorbidas en la interfase agua-gas, brindan una buena estabilización estérica y electrostática, y la película adsorbida presenta cierta coherencia estructural evitando la coalescencia (Murray y Ettelaie, 2004).

Kato *et al.*, (1990) revelaron que el calentamiento de la albúmina de huevo en estado seco causa un aumento sustancial en su flexibilidad molecular y en la hidrofobicidad de superficie, lo que genera más rápido desarrollo de la espuma y una mayor interacción intermolecular en la interfase formando una mayor cohesión en la película y Van der Plancken *et al.*, (2007) demostraron que es necesario mantener contenidos de humedad relativamente bajos (próximo a 6%) para obtener un polvo con alta solubilidad y adecuada capacidad de formación de la espuma (Van der Plancken *et al.*, 2007).

Por otra parte, el producto obtenido cuando se aplican temperaturas entre 70 y 80°C a pH 7 con o sin el agregado de cloruro de sodio, se denomina polvo de albúmina alto gel que se usa como un agente vinculante con una fortaleza de gel mucho mayor a la albúmina de huevo líquida, manteniendo el mismo pH durante la desnaturalización inducida por calor. El polvo de albúmina alto gel coagula en un entramado pseudo cristalino opaco de muy buena resistencia al estiramiento, torsión y corte, al contrario de la albúmina de huevo fresco que coagula como un material amorfo. Esto se debe a que este tratamiento térmico genera ovoalbúmina parcialmente desplegada y desaminada que resulta en la formación de una matriz de gel ordenado (Matsudomi *et al.*, 2001). Se utiliza principalmente en productos

cárnicos (embutidos, salchichas, jamones), pescados (barras de surimi, o de cangrejo), mezclas de papas, en las que se requiere buena vinculación y retención de agua y además, para producir emulsiones de base aceite muy estables.

La ovoalbúmina y la ovotransferrina juegan un papel importante en la formación del gel. Estas proteínas se convierten en primer lugar a proteína desnaturalizada y luego construyen agregados insolubles de alto peso molecular a través de interacción intermolecular iónica, hidrofóbica y enlaces disulfuro (Kaewmanee *et al.*, 2012).

Pouzot *et al.* (2005) comprobaron que el grado de agregación es altamente dependiente de la temperatura pero la estructura de los agregados no depende de este factor sino del tipo de proteína globular, del pH y de la fuerza iónica. Y también demostraron que el grado de ramificación aumenta cuando los agregados se superponen y conducen a la formación de gel, en concentraciones superiores a 60 g / l de proteínas.

El gel más firme de albúmina de huevo se obtiene cuando se añade una concentración de 0,05-0,1 M de cloruro de sodio por inducción de interacción hidrofóbica o interacción iónica (Holt *et al.*, 1984).

Para la industria alimentaria, los productos de huevo deshidratados ofrecen ventajas frente al huevo en cáscara:

- Mayor versatilidad de uso.
- Fácil empleo y dosificación.
- Eliminación de los residuos que acarrearán las cáscaras.
- Mayor seguridad bacteriológica.
- Manipulación más sencilla: fácil almacenamiento, mayor vida útil, ahorro de tiempo y de mano de obra.
- Facilitan la distribución y el comercio internacional.

1.4. Producción mundial de productos de huevo

La producción mundial de productos derivados del huevo se estima en 4,8 millones de toneladas anuales en equivalente a huevos con cáscara. En Europa existe un potencial para producir casi 2 millones de toneladas, de los cuales aproximadamente 1,8 millones corresponden a los países miembros de la Unión Europea (UE), lo que implica que uno de cada cuatro huevos

podrían ser derivados a las industrias procesadoras (Global Poultry Trends, 2011).

En el continente americano el 20% de los huevos producidos se transforman industrialmente. La producción total en la región es de 2 millones de toneladas (alrededor del 42% del total mundial), de los cuales 1,6 millones se procesan en Estados Unidos y unas 340.000 toneladas en América del Sur (Global Poultry Trends, 2011)

En Argentina, la avicultura especializada en la producción de huevos para consumo directo y productos de huevo, luego de la crisis del año 2002, está creciendo en forma sostenida a razón del 3% anual, con un incremento de las exportaciones de hasta un 20% anual. En la actualidad, Argentina cuenta con alrededor de 33 millones de gallinas en producción, ubicadas especialmente en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos, alcanzando una producción estimada de huevos de 9000 millones de unidades en el 2009 (Nazar, 2009). Entre Ríos participa con el 21% de la producción de huevos a nivel nacional y procesa el 27% del huevo que se industrializa en Argentina (Schell, 2010).

La elaboración de productos de huevo se ha estimado, para este año en 90.000 toneladas. Tanto en el consumo de huevo fresco como de ovoproductos se puede observar un crecimiento sostenido que se proyecta para el 2015 en 210 toneladas y un aumento del consumo de 18 huevos por persona por año. También se avizora un incremento en la producción y procesado de huevos proyectado para el 2015 en un 15% (Schell, 2010).

El reconocimiento del status sanitario “libre de New Castle” y “libre de Influenza Aviar” avizora un aumento de la producción, sobre todo para exportación.

Sin embargo, bajo el sistema de producción de huevos con gallinas alojadas en jaulas, se incrementa la transmisión de enfermedades y las gallinas están más expuestas a depredadores, aves silvestres y focos de infección. La contaminación microbiana relacionada con la presencia de bacterias del género *Salmonella* es la principal preocupación de la industria del huevo.

2. Contaminación por *Salmonella* en albúmina de huevo

Durante los tres últimos decenios, *Salmonella entérica* ha surgido como la causa principal de infecciones humanas en

muchos países y los huevos de gallina son una de las principales fuentes de este agente patógeno atribuido a la excepcional afinidad de algunas variantes séricas con el tejido ovárico de las gallinas y estar presentes en el contenido de los huevos con cáscara intacta así como a la capacidad de supervivencia en el ambiente y a la resistencia a condiciones extremas.

2.1. El género *Salmonella*

El género *Salmonella* se incluye en la familia *Enterobacteriaceae*, Orden *Enterobacteriales*, Clase γ -*Proteobacteria*. La nomenclatura del género ha progresado hasta llegar a nuestros días donde los métodos moleculares han mostrado que existen dos especies: *Salmonella enterica* con 6 subespecies y 2557 serovariedades y *Salmonella bongori* con 22 serovariedades. Las subespecies de *Salmonella enterica* se designan por números romanos y se denominan: *Salmonella enterica* subespecie *enterica* (I), *Salmonella enterica* subespecie *salamae* (II), *Salmonella enterica* subespecie *arizonae* (IIIa), *Salmonella enterica* subespecie *diarizonae* (IIIb), *Salmonella enterica* subespecie *houtenae* (IV) y *Salmonella enterica* subespecie *indica* (VI) (Guibourdenche *et al.*, 2010; Hendriksen, 2010).

El género *Salmonella* está integrado por bacilos de 0,7 a 1,5 de ancho y 2,0 a 5,0 µm de largo, Gram negativos aeroaerobios facultativos, que se comportan como patógenos intracelulares facultativos (Figueroa y Rodríguez, 2005).

Estas especies y subespecies se pueden distinguir sobre la base de caracteres diferenciales como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Caracteres diferenciales de especies y subespecies de *Salmonella*.

Pruebas bioquímicas	<i>S. enterica</i> subesp. <i>enterica</i> (I)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>salamae</i> (II)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>arizonae</i> (IIIa)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>houtenae</i> (IV)	<i>S. enterica</i> subesp. <i>indica</i> (VI)	<i>S. bongori</i> (V)
Dulcita	+	+	-	-	-	d	+
ONPG	-	-	+	+	-	d	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatina	-	+	+	+	+	+	-
Sorbita	+	+	+	+	+	-	+
KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+) tartrato	+	-	-	-	-	-	-
Mucato	+	+	+	- (70%)	-	+	+
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactosa	-	-	- (75%)	+(75%)	-	d	-
Habitat de la mayoría de las cepas	Animales de sangre caliente		Animales de sangre fría y medio ambiente				

+ 90% ó más de los resultados positivos; - 90% ó más de los resultados negativos; d: diferentes reacciones

Fuente: Caffer y Terragno, (2001)

De acuerdo con sus características antigénicas, las bacterias del género *Salmonella* se clasifican en serogrupos y serotipos que están definidos en función de diferentes asociaciones de factores antigénicos somáticos O (lipopolisacárido de la pared

celular) y flagelares H (antígeno proteico, difásico o monofásico). Los nombres de las serovariedades están condensados en el Esquema de Kauffmann-White, publicado por el “Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS), de Referencia e Investigación de *Salmonella*”, del Instituto Pasteur de París (Grimont *et al.*, 2007).

Dado que las serovariedades no tienen nivel taxonómico de especie, sus nombres, escapan al dominio del “Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana” y por ello se escriben en letra tipo romano, no en itálica, de la siguiente manera: *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Typhimurium; a los fines prácticos: *Salmonella* Typhimurium. Este sistema de nomenclatura se utiliza hoy en día para llevar uniformidad en la presentación de informes (Lan *et al.*, 2009; Pui *et al.*, 2011) y es el utilizado en esta tesis.

En *S. enterica* se pueden distinguir dos grupos de factores de virulencia, por un lado estructuras superficiales, dianas del sistema inmune del hospedador y por otro, genes de virulencia localizados en el cromosoma o en plásmidos y que codifican factores que modifican la fisiología celular del hospedador o que protegen a la bacteria de los sistemas antimicrobianos del mismo. En la Figura 4 puede observarse la localización de

factores de virulencia representativos de *S. enterica* y algunos de los genes implicados.

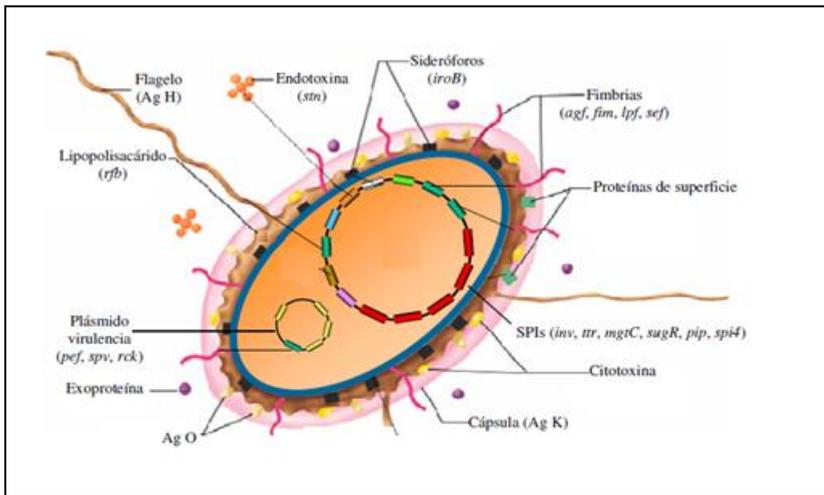


Figura 4. Factores de virulencia representativos de *Salmonella*.

Fuente: Martínez (2007)

Las siglas entre paréntesis y cursiva indican el gen.

Debido a una regulación coordinada y precisa de los genes de virulencia la *Salmonella* logra adaptarse a cambios ambientales que se le presentan durante el proceso infeccioso tanto en los seres humanos como en las aves (Marcus *et al.*, 2000). La virulencia diferencial de las cepas de *Salmonella* Enteritidis es debida al efecto de los ambientes adversos que se pueden encontrar durante la infección en el hospedero (Shah *et al.*, 2012)

De los serotipos de *Salmonella* spp. identificados, sólo una pequeña proporción (aproximadamente un 10%) son comunes en la producción avícola y guardan relación epidemiológica con los aislados de los seres humanos (Gast, 2007).

Los serotipos de *Salmonella* causantes de enfermedades en los seres humanos constituyen un tema prioritario para la salud pública y el rol de los alimentos en su diseminación debe ser seriamente considerado por la industria alimenticia para ejercer el control sobre estos microorganismos.

2.2. Contaminación de la albúmina en el huevo

Entre las bacterias del género *Salmonella* con características zoonóticas existen varias especies que están bien adaptadas a las aves y que, con frecuencia, consiguen invadir órganos, colonizar y permanecer en ellos sin provocarles enfermedad o alteraciones visibles. Esta situación es común para algunos serotipos como *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*; *S. Hadar*, *S. Heidelberg*, que son precisamente los serotipos prevalentes y los que están más relacionados con brotes de toxi-infecciones de origen alimenticio (Pinheiro do Nascimento *et al.*, 2011).

Salmonella Enteritidis puede transmitirse tanto verticalmente desde las parvadas de aves reproductoras hacia las

parvadas de gallinas ponedoras comerciales como horizontalmente de otras gallinas ponedoras, del pienso y/o del medio ambiente. En considerable medida, la presencia de *Salmonella* en una parvada de gallinas ponedoras y/o parvada de gallinas reproductoras aumenta significativamente la posibilidad de la *Salmonella* en el huevo (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2007).

Los alimentos balanceados para aves de corral son reconocidos como una fuente importante de infección por *Salmonella* (Jones y Richardson 2004, Carrique-Mas *et al.*, 2006). Las salmonelas se pueden introducir en los alimentos vehiculizadas por los ingredientes contaminados provenientes de entornos de fabricación, almacenamiento y distribución, o bien portadas por aves silvestres y roedores (Koyuncu *et al.*, 2013).

Por otra parte, *Salmonella* puede, en algunas circunstancias, multiplicarse en los alimentos especialmente en presencia de humedad y alta temperatura, lo que puede ocurrir durante el almacenamiento o por medidas erróneas de gerenciamiento de la granja (Carrique-Mas *et al.*, 2006).

En las gallinas ponedoras la principal vía de transmisión de *Salmonella* es la fecal-oral y raramente se presentan signos de la

enfermedad cuando las aves se infectan continuando, normalmente, su postura y alimentación (Humphrey, 1993).

Gantois *et al.*, (2009) plantea tres posibles rutas de contaminación de los huevos:

a) La transmisión horizontal ocurre cuando la bacteria penetra a través de la cáscara durante la oviposición, al pasar el huevo por la cloaca o bien después de la oviposición por un proceso de succión debido a la diferencia térmica existente entre el huevo recién puesto y el ambiente. Este proceso ocurre más frecuentemente en gallinas mayores de 1 año, debido a que los poros de la cáscara son de mayor tamaño. Después que se ha formado la cáscara las salmonellas pueden establecerse en el interior del huevo antes de que se desarrolle en la superficie la barrera de proteína (denominada cutícula) que previene la invasión de las bacterias, cuestión también planteada por Rincón *et al.*, (2011).

b) La transmisión vertical ocurre por contacto directo con la yema, la albúmina, las membranas y la cáscara del huevo antes de la oviposición, en este caso las salmonellas proceden de una infección de los órganos reproductores. La colonización de los ovarios está comprobada en *S. Enteritidis* y también, aunque en

menor medida en *S. Typhimurium* (Terzolo, 2011). El ovario y el oviducto superior son los órganos primordiales de colonización para algunos de los serotipos de *Salmonella* (Gast y Guard, 2011).

Tanto la yema como la albúmina de huevo, en desarrollo, pueden resultar contaminados por *S. Enteritidis*, según cuáles sean las regiones del tracto reproductivo que han sido colonizadas. La incidencia de contaminación interna del huevo por *S. Enteritidis* es baja e involucra la presencia inicial de un pequeño número de células bacterianas (Gast y Guard, 2011).

Aunque varios estudios informaron que la membrana vitelina es el sitio más común de contaminación por *Salmonella* (Gast y Holt, 2000; Gast *et al.*, 2002), otros informes han señalado a la albúmina como el sitio principal de contaminación de los huevos (Shivaprasad *et al.*, 1990; Humphrey *et al.*, 1991).

c) La transmisión lateral es otra ruta propuesta por Gantois *et al.*, (2009) y se refiere a la contaminación que ocurre después de la oviposición y después que el huevo se ha enfriado, dado que la manipulación del huevo en cualquier ambiente contaminado puede conducir a la contaminación de la cubierta exterior. La presencia de estiércol y otros materiales orgánicos

húmedos facilita la supervivencia y el crecimiento de *Salmonella*, proporcionando los nutrientes necesarios y un cierto grado de protección física por lo que pueden ser fuente de contaminación de los huevos. La reutilización de maples descartables o el uso cubetas sin desinfectar son una fuente muy importante de contaminación de los huevos en las granjas y los comercios (Viora *et al.*, 1993). Otras fuentes de *Salmonella* pueden ser el alimento, agua e instalaciones o por medio de vectores, donde se incluyen los seres humanos.

Las bacterias pueden penetrar fácilmente a través de la cáscara de huevo agrietada aunque también en el huevo intacto a pesar de que éste posee barreras físicas como la cutícula, la membrana cristalina y las membranas de la cáscara.

A medida que el huevo envejece, la membrana vitelina se permeabiliza y el hierro contenido en la yema difunde hacia la albúmina que, al mismo tiempo, disminuye su contenido de sustancias antibacterianas, permitiendo así la multiplicación expansiva de algunos serotipos de *Salmonella enterica*.

En la Figura 5 se muestra una representación esquemática de la patogénesis del huevo mediada por esta forma de transmisión.

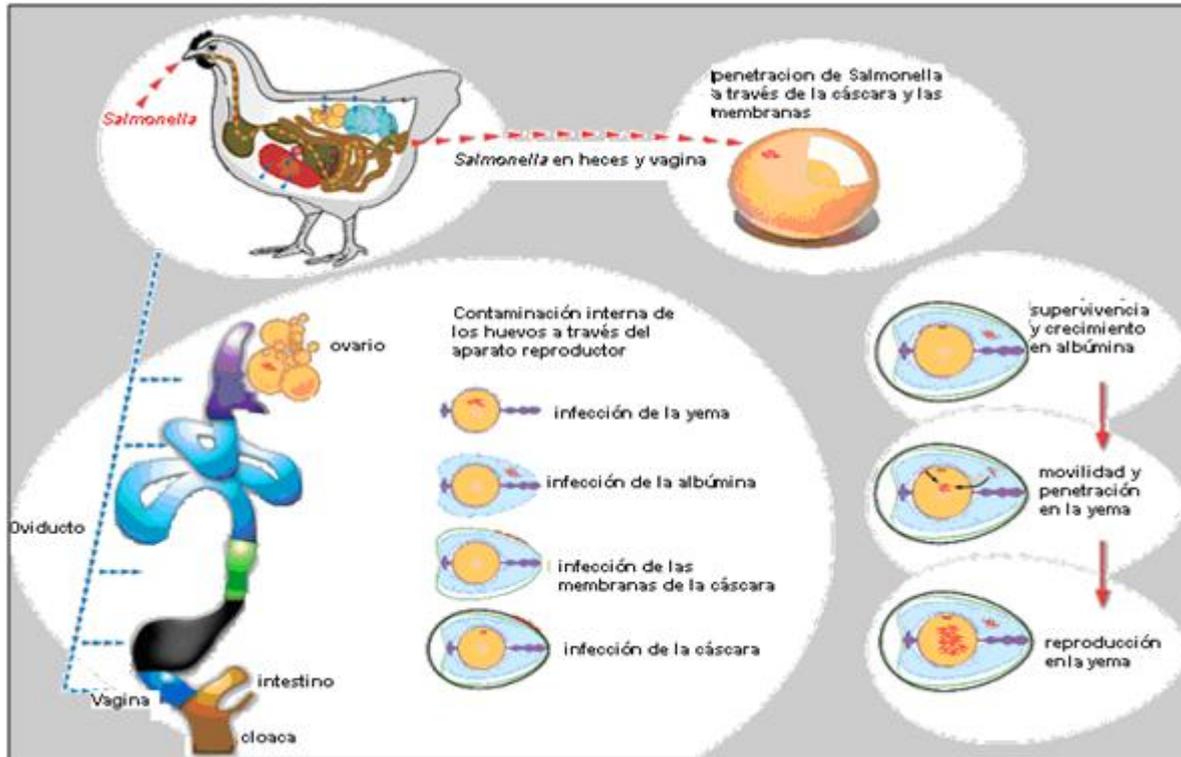


Figura 5. Factores de virulencia representativos de *Salmonella*.
Adaptado de Gantois *et al.*, 2009.

De estas formas de transmisión, la vertical es la de mayor importancia (Hammershøj *et al.*, 2006), debido a la capacidad especializada de *Salmonella* Enteritidis de colonizar el tracto reproductivo aviar y de contaminar el contenido interno de los huevos es que éstos o los productos de huevo han sido implicados en la mayoría de los brotes de origen alimentario en todo el mundo (Shah *et al.*, 2012).

2.3. Fuentes de contaminación de la albúmina de huevo en la industria procesadora

Salmonella puede ingresar a la industria tanto desde el interior del huevo como desde la cáscara donde puede sobrevivir y proliferar aún en ausencia de materia fecal contaminada, especialmente con bajas temperaturas y alta humedad relativa (Messens *et al.*, 2006) aunque con el metabolismo más lento debido a las desfavorables condiciones en la superficie de la cáscara del huevo (Gantois *et al.*, 2009). Se ha demostrado que *Salmonella* Enteritidis puede persistir durante largos periodos en huevos almacenados a temperatura ambiente (Rincón *et al.*, 2011).

Con respecto a la albúmina, varios autores reportan que observaron desarrollo de *Salmonella* Enteritidis en este componente del huevo cuando se almacenaba a temperatura

ambiente (Schoeni *et al.*, 1994; Braun y Fehlhaber, 1995; Dubocage *et al.*, 2001; Pinto *et al.*, 2009), lo que indica que esta bacteria posee características intrínsecas para contrarrestar los ataques de los componentes antimicrobianos presentes en la albúmina de huevo (Gantois *et al.*, 2009, Van Immerseel, 2010). Otros autores han descrito que la albúmina actúa como bactericida hasta 7 días después de la postura, mientras que posteriormente tendría acción bacteriostática (Humphrey *et al.*, 1991).

En los huevos frescos, sólo unas pocas células de *Salmonella* están presentes y como la albúmina es un entorno con restricción de hierro, el crecimiento sólo se producirá una vez que la permeabilidad de la membrana vitelina les permita invadir el contenido de la yema. Cuando esto sucede se alcanzan altos niveles poblacionales debido a la transferencia del hierro desde la yema hacia la albúmina y al descenso de los niveles de la lisozima y otros inhibidores bacterianos en la albúmina. En huevos de gallinas infectados naturalmente se ha encontrado que contienen un gran número de *S. Enteritidis*. La tasa de cambio en la permeabilidad de la membrana depende de la temperatura (Humphrey, 1994).

En cada etapa de la producción, procesamiento y envasado de la albúmina de huevo deshidratada hay riesgo de contaminación con *Salmonella* (Mukhopadhyay *et al.*, 2010), además durante el secado por atomización diversos factores pueden influir la supervivencia de *Salmonella* en el producto final (Podolak *et al.*, 2010). Se ha demostrado que esta bacteria puede ingresar a alimentos de baja actividad de agua a través de la línea de producción, por contaminación cruzada a través de operarios que transitan desde la zona sucia a la zona limpia y por el uso de agua en la limpieza industrial que es un factor clave para el aumento del número de células (Podolak *et al.*, 2010).

Debido a la capacidad del patógeno para sobrevivir durante prolongados períodos en acero inoxidable, vidrio, y superficies de plástico, se ha reconocido el riesgo de la contaminación cruzada a través de dichas superficies (Gruzdev *et al.*, 2011). Su persistencia en equipos, maquinaria, mampostería de una industria alimentaria es debida a su habilidad de formar biopelículas debido a su capacidad de adquirir formas filamentosas que no implican cambios en la membrana (Kieboom *et al.*, 2006).

Silva y Lopez (2012) han publicado que en la mayoría de los aislamientos de *Salmonella* los genes involucrados en la formación de biopelículas se expresan bajo condiciones de baja osmolaridad, limitación nutricional y temperatura por debajo de los 30°C y sus productos de expresión son importantes para la persistencia y supervivencia en ambientes fuera del hospedador.

Estas bacterias resisten hasta 60 ppm de hipoclorito de sodio, comparadas con aquellas que no expresan estos genes, lo que sugiere que la producción de un exopolisacárido principal de la matriz de la biopelícula (como celulosa) les permite resistir la acción del desinfectante, así como la desecación, y de esta manera permite la supervivencia bacteriana en superficies de plástico, cemento o acero (Joseph *et al.*, 2001; Chmielewsky y Frank, 2003, Lasa *et al.*, 2006). Esto también se debe a que, esta bacteria, posee estructuras fimbriales que le facilitan la adhesión a las superficies inanimadas, proporcionando a las células cierta capacidad de resistencia frente a fuerzas mecánicas (Joseph *et al.*, 2001).

Podolak *et al.*, (2010) indica que se ha demostrado que *Salmonella* spp. puede sobrevivir por semanas en agua y por años sobre superficies si las condiciones ambientales tales como temperatura, humedad, y el pH son favorables.

Todo esto sustenta la posibilidad de contaminación de la albúmina deshidratada en la industria procesadora de huevos y un potencial riesgo para la salud pública dado que en alimentos de baja humedad se ha informado que niveles tan bajos como <1UFC/g de células de *Salmonella* han sido capaces de producir enfermedad dependiendo del huésped, el producto y el serotipo (Podolak *et al.*, 2010).

2.4. Incidencia de la salmonelosis

La incidencia de *Salmonella* en el mundo no ha declinado, por el contrario se ha incrementado y se reporta que el 80% de los casos de salmonelosis en seres humanos están relacionados con el consumo de huevos.

Los alimentos deshidratados y con baja actividad de agua tales como la leche deshidratada, fórmulas para infantes, chocolate, manteca de maní, pistachos, si bien no permiten el desarrollo de *Salmonella* spp. han estado involucrados en brotes de enfermedades durante los últimos años (Podolak *et al.*, 2010).

Por otra parte, varias investigaciones reportan sobre la asociación entre *S. Enteritidis* con brotes de enfermedad transmitida por alimentos en seres humanos en particular aquellos asociados con huevo y productos de huevo (Shirota *et*

al., 2001, Patrick *et al.*, 2004; Murase *et al.*, 2006; Gantois *et al.*, 2009).

2.4.1. Incidencia en la Unión Europea

Según la OMS, alrededor del 75% de las nuevas enfermedades que han afectado a los seres humanos en los últimos 10 años han sido causadas por patógenos procedentes de animales o transmitidos a través de productos de origen animal.

En el Informe del año 2012 de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) se han resumido las tendencias epidemiológicas y las fuentes de origen de las zoonosis, los agentes zoonóticos y los brotes de origen alimentario que han ocurrido en el año 2010. En ese año, en la Unión Europea (UE), se confirmaron un total de 99.020 casos, con una disminución de un 8,8% respecto al año anterior. La tasa de notificación de casos confirmados para *Salmonella* spp. fue de 21,5 casos por cada 100.000 habitantes y la tasa de letalidad de un 0,13%. Como en años anteriores, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* fueron los serotipos más frecuentes (45% y 22,4%, respectivamente), de todos los serotipos conocidos procedentes de casos humanos.

En la Figura 6 se muestra la reducción observada en los casos de salmonelosis en seres humanos, en gallinas ponedoras, en huevos y productos de huevo. La EFSA informa que se supone que se debe principalmente al éxito de los programas de control de *Salmonella* en aves de corral, pero aclaran que otras medidas de control también puede haber contribuido a la reducción (EFSA, 2012).

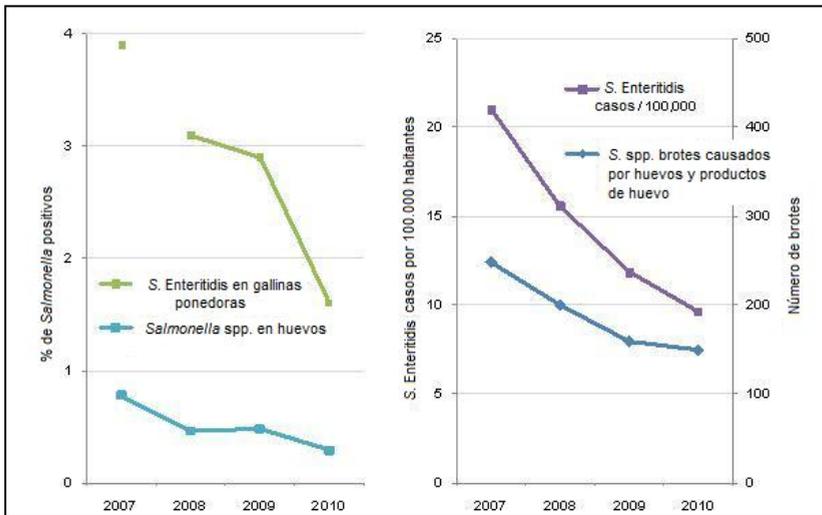


Figura 6. Casos de salmonelosis en humanos, huevos y número de brotes causados por huevos en la UE desde 2007-2010.

Fuente: adaptado de EFSA (2012)

2.4.2. Incidencia en América

En Estados Unidos el Centro de Control de Enfermedades y Prevención (CDC, 2011) en un informe que resume los datos

del año 2010 señala que los alimentos contaminados causaron 1.000 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos con 48 millones de enfermos, 128.000 hospitalizaciones y 3.000 muertes.

La infección por *Salmonella* fue la más común (17,6 casos por cada 100.000 habitantes) y se asoció con el mayor número de hospitalizaciones: 2.290 y 29 muertes. Este organismo también informa que no se han producido cambios significativos en la incidencia de la salmonelosis desde que se inició la vigilancia, en ese país, en los años 1996-1998, si bien se ha presentado un leve incremento en el 2010.

En Brasil, los datos ofrecidos por la Secretaria de Vigilancia en Salud mostraron los casos y agentes etiológicos donde, de 2.834 casos reportados desde 1999 a 2007, 42% fueron debidos a *Salmonella* spp. y más de un 4,1% a *S. Enteritidis*. Datos publicados por la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA) en enero de 2008 (mostrando lo sucedido en 2007) citaron a 460 personas afectadas por *Salmonella* spp. y, dentro de éstas, 378 tuvieron como alimento involucrado en el menú, carne de ave o huevos (Pinheiro do Nascimento *et al.*, 2011).

En Chile, el Instituto de Salud Pública informa que en ese país, durante el año 2011 fueron notificados 974 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), siendo la causa más frecuente la presencia de *Salmonella* spp. (10,2 % de los brotes registrados).

En la Tabla 3 se presentan las principales serovariedades aisladas de material avícola y en orden de prevalencia del aislamiento reportados por Pinherio do Nascimento *et al.*, (2011).

Tabla 3. Principales serovariedades aisladas en países sudamericanos, en orden de frecuencia de aislamiento.

País Fuente	Brasil	Argentina	Uruguay
Material	Enteritidis	Enteritidis	Typhimurium
	Minnesota	Gallinarum	Enteritidis
	Typhimurium	Newport	Derby
	Mbandaka Agona	Typhimurium	Gallinarum
	Infantis	Infantis	Newport
Avícola	Schwarzengrund	Livingstone	Agona
	Tennessee	Bredeney	Glostrup
	Heidelberg	Montevideo	Anatum
	Senftenberg	Javiana	Havana
	-	Oranienburg	Oranienburg

2.4.3. Incidencia en Argentina

En Argentina los casos de salmonelosis no-tifoideas no son de notificación obligatoria. En el período 2009-2010 sobre los episodios de diarrea causados por *Salmonella* spp., se remitieron al Laboratorio Nacional de Referencia de Enterobacterias (LNRE) 981 aislamientos bacterianos de los cuales 936 fueron confirmados como *Salmonella* spp., siendo las serovariedades prevalentes *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Newport*. Si bien el LNRE caracteriza aislamientos de origen humano, animal y de alimentos, estos datos representan un muestreo sesgado sobre la totalidad de los casos ocurridos. En Argentina existe un importante subregistro de salmonelosis (Caffer, 2011).

2.5. Fisiología del género *Salmonella*

Salmonella tiene la capacidad de sobrevivir y adaptarse a condiciones extremas tales como la disminución en los niveles de nutrientes, desecación y un amplio espectro de temperaturas y valores de pH.

2.5.1. Resistencia a la acidez

La respuesta adaptativa frente a la acidez en diversos microorganismos, tanto en Gram positivos como en Gram negativos, es conocida y la respuesta de tolerancia ácida,

inducida cuando la bacterias se exponen en medios ligeramente ácidos seguido de la exposición a pH ácidos, ha sido ampliamente estudiada en *S. Typhimurium*, probablemente debido al buen conocimiento de su genoma y a la capacidad que poseen de sobrevivir en un amplio rango de condiciones de estrés ácido. También se ha descrito para otras serovariedades, como *S. Enteritidis*, *S. Agona*, *S. Gaminara*, *S. Michigan*, *S. Montevideo*, *S. Poona* y *S. Senftenberg* (Alvarez., 2011).

En un estudio Berk *et al.* (2005), demostraron que el uso de ácidos orgánicos para la descontaminación de los alimentos para aves que puede dar lugar a la selección de cepas tolerantes a ácido que tienen más probabilidades de sobrevivir en el medio ambiente y también a la acidez gástrica estomacal en los seres humanos, así como para desarrollar la tolerancia a otros factores de estrés tales como el calor, la ósmosis y sales.

Se ha demostrado que la resistencia bacteriana a condiciones ácidas extremas se ve incrementada cuando se utilizan matrices alimentarias, especialmente, medios con un alto contenido graso o proteico, habiéndose descrito que los brotes de salmonelosis en los que se encuentra una baja dosis infectiva están a menudo asociados con el consumo de alimentos con un elevado contenido en grasa, como chocolate y queso, o

un elevado contenido proteico, como carne picada o clara de huevo (Waterman y Small, 1998).

Varios autores han relacionado la resistencia térmica con la resistencia ácida en algunas serovariedades de *Salmonella* (Humphrey *et al.*, 1995; Doyle y Mazzotta, 2000) que presentan aumento en la capacidad de sobrevivencia en las condiciones estomacales aumentando sus posibilidades de producir infección en los seres humanos (Berk *et al.*, 2005, Da Silva, 2007, Koyuncu *et al.*, 2013).

2.5.2. Supervivencia en alimentos de baja actividad de agua

La baja actividad de agua (a_w) es una barrera para el crecimiento de formas vegetativas de bacterias patógenas, incluyendo *Salmonella*. En general se considera que las bacterias patógenas no crecen por debajo de un valor de actividad de agua de 0,85 y que *Salmonella* no sustenta crecimiento en alimentos con $a_w \leq 0,93$ (Doyle *et al.*, 2001), sin embargo puede rápidamente adaptarse a condiciones extremas tales como la desecación (Podolak, 2010).

Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la supervivencia de *Salmonella* en alimentos secos. Recientemente, en dos estudios, que investigaron los cambios transcriptómicos

durante las primeras etapas de la desecación en *Salmonella* (Li *et al.*, 2012; Finn *et al.*, 2013), encontraron un aumento en la expresión de genes que codifican transportadores de membrana que permiten a las células incorporar sustancias osmoprotectoras del medio. También se ha demostrado la expresión de genes que codifican para porinas de la membrana externa, responsables de la difusión pasiva de estas sustancias.

Finn *et al.*, (2013) demostraron que la biosíntesis del soluto compatible, trehalosa, demostró ser importante en la adaptación osmótica de *Salmonella*. La trehalosa es producida por la condensación enzimática de la glucosa-6-fosfato y UDP-glucosa. En este proceso intervienen las enzimas trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa que son dependientes de un factor sigma alternativo.

Deng *et al.*, (2012) realizaron un estudio que proporcionó una visión inicial sobre los mecanismos empleados para la supervivencia *S. Enteritidis* cuando esta bacteria se cultivó en aceite de maní ($a_w = 0,30$) se encontró que <5% del genoma de esta bacteria se transcribió en comparación con el 78% que lo hizo cuando la bacteria desarrolló en caldo nutritivo. Estos investigadores también observaron un aumento en la

degradación del ARN ribosomal e infirieron que puede servir como fuente de nutrientes para las bacterias estresadas.

Se ha descrito también la habilidad de las salmonellas para cambiar a un estado viable pero no cultivable (VBNC), que representa un estado latente de las células vegetativas y una estrategia de supervivencia para muchas especies bacterianas no esporuladas (Lesne *et al.*, 2000) ya que pueden retornar a su estado normal cuando las condiciones se tornan favorables.

Otros investigadores han planteado la formación de formas filamentosas. Kieboom *et al.*, (2006) mostraron que al reducir la actividad de agua se afectaba la morfología de las células de *Salmonella* Enteritidis que se elongaban y formaban filamentos cuando se incubaban en medios con a_w de 0,94-0,95 a 25°C por 6 días. Finalmente también se ha sugerido, en *S. Typhimurium*, la activación de genes, como el σ^E o vías σ^S , factores sigma alternativos que controlan regulones específicos y que se activan en condiciones de estrés osmótico (Mc Meehan *et al.*, 2007).

2.5.3. Resistencia térmica

El género *Salmonella* está integrado por microorganismos resistentes que se adaptan fácilmente a las condiciones extremas del medio. Crecen activamente en un amplio rango de

temperatura entre 5,5 y 45°C y también exhiben propiedades psicrotróficas, según se refleja en la capacidad de crecer en alimentos almacenados a temperaturas comprendidas entre 2 y 4°C.

Si bien el rango de crecimiento de *Salmonella* se sitúa entre 5,5 y 45° C, la temperatura en la cual se produce la muerte bacteriana depende de la cepa, de su fase de crecimiento, de la composición del alimento o medio de prueba, de otros limitantes físicos como la aw y de la presencia de flora competitiva (Garibaldi *et al.*, 1969). El incremento de sólidos, bajo pH y disminución de la humedad incrementan la resistencia térmica en los alimentos (Doyle y Mazzotta, 2000).

Ciertos serotipos de *Salmonella* son notoriamente resistentes a tratamientos térmicos, el más prominente que se ha reportado es *Salmonella* Senftenberg 775W. Si bien este organismo no es un importante patógeno alimentario, es usado como organismo control (Garibaldi *et al.*, 1969).

Se debe enfatizar, también, que hay estudios que refieren que *Salmonella* presente en huevos deshidratados son extremadamente resistentes a los efectos destructivos del calor con valores D comúnmente medidos en días más que en minutos

(Doyle y Mazzotta, 2000). En la mayoría de los experimentos con huevos, *Salmonella* Enteritidis ha sido más resistente al calor que *Salmonella* Typhimurium, pero no se han obtenido los mismos resultados en medios de cultivo. Estos estudios también indican que las más resistentes han expresado mayor cantidad de proteínas de choque térmico (Shah *et al.*, 1991).

Estas proteínas denominadas con su acrónimo en inglés HSPs, en su mayoría chaperonas y proteasas (GroEL, DnaK, DnaJ, GrpE, recA, entre otras), cuya síntesis se encuentra regulada por el factor alternativo σ^S y otros reguladores transcripcionales, son sintetizadas por estas bacterias para colaborar en el plegamiento, ensamblaje y transporte proteico, así como en la degradación y eliminación de proteínas desnaturalizadas por calor. Sin embargo, el estrés térmico no es el único agente inductor de la síntesis de HSPs, sino que otras condiciones adversas, como bajas temperaturas, irradiación, cambios en la presión osmótica, estrés ácido y estrés oxidativo, incrementan la expresión de varias HSPs, hecho que podría constituir la base de las respuestas bacterianas de protección frente al calor (Alvarez, 2009).

No se conocen estudios sobre la temperatura máxima de crecimiento de *Salmonella* en los alimentos, pero se ha

informado que la exposición prolongada de cepas mesófilas de *S. Typhimurium* a condiciones de estrés térmico se traduce en mutantes capaces de crecer a 54°C. Aunque no se ha esclarecido el mecanismo de este fenómeno, los hallazgos preliminares indican que dos mutaciones independientes son las que permiten a esta bacteria crecer activamente a 48°C y a 54°C (Doyle *et al.*, 2001).

Las condiciones de crecimiento también afectan su resistencia al calor. Las células en fase de desarrollo exponencial son mucho más susceptibles al calor que en fase estacionaria (Humphrey *et al.*, 1993).

Es notable la capacidad de *Salmonella* para adquirir mayor termorresistencia en condiciones subletales. Este fenómeno resulta de una adaptación rápida de este organismo a las temperaturas que se elevan en el microambiente hasta un nivel de tolerancia aumentada muy diferente del descrito en las curvas convencionales de tiempo-temperatura. Esta respuesta adaptativa posiblemente tenga implicancias graves con respecto a la seguridad de los tratamientos térmicos que exponen o mantienen los productos alimenticios a temperaturas marginalmente letales (Doyle *et al.*, 2001). Esta situación podría ocurrir en el secado por atomización de la albúmina de huevo.

La exposición de células de *Salmonella* a temperaturas menores o iguales a 50°C durante un tiempo de 15 a 30 minutos aumenta su termorresistencia debido a una síntesis rápida de proteínas de choque térmico. Los cambios en la composición de los ácidos grasos de las membranas celulares de las células estresadas por el calor proporcionan un mayor porcentaje de fosfolípidos saturados de la membrana y reducen su fluidez con un aumento coincidente de la resistencia de la membrana al daño por el calor (Humphrey *et al.*, 1993). No se descarta que otras funciones celulares protectoras se desencadenen por los estímulos del choque térmico (Doyle *et al.*, 2001).

La tolerancia al calor de *Salmonella* se cree que está estrechamente relacionada con el contenido de agua dentro de la célula. Hiramatsu *et al.*, (2005) han planteado como hipótesis que en un organismo viable, el calor induce una vibración intensa de las moléculas de agua, provocando la rotura de puentes disulfuro e hidrógeno de las proteínas intracelulares. Sin embargo, en una bacteria deshidratada, este fenómeno puede ser limitado sustancialmente debido a la disponibilidad de agua. Estos autores han propuesto que la falta de agua impide la vibración, que a su vez protege a las proteínas celulares de la desnaturalización a temperaturas elevadas. Por otra parte, Gruzev *et al.*, (2011) demostraron que la desecación de células

de *Salmonella* induce mayor resistencia térmica y tolerancia a otros factores de estrés.

La combinación de falta de agua disponible y la aplicación de calor en la albúmina de huevo pueden proporcionar una óptima combinación de condiciones para producir *Salmonella* térmicamente resistentes.

Para verificar la termorresistencia, el Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos del Departamento de Agricultura de Estados Unidos de América (USDA-FSIS, 1999), recomienda el uso de un cóctel o una combinación de serotipos de *Salmonella* que exhiban resistencia al calor relativamente alta y hayan estado implicados en brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (Smith *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2004).

Dada su alta resistencia térmica *Salmonella* es la bacteria tipo usada como organismo centinela para el establecimiento de los programas de pasteurización de productos de huevo procesados (Ponce *et al.*, 1999, Azanza y Rustia, 2005).

2.6. Cinética de muerte

Según lo reportado por Podolak *et al.*, (2010) las curvas de supervivencia por inactivación por calor de *Salmonella* pueden ser lineales o pueden tener una asimetría asintótica significativa.

Los modelos lineales, que se corresponden con una cinética de primer orden, asumen que la población bacteriana tiene la misma termorresistencia y cualquiera sea el tipo de microorganismo y el modo de destrucción, la muerte de poblaciones bacterianas obedece a las mismas leyes.

Si N_0 es el número de organismos viables presentes inicialmente y N es número viable al final del tratamiento, tendremos que la ecuación de velocidad de muerte será:

$-dN/dt = kN$ e integrando entre los límites N_0 a tiempo $= 0$ y N al tiempo t , se obtiene:

$$\ln N_0/N = kt \quad \text{ó} \quad \ln N/N_0 = -kt$$

N/N_0 es la fracción de organismos viables que sobreviven después del tratamiento por calor durante el tiempo t y $k =$ constante de velocidad de destrucción, que depende de la temperatura según la clásica ecuación de Arrhenius:

$$K = A \cdot e^{-E_a/RT} \quad \text{o} \quad \ln k = \ln A - E_a/RT$$

Donde A =constante, E_a =energía de activación, R =Constante general de los gases y T = Temperatura en escala Kelvin.

Si se gráfica $\ln k$ en función de $1/T$ se obtiene una línea recta, siendo la pendiente igual a $-Ea/R$ y la intersección de la recta con la ordenada, el valor de la constante de Arrhenius.

Si se representa el logaritmo en base 10 de N/N_0 en función de t , se obtiene, generalmente una gráfica que se denomina “curva de supervivencia”. Cuando esta gráfica es lineal es suficiente conocer la pendiente para describir la cinética de destrucción de una determinada cepa en las condiciones elegidas (Bourgeois *et al.*, 1994). Normalmente se utiliza la inversa de la pendiente de la curva de supervivencia, que se denomina tiempo de reducción decimal “D” y que es el tiempo necesario para destruir el 90% de la población bacteriana. La expresión matemática que lo define es muy simple:

$$\text{Log}_{10} (N/N_0) = t/D$$

Para estudiar la influencia de la temperatura sobre el tiempo de reducción decimal, se representa el logaritmo (en base 10) de D en función de la temperatura. Esta representación da una recta con pendiente negativa denominada “curva de destrucción”. El valor “z” representa la variación de temperatura a la que el valor D disminuye por un factor de 10.

$$\text{Log}_{10} (D_1 - D_2) = (T_2 - T_1)/z$$

En función de lo antedicho se decidió estudiar en el marco del presente trabajo de tesis la resistencia térmica de cepas nativas de *Salmonella* sobre la eficacia de los tratamientos de pasteurización en seco a los que se somete la albúmina de huevo en polvo en Argentina. El aumento de la temperatura podría permitir acortar el tiempo de residencia en los cuartos calientes manteniendo las propiedades nutritivas y funcionales de la albúmina. Es probable que la temperatura y los tiempos aplicados sean excesivos para mejorar las propiedades funcionales y destruir las posibles células de *Salmonella* contaminantes. Por lo tanto, resulta necesario conocer cuáles son los efectos del tratamiento térmico aplicado sobre las proteínas de la albúmina de huevo así como evaluar la resistencia térmica de *Salmonella* a las temperaturas utilizadas por la industria. Estos aspectos se decidieron estudiar con el convencimiento que los resultados encontrados serán de utilidad en el diseño y ajuste de regímenes de calentamiento que garanticen la inocuidad del producto, en planes de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control, en estudios de evaluación del riesgo de esta bacteria en el proceso de deshidratación y pasteurización de albúmina de huevo y en la reducción de costos de los procesos por la optimización de los mismos.

OBJETIVOS

II.1. OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la termorresistencia de cepas de *Salmonella* nativas en albúmina de huevo deshidratada y pasteurizada.

II. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El objetivo general del presente trabajo se puede desglosar en los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar físico-química, funcional y microbiológicamente la albúmina de huevo deshidratada con propiedades de batido y propiedades gelificantes.
- Analizar los cambios que produce la pasteurización en seco en las principales proteínas constituyentes.
- Seleccionar y caracterizar cepas de *Salmonella* aisladas de huevos de gallina para ser utilizados en estudios de resistencia térmica.
- Estudiar la adaptación a ácido en caldo nutritivo con glucosa de las cepas elegidas y posteriormente su tolerancia a pH 3,5 en ácido acético.
- Comparar los estudios de termorresistencia en caldo nutritivo y en albúmina de huevo deshidratada.
- Comparar la termorresistencia en las diferentes muestras de albúminas de huevo industriales.

- Estudiar la resistencia térmica de cócteles de cepas de igual serotipo y un inóculo mixto de serotipos
- Estudiar la resistencia térmica de cócteles de cepas de igual serotipo y un inóculo mixto de distintos serotipos sometidos a choque térmico a 50°C por 30 minutos, en albúmina de huevo deshidratada.
- Estudiar la capacidad de supervivencia de los diferentes serotipos de *Salmonella* en albúmina de huevo deshidratada, durante un año.

**CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN FÍSICO-
QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE LAS
ALBÚMINAS DE HUEVO DESHIDRATADAS Y
PASTEURIZADAS**

La albúmina de huevo es una materia prima importante para la industria de alimentos debido a sus propiedades tecnológicas, especialmente la formación de espuma y de gelificación.

En este trabajo de tesis doctoral, los estudios se iniciaron caracterizando las albúminas de huevo deshidratadas: albúmina pasteurizada a 72°C, con propiedades de batido y pasteurizada a 82°C con propiedades gelificantes, que serán las matrices utilizadas para los estudios térmicos.

Como se mencionó en la Introducción muchos investigadores han informado sobre la presencia de péptidos bioactivos en ovoalbúmina y ovotransferrina con actividad inhibidora de la enzima convertidora de angiotensina, con propiedades antioxidantes y con efecto antibacteriano (Miguel *et al.*, 2004; Miguel *et al.*, 2007, Quiróz *et al.*, 2007).

A partir de esta información se decidió investigar la presencia de estos componentes en las proteínas de las albúminas de huevo pasteurizadas ya que podrían presentar un potencial de uso en alimentos funcionales para los seres humanos.

Por otra parte, resultó interesante evaluar la capacidad de adsorción de agua dado que las albúminas de huevo son

productos deshidratados que pueden modificar su actividad de agua en las condiciones de almacenamiento. Debe considerarse que el control de humedad es de vital importancia en la prevención de la contaminación por *Salmonella* en productos de baja humedad (Podolak *et al.*, 2010).

Por último, los análisis de la flora microbiana presente en la albúmina de huevo, producto de la humedad del ambiente, de la temperatura y del tipo de manipulaciones que preceden a la pasteurización en seco, se realizaron con el objetivo de decidir si las muestras debían o no someterse a un tratamiento de descontaminación, antes de realizar los estudios de resistencia térmica. Estos resultados podrán aportar más información sobre estos productos y permitir incrementar la comprensión de sus potenciales beneficios industriales y para la salud humana así como predecir el comportamiento de la bacteria estudiada.

MATERIALES Y MÉTODOS

I.1. Materiales

En el presente estudio se utilizaron 6 muestras de albúmina de huevo con propiedades de batido obtenidas por deshidratación y pasteurización a 72°C, denominada industrialmente como albúmina de huevo de alto batido (AAB) y 6 muestras de albúmina con propiedades gelificantes denominada industrialmente como albúmina de huevo de alto gel (AAG), deshidratada y pasteurizada a 82°C. Las mismas fueron las matrices para los estudios de resistencia térmica, adicionalmente, 6 muestras de albúmina deshidratada no pasteurizada (ADNP), no comercializable, que se utilizó como control en los estudios de caracterización físico-química y funcional. Estas muestras fueron provistas por la empresa Tecnovo S.A. radicada en el Parque Industrial de la ciudad de Crespo, provincia de Entre Ríos, Argentina, provenientes de distintos lotes de producción. En la Figura 7 se presenta una imagen de estas muestras de albúmina de huevo deshidratada.



Figura 7. Fotografía de las muestras de albúmina de huevo.

Fuente: fotos tomadas por la autora de la tesis

I.2. Metodología utilizada para la caracterización de las muestras de albúmina de huevo.

I.2.1. Caracterización físico-química

Las determinaciones se realizaron por duplicado en seis muestras de cada tipo de albúmina de huevo deshidratada.

I.2.1.1. Determinación de nitrógeno proteico y/o proteína

Se utilizó la técnica de Macro Kjeldahl adaptado de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC, 2005).

Se colocaron 2 g de muestra en un balón de Kjeldahl de 500 ml junto con 20 g de K_2SO_4 , 1g de $CuSO_4$ y 25 ml de H_2SO_4 concentrado. Se llevó a ebullición hasta que la solución se tornó clara y se continuó calentando por 30 minutos más.

Se enfrió el balón, se agregaron 200 ml de agua destilada y se enfrió hasta 25°C. Posteriormente se incorporaron aproximadamente 40 ml de solución de hidróxido de sodio-sulfato de sodio para alcalinizar fuertemente la solución. El balón se conectó al aparato de destilación y el pico del condensador se sumergió en la solución receptora de ácido sulfúrico que contiene 10 gotas de indicador rojo de metilo. Se recogieron 150 ml de destilado y se tituló el exceso de ácido con una solución valorada de hidróxido de sodio. Se realizó un blanco de reactivos.

El porcentaje de nitrógeno se calculó como:

$$\% N = [(ml H_2SO_4 \times N) - (ml NaOH \times N)] \times 1,4007/g \text{ de muestra.}$$

Para cuantificar las proteínas totales se utilizó el factor de conversión para huevos: 6,68 (Pilosof y Bartholomai, 2000).

I.2.1.2. Determinación de pH

Se determinó el pH con pHmetro marca Horiba D53, previa dilución de la muestra en agua deionizada pH 7, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, en una proporción de 1:7.

I.2.1.3. Determinación de cenizas

Las muestras se pesaron en crisoles de porcelana secos y previamente tarados. Se llevó a mufla a 540°C por 4 horas. El contenido de cenizas se obtuvo en base al peso seco de la muestra (AOAC, 2005).

I.2.1.4. Determinación del contenido graso

La determinación de grasas se realizó por extracción con hexano mediante el método Soxhlet (AOAC, 2005), empleando aproximadamente 15 g de muestra.

I.2.1.5. Determinación del contenido de humedad

Las muestras se pesaron en cápsulas de porcelana secas y previamente taradas, se calentaron en una estufa a 105°C por 2 horas. La humedad se calculó por diferencia de peso inicial y final de la muestra (AOAC, 2005).

La humedad en base seca se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación (Martínez *et al.*, 1998):

$$W_e \text{ (b.s.)} = P_o \cdot W_o + \Delta P / P_o (1 - W_o)$$

donde W_e (b.s.): humedad en base seca, P_o : peso inicial, W_o : humedad en base húmeda.

I.2.1.6. Medida del color

Se utilizó un Espectrofotómetro colorímetro portátil, Miniscan EZ marca HunterLab (Estados Unidos) con adaptador para muestras secas e iluminante estándar D65. Se trabajó en espacio de color propuesto por la Comisión Internacional de Iluminación, CIE $L^*a^*b^*$. Para ello se tomaron muestras de 20 g que se colocaron en recipientes de vidrio plano de aproximadamente 7 cm de diámetro y se registraron los valores de L^* , a^* y b^* en seis puntos.

El color de las muestras de albúmina de huevo fue analizado y comparado con la escala de color de CIE que se presenta en la Figura 8.

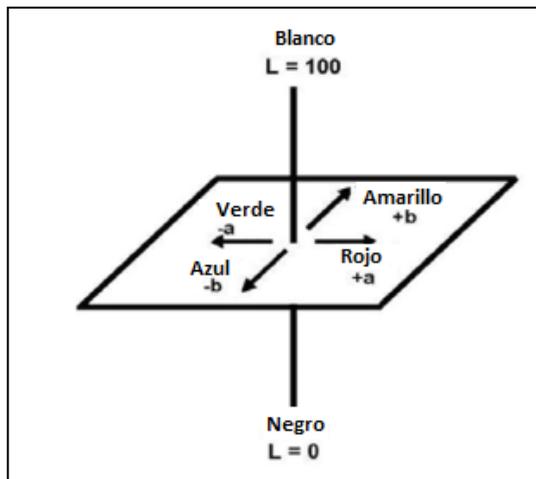


Figura 8. Escala de color CIE L^* , a^* , b^* .

I.2.1.7. Temperaturas y entalpías de desnaturalización

Para determinar las temperaturas y entalpías de desnaturalización se realizó una calorimetría diferencial de barrido.

Se pesaron aproximadamente 10 mg de muestra hidratada que se colocaron en cápsulas que se cerraron herméticamente y se colocaron en un Calorímetro Diferencial de Barrido DSC Q200 TA Instruments (Estados Unidos) a una velocidad de corrida de 10°C por minuto, en un intervalo de 25 a 120° C. La calibración del equipo se realizó con indio, previo al análisis.

I.2.1.8. Identificación de proteínas

I.2.1.8.1. Separación de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida unidimensional

Las muestras de albúmina de huevo sin pasteurizar, con propiedades de batido y con propiedades gelificantes fueron analizadas mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con la finalidad de observar los cambios estructurales en las proteínas por efecto del tratamiento térmico.

Se utilizaron como agentes desnaturalizantes: el dodecilsulfatosódico (SDS), compuesto tensioactivo aniónico que actúa rompiendo los enlaces no covalentes de las proteínas,

el 2-mercaptoetanol (2-ME) que reduce los puentes disulfuro (Cys-S-S-Cys) a grupos tioles (Cys-SH), y un agente caótrico, como la urea, que provoca la desnaturalización de las proteínas por ruptura de puentes de hidrógeno, dejando expuestos los residuos hidrofóbicos que son solubilizados por los agentes surfactantes.

La electroforesis se realizó siguiendo el método descrito por Laemmli (1984) en un gel de poliacrilamida (10 y 12%), en condiciones desnaturalizantes sin y con el agregado de 2-ME y con urea 8 M. Se utilizó un sistema Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (Biorad, Estados Unidos). La corriente se mantuvo constante en 40 mA durante el apilamiento y luego se incrementó a 60 mA, manteniéndose constante durante 40 minutos.

Las muestras se disolvieron en agua para obtener una concentración final de proteínas de 1-10 µg/µl y se llevaron a ebullición por 5 minutos. Se sembraron 25 µl de cada muestra más 5 µl de solución tampón de corrida sin y con 2-ME y agregado de urea 8 M.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con Azul brillante de Coomassie R-250 (Neuhoff *et al.*, 1988) y se

colocaron en agitación durante 1 hora. Después de este tiempo se retiró el colorante y se añadió una mezcla de decolorante para aclarar los geles, hasta que quedaron incoloras las zonas donde no había bandas de proteína.

Se utilizó un producto de calibración que incluye: fosforilasa b (97 kDa), seroalbúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica bovina (31 kDa), inhibidor de tripsina (20 kDa) y α -lactoalbúmina (14 kDa) (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, Bio Rad, Estados Unidos) usadas para la calibración del gel.

Para SDS-PAGE con urea se utilizó un producto comercial que contiene miosina de músculo de conejo (200 kDa), β -galactosidasa de *E. coli* (116 kDa), fosforilasa B de conejo (97 kDa), albúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica bovina (29 kDa) (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, Bio Rad, Estados Unidos).

I.2.1.8.2. Estimación de los pesos moleculares

La estimación de los pesos moleculares se realizó por comparación con las proteínas patrones del marcador de peso molecular. La determinación se realizó en base a una curva de calibración obtenida al graficar los logaritmos de los pesos

moleculares de las proteínas estándar en función de la movilidad relativa (Rf) de cada especie proteica. Rf es el parámetro experimental asociado a esta técnica, y se define como:

$$Rf = \frac{\text{Distancia que migra el frente de corrida}}{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}$$

I.2.1.8.3. Identificación de las proteínas por mapeo peptídico

Para obtener la huella peptídica de las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se hizo una digestión triptica *in situ* con tripsina (Promega, Estados Unidos) como endoproteasa, durante una noche a 37°C. Los péptidos fueron extraídos de los geles utilizando el 60% de acetonitrilo en trifluoroacético (TFA) al 0,2%, se concentró por secado al vacío y se realizó el desalado utilizando micro-columnas de C18 en fase reversa (Omix Pippete, Varian). La elución de péptidos de la micro-columna se realizó directamente en la placa del espectrómetro de masa con 3 µl de solución de (α-ciano-4-hidroxicinámico en 60% de acetonitrilo acuoso que contiene 0,2% TFA). Los espectros de masas de las mezclas de digestión fueron realizados en un espectrómetro MALDI-ToF/ToF 4800 (Applied Biosystems, Estados Unidos) y se calibraron externamente utilizando una mezcla de péptidos estándar (Applied Biosystems, Estados Unidos).

En este espectrómetro los iones formados en la fuente se aceleran mediante la aplicación de un campo eléctrico. Estos iones adquieren la misma energía cinética durante la aceleración por lo que la diferencia de masa produce “velocidades de vuelo” distintas, de forma que los iones más pequeños atraviesan más rápidamente el analizador (tubo de vuelo). Si se utilizan dos analizadores tipo tiempo de vuelo en tándem, se denomina ToF-ToF. El tiempo que tarda cada ión en incidir en el detector a la salida del tubo de vuelo depende de su relación masa-carga y de su energía cinética. Considerando constantes la carga y la energía cinética de los iones formados, la medida del tiempo de vuelo permite determinar de forma muy precisa la masa de cada uno de estos iones.

Se llevó a cabo la disociación inducida por colisiones con analizadores de espectrometría de masas en tándem o MS/MS de los péptidos seleccionados. Mediante esta técnica un ión generado en la fuente de ionización es aislado (ión precursor) y sometido a procesos que producen su fragmentación. La información estructural de la molécula se deriva del análisis de la colección de fragmentos iónicos producidos.

Las proteínas se identificaron en la base de datos NCBInr con los valores de m/z de los péptidos utilizando el programa

MASCOT (Matrix Science). El “% de cobertura” es el porcentaje de la secuencia completa que se logra cubrir con los péptidos identificados significativamente. Para que los resultados sean considerados estadísticamente significativos se permitió 0,05 Da de diferencia entre el valor teórico y el valor medido de masa molecular de los péptidos monoisotrópicos, y 0,25 Da para los fragmentos resultantes.

I.2.2. Caracterización funcional

I.2.2.1. Capacidad espumante y estabilidad de la espuma

El parámetro que mide la actividad o capacidad espumante de una proteína debe reflejar su habilidad para incorporar aire en la solución en forma de una distribución fina de burbujas (Wagner, 2000). Estas propiedades se determinaron usando el método descrito por Song *et al.*, (2009) con modificaciones. Se prepararon 50 ml de una solución de albúmina de huevo con capacidad espumante y albúmina de huevo sin pasteurizar al 14% en agua destilada deionizada y se batió con batidora eléctrica. Una vez obtenida la espuma, se removió el homogeneizador cuidadosamente para minimizar la destrucción de la misma, se midió el volumen de espuma; y se trasvasó por volcado a una probeta graduada de 1.000 ml, donde se registraron valores puntuales cada 5 minutos de retrodispersión

por 1 hora. También se registraron los valores iniciales y finales de volumen de líquido y espuma en este tubo.

Con el volumen de espuma medido en el recipiente de obtención de la espuma, se calculó la espumabilidad (overrun) como:

$$\text{Espumabilidad (\%)} = \frac{V_e - V_l}{V_l}$$

Donde V_e es el volumen de espuma obtenido inmediatamente luego del batido y V_l es el volumen de líquido inicial (50 ml) (Wagner, 2000).

El estudio de la estabilidad de la espuma se realizó midiendo el drenaje de líquido que da idea de la retención de líquido en la espuma y consiste en medir el volumen de líquido drenado a un tiempo fijo (Wagner, 2000). La estabilidad de la espuma se expresó como porcentaje de líquido drenado en relación al volumen de líquido inicial como una función de tiempo de reposo por 60 minutos y fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Volumen} = \frac{\text{Vol. de espuma} - \text{vol. de líquido drenado}}{\text{Vol. original de líquido}} \times 100$$

I.2.2.2. Análisis de perfil de textura

Los geles de albúmina de huevo con propiedades gelificantes y de la albúmina sin pasteurizar fueron sometidos a pruebas de resistencia de deformación en un texturómetro Micro Systems TA.XT2[®] (México). La preparación de las muestras se hizo al 14% de albúmina de huevo y 2% de cloruro de sodio en agua destilada deionizada. Se envasaron en bolsas delgadas de policloruro de vinilo (PVC). Se homogeneizó la mezcla y se calentaron a 80°C por 40 minutos, luego se enfriaron y se guardaron en heladera durante toda una noche. Al día siguiente se cortaron cilindros de 2 cm de diámetro por 2 cm de altura y con ellos se realizó el análisis de perfil de textura (APT).

El dispositivo del texturómetro consta de un plato de compresión de 75 mm de diámetro que está unido a una célula de carga, sujeta a un brazo móvil. Este brazo actúa presionando sobre el alimento en un área del tamaño de un bocado (17 mm x 20 mm), comprimiéndolo dos veces, en un movimiento que imita el de una mandíbula. La célula de carga detecta las fuerzas generadas y éstas son graficadas en una curva fuerza –tiempo como la que se presenta en la Figura 9.

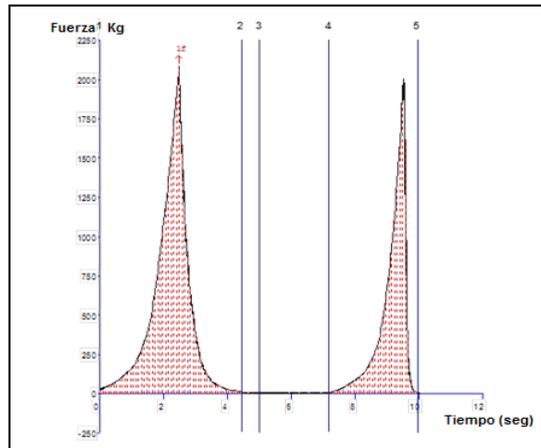


Figura 9. Gráfica general del análisis del perfil de textura de una muestra.

La interpretación de la curva nos permite determinar y asignar un valor a una serie de parámetros mecánicos texturales, clasificados previamente por Bourne (1982) y Lau *et al.*, (2000):

1. Dureza: Se define como el “pico de fuerza máximo correspondiente a la primera compresión”. Da idea de la resistencia compresiva; de la resistencia a una deformación dada. A menor cohesividad y mayor dureza, mayor tendencia a fracturar.

2. Cohesividad: Se define como la “relación de A_2/A_1 . Da idea de la fuerza de los enlaces internos que mantienen la estructura del gel como tal, y por lo tanto, de la capacidad de mantenerse íntegro.

3. Elasticidad: Es la “diferencia de tiempo 4:5 / diferencia de tiempo 1:2.”, y representa la altura que recupera el gel en el tiempo entre el fin de la primera compresión y comienzo de la segunda. Indica la proporción en que el producto deformado vuelve a su estado no deformado primitivo, después de retirada la carga compresiva. Aporta información del comportamiento viscoelástico del gel.

4. Adhesividad: Se define como “el área de fuerza negativa” y representa el trabajo requerido para vencer las fuerzas atractivas entre la superficie del gel y otro material con el que se pone en contacto, es decir la fuerza total necesaria para desprender el plato de compresión de la muestra.

Los parámetros utilizados en el ensayo fueron:

- Velocidad de pre-ensayo: 10,0 mm/s
- Velocidad de ensayo: 2,0 mm/s
- Velocidad de postensayo: 10,0 mm/s
- Deformación: 20 %.
- Tiempo entre primer y segundo ciclo: 2 segundos
- Célula de carga: 25 kg
- Velocidad de adquisición de datos: 200 puntos por segundo (pps).

I.2.2.3. Determinación de la capacidad de retención de agua

La capacidad de retención de agua de los geles, que consiste en la cantidad de líquido exudado de un sistema proteico por la aplicación de una fuerza centrífuga. En este estudio se evaluó el porcentaje de agua retenida según la metodología propuesta por Pilosof y Bartholomai (2000) con modificaciones. Las muestras de gel de (1 g ± 0,15) fueron pesadas y centrifugadas a 2.500 rpm en una centrifuga marca Rolco® por 10 minutos a 20°C; el porcentaje de agua retenida se calculó como: (peso de líquido perdido/ peso de agua inicial) x 100.

Estas determinaciones se realizaron en muestras de albúmina de huevo con propiedades gelificantes y se utilizó como control albúmina de huevo sin pasteurizar.

I.2.2.4. Determinación de la actividad acuosa de las muestras de albúmina de huevo y de la capacidad de adsorción de agua

Estas determinaciones se realizaron en muestras de albúmina de huevo con propiedades de batido, albúmina de huevo con propiedades gelificantes y se utilizó como control albúmina de huevo sin pasteurizar.

Se utilizó el método gravimétrico estático que es el más utilizado y que ha sido estandarizado por el Proyecto Cooperativo Europeo COST 90 (Pilosof y Bartholomai, 2000).

La actividad de agua de cada muestra de determinó mediante un higrómetro previamente calibrado marca Rotronic (Estados Unidos), modelo Hygrolab 3, con sonda de humedad y sensor de temperatura.

Las soluciones saturadas utilizadas para la calibración del equipo fueron cloruro de sodio ($a_w = 0,752$) y cloruro de magnesio ($a_w = 0,330$).

Las soluciones saturadas fueron preparadas y colocadas en envases de plástico 24 hs antes de comenzar la prueba para que, de este modo, la atmósfera del sistema se encontrara en equilibrio, antes de introducir el sensor del higrómetro. Se midió la a_w cada 10 minutos durante una hora.

La determinación de la masa de albúmina se realizó en balanza electrónica marca Ohaus (Alemania), modelo AR3130 y se trabajó con una exactitud de 0,001g. Se utilizaron placas de Conway de material de vidrio, que consisten en una base de forma circular con dos cámaras concéntricas separadas por un tabique circular y una tapa. La base y la tapa se cierran

herméticamente mediante un cierre esmerilado previa colocación de vaselina en sus bordes. El equipo y los materiales se muestran en la Figura 10.



Figura 10. Equipo para medición de actividad de agua.

Fuente: fotos tomadas por la autora de la tesis

El procedimiento aplicado consistió en depositar una masa conocida de albúmina de huevo deshidratada contenida en recipientes de plástico, en el espacio central de las cámaras de Conway, seguidamente en el espacio periférico se incorporó agua y finalmente se selló la tapa con vaselina. Se depositaron en un refrigerador termoestático a 20°C, marca Velp® Scientifica (España), modelo FTC 90. Se retiraron las Cámaras de Conway a diferentes tiempos y se determinó la masa y la actividad de agua.

Los datos experimentales obtenidos se ajustaron mediante el Software Microcal OriginPro 8.5.1 (Microcal software Inc. 2007). Se trabajó con las ecuaciones de: GAB ($a_w = 0,5-0,95$), y Oswin ($a_w = 0,5-0,95$) que se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Ecuaciones utilizadas para el ajuste de las isotermas de adsorción de la albúmina de huevo deshidratada.

Modelo	Ecuación transformada para modelado
GAB	$W_e = \frac{W_0 \cdot C \cdot K \cdot a_w}{(1 - K \cdot a_w) \cdot (1 + (C - 1) \cdot K \cdot a_w)}$
	<p>W_e, contenido de humedad (% en base seca); W_0, contenido de humedad en la monocapa (% en base seca); C, constante de Guggenheim característica del producto y relacionada con el calor de adsorción de la monocapa; K, factor de correlación relacionado con el calor de sorción de la monocapa.</p>
Oswin	$W_e = A \cdot \left[\frac{a_w}{1 - a_w} \right]^B$
	<p>A y B, son constantes del modelo y características para cada alimento.</p>

I.2.3. Análisis microbiológico

Se estudiaron los microorganismos presentes en albúmina con propiedades de batido y albúmina con propiedades gelificantes, dado que son las matrices de los estudios de resistencia térmica.

I.2.3.1. Enumeración de microorganismos aerobios mesófilos

Se siguió la técnica de ICMSF (1985). Para ello, en una bolsa de polietileno estéril se agregaron asépticamente 25 g de muestra de albúmina de huevo deshidratada y 225 ml de agua peptonada 0,1%. Se homogeneizó manualmente obteniendo una rápida disolución de la albúmina. A partir del homogenato, se realizaron diluciones seriadas \log_{10} en agua peptonada. Se sembró 100 μ l, por duplicado, de cada dilución en placas de Petri conteniendo agar para recuento en placa (ARP) marca OXOID (Inglaterra). La dispersión se realizó empleando perlas de vidrio esteriles. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h \pm 2 horas. Para determinar el número de UFC/g se calculó la media aritmética de los dos valores del número de colonias de una misma dilución, considerando entre 30 y 300 colonias, y se multiplicó el resultado obtenido por el factor de la dilución correspondiente.

I.2.3.2. Enumeración de coliformes totales

Se siguió la técnica de ICMSF (1985), Método 4. A partir de las diluciones del homogenato obtenido como se indicó en el apartado I.2.3.1, se inocularon, por duplicado, 100 μ l de cada dilución en placas de Petri conteniendo agar bilis rojo violeta lactosa (BRVL) en doble capa. La dispersión se realizó

empleando perlas de vidrio esteriles. Las placas se incubaron a 37°C por 24 ± 2 horas. Para determinar el número de UFC/g se calculó la media aritmética de los dos valores del número de colonias de una misma dilución.

I.2.3.3. Enumeración de mohos filamentosos y levaduras

Se siguió la técnica de ICMSF (1985). A partir del homogenato obtenido como se indicó en el apartado I.2.3.1, se inocularon 100 µl, por duplicado, de cada dilución en placas de Petri conteniendo agar oxitetraciclina, gentamicina, extracto de levadura y glucosa (OGY), Oxoid (Inglaterra). La dispersión se realizó empleando perlas de vidrio esteriles. Las placas se incubaron a 20-24°C por 3-5 días. Para determinar el número de UFC/g se halló la media aritmética de los dos valores de una misma dilución, considerando entre 10 y 100 colonias y se multiplicó por el factor de la dilución correspondiente.

I.2.3.4. Enumeración de *Bacillus cereus*

Se siguió la técnica de ICMSF (1985). A partir del homogenato obtenido como se indicó en el apartado I.2.3.1, se inocularon, por duplicado, 100 µl de cada dilución en placas de Petri conteniendo agar selectivo para *Bacillus cereus*, Merck (Argentina). La dispersión se realizó empleando perlas de vidrio

esteriles. Las placas se incubaron a 37° C por 24 horas \pm 2 horas. Para determinar el número de UFC/g se halló la media aritmética del número de colonias de dos valores de una misma dilución, considerando entre 30 y 300 colonias, y se multiplicó el resultado obtenido por el factor de la dilución correspondiente.

I.2.3.5. Investigación de *Salmonella* spp.

Se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Extracción de ADN: se pesaron 25 g de cada muestra, por duplicado, y se mezclaron asépticamente con 225 ml de caldo tripteína soja adicionado con sulfato ferroso que se incubó a 37°C durante 24 horas. Luego de la incubación, se tomó 1 ml del caldo de cada una de las muestras y se realizaron dos lavados con agua destilada estéril. El pellet obtenido se resuspendió con 500 μ l de agua destilada estéril. El ADN fue liberado de las células bacterianas por calentamiento durante 10 min a 100 °C en baño seco y luego centrifugado a 9.300 x g durante 1 min a 4°C. El sobrenadante conteniendo el ADN bacteriano fue fraccionado en microtubos y se calentó a 100° C durante 10 minutos. A su término se centrifugó y se tomó el sobrenadante conteniendo el templado de ADN.

Ensayo de PCR: La reacción de PCR se realizó en un termociclador marca Mastercycler Gradient, Eppendorf, (Alemania), amplificando una región del gen *invA* que permite la detección de *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. Los templados de ADN (5 µl) fueron amplificados en un volumen final de reacción de 25 µl que contenían 0,25 µl de cada oligonucleótido iniciador 0,1 mM de Operon Biotechnologies GmbH (Alemania), 2,5 µl de tampón 10X, 1,5 µl de MgCl₂ 1,5 mM, 0,5 µl de cada uno de los dNTP 0,2 mM, 0,2 µl de TaqADN polimerasa 5 U/µl marca Fermentas, Thermo Scientific (Estados Unidos) y agua bidestilada hasta completar el volumen final de reacción.

Los oligonucleótidos iniciadores fueron P139 (5'→3: GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA) y P141 (5'→3: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC). Como blanco de reacción se usó la mezcla de reacción sin ADN. Se incluyeron controles positivos (*Salmonella* spp.) y negativos, (*Citrobacter* spp.). Las condiciones de ciclado comprendieron una desnaturalización inicial a 95°C en 1 minuto; 38 ciclos de amplificación a 95°C en 30 segundos, alineamiento a 64°C en 30 segundos, extensión a 72°C en 30 segundos; extensión final a 72°C en 3 minutos.

Los productos de reacción fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % (BioRad, Estados Unidos) en buffer TBE (Tris-Ácido bórico-EDTA), sembrándose 10 µl del amplificado y un marcador de 100 pb de PB-L Products Bio-Lógicos (Argentina). La tinción del gel se realizó con solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Los productos de amplificación (~284 pb) fueron visualizados con un transiluminador UV, Model M-20, UVP Inc. (Estados Unidos).

I.2.4. Análisis estadístico

En los diferentes tratamientos se realizó análisis de varianza y pruebas de comparaciones múltiples. Para la comparación de medias por pares se utilizó la prueba de Tukey utilizando SYSTAT 12 (SYSTAT Inc., Everston, Estados Unidos). El nivel de significación utilizado para determinar la diferencia entre medias de tratamientos fue de 5%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I.1. Caracterización de las albúminas de huevo deshidratadas y pasteurizadas

I.1.1. Caracterización físico-química

I.1.1.1. Composición proximal

La composición proximal de la albúmina de huevo deshidratada se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición proximal de las muestras de albúmina

Tipo de albúmina de huevo	AAB	AAG	ADNP
Contenido de N (%)	13,37±0,15 ^a	13,92±0,03 ^b	13,76±0,20 ^b
Contenido de proteínas (%)	89,36±0,97 ^a	92,98±0,2 ^b	91,91±0,68 ^b
Contenido de grasa (%)	0,12 ±0,06 a	0,13±0,03 a	0,15±0,06 a
Cenizas (%)	5,95±0,15 a	5,88±0,09 a	5,97±0,19 a
pH	6,25±0,24 a	7,14±0,02 b	7,02±0,12 b
Humedad (g H ₂ O/g masa seca)	0,072±0,003 a	0,061±0,002 b	0,069±0,05 a
Actividad de agua a 20°C	0,374±0,03 a	0,338±0,03 b	0,362±0,06 c

Los datos se expresan como promedio ± desviación estándar, n=6 por grupo. Los promedios en cada columna y con diferentes letras indican diferencia significativa (p<0,05)

N: nitrógeno; AAB: albúmina de huevo de alto batido, AAG: albúmina de huevo de alto gel, ADNP: albúmina de huevo deshidratada no pasteurizada.

Las diferencias significativas en el contenido de nitrógeno y, por consecuencia, en el contenido de proteínas totales puede deberse al agregado de agentes espumantes en la albúmina con propiedades de batido. Si bien estadísticamente hay diferencias en el pH estos valores se encuentran dentro de los rangos establecidos por la normativa argentina que establece en el Capítulo 22 del Reglamento de Inspección de productos, subproductos y derivados de origen animal. Las diferencias en la actividad de agua resultan, indudablemente, de la temperatura aplicada en el proceso de pasteurización.

I.1.1.2. Evaluación del color

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros de color de las muestras de albúmina de huevo.

Parámetros de color	AAB	AAG	ADNP
L*	96,88±0,34 a	96,66±0,23 a	96,24±0,73 a
a*	-0,75±0,05 a	-0,89±0,12 b	-0,96±0,04 b
b*	18,40±0,19 a	19,44±0,47 b	17,57±0,44 c

Los datos se expresan como promedio ± desviación estándar, n=6. Los promedios en cada columna y con diferentes letras indican diferencia significativa (p<0,05)

AAB: albúmina de huevo con propiedades de batido; AAG: albúmina de huevo con propiedades gelificantes, ADNP: albúmina de huevo deshidratada no pasteurizada

Todas las muestras presentaron valores negativos de a^* lo que indica un color con tendencia al verde según la escala de CIE. La luminosidad (L^*) mostró alta tendencia al blanco sin diferencias significativas ($p < 0,05$) en las tres muestras. Los niveles crecientes del tratamiento térmico aplicado a la albúmina de huevo en el proceso de pasteurización (72°C a 82°C) incrementaron el valor de b^* lo que revela la tendencia al aumento de la coloración amarilla probablemente debido a la reacción de azúcares remanentes, que no fueron eliminados durante el desglucosado, con las proteínas del producto.

I.1.1.3. Determinación de las temperaturas y entalpías de desnaturalización

Los termogramas obtenidos por calorimetría diferencial de barrido a una velocidad de corrida de 10°C por minuto (Tan et al., 2014) en un intervalo de 25 a 120°C (Madsudomi et al., 2000), se muestran en la Figura 11. El porcentaje del contenido de agua de cada muestra (m/m) fue el siguiente: albúmina deshidratada sin pasteurizar: $55,7\%$, albúmina de huevo con propiedades de batido: 58% y albúmina de huevo con propiedades gelificantes: $58,5\%$.

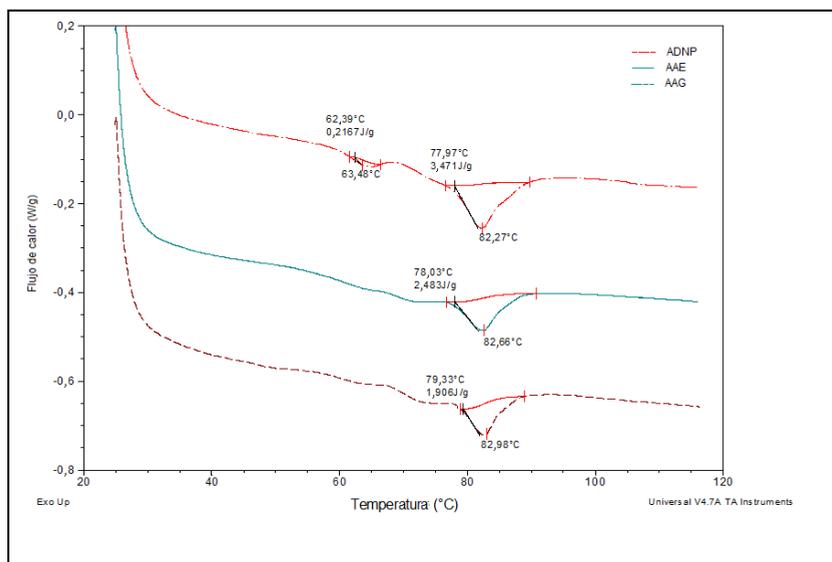


Figura 11. Picos de temperatura de desnaturalización (°C) y entalpía de desnaturalización (J/g) de las muestras de albúmina deshidratada sin pasteurizar (ADNP), albúmina de huevo con propiedades de batido (AAE) y albúmina de huevo con propiedades gelificantes (AAG).

A una velocidad de 10°C/min y a pH 7 las muestras estudiadas mostraron dos picos endotérmicos principales, que, de acuerdo a la bibliografía existente (Tan *et al.*, 2012), el de la izquierda corresponde a la desnaturalización de la ovotransferrina y de la lisozima mientras que el pico de la derecha corresponde al de la ovoalbúmina. Los termogramas obtenidos en esta tesis son similares a los informados por Kato *et al.*, (1990), Donovan *et al.*, (1975), Ferreira *et al.* (1997), Van der Plancken *et al.*, (2007) y Matsudomi *et al.*, (2001) que reportan un pico con un valor de temperatura de

desnaturalización (T_D) de aproximadamente 80°C de la ovoalbúmina en albúmina de huevo deshidratada.

Las temperaturas más bajas de desnaturalización de las proteínas en albúmina de huevo con propiedades de batido y en albúmina con propiedades gelificantes con respecto a las de la albúmina sin pasteurizar son el resultado de la aplicación de calor. La menor entalpía de desnaturalización es indicación de una pérdida parcial de la estructura de la proteína y su estabilidad térmica (Madsudomi *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2012).

Las modificaciones en las propiedades estructurales de las proteínas de la albúmina de huevo son las que conducen a los cambios favorables en la formación de espuma y de gelificación (Campbell *et al.*, 2005, Song *et al.*, 2009), siempre que sean inferiores a la temperatura de desnaturalización (Tan *et al.*, 2012).

I.1.1.4. Análisis proteico por electroforesis

Los perfiles electroforéticos (SDS- PAGE) fueron similares para las muestras pasteurizadas estudiadas y se presentan en las Figuras 12 y 13.

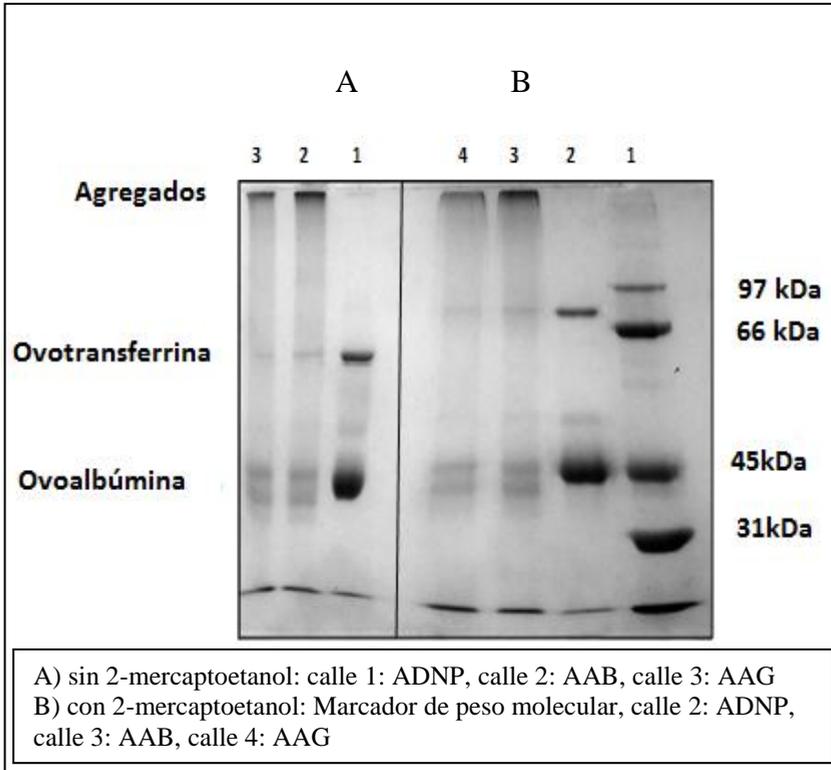


Figura 12. Electroforesis PAGE con gel de poliacrilamida al 10%.

En las calles 1 y 2 donde se sembró la muestra de ADNP se observan, en ambas corridas (sin y con 2-mercaptoetanol), dos bandas correspondientes a un peso molecular de 45 kDa y 75 kDa. La banda de 45 kDa con mayor intensidad corresponde a la ovoalbúmina en función del PM estimado y a su mayor proporción en la clara de huevo (54%) (Raikos *et al.*, 2006). La otra fracción de mayor intensidad corresponde a ovotransferrina

fundamentado en sus proporciones relativas en la albúmina de huevo (12%), en su peso molecular estimado, sus patrones de migración y los informes de autores como Hammershøj *et al.*, (2006), Raikos *et al.*, (2006), Hoppe, (2010).

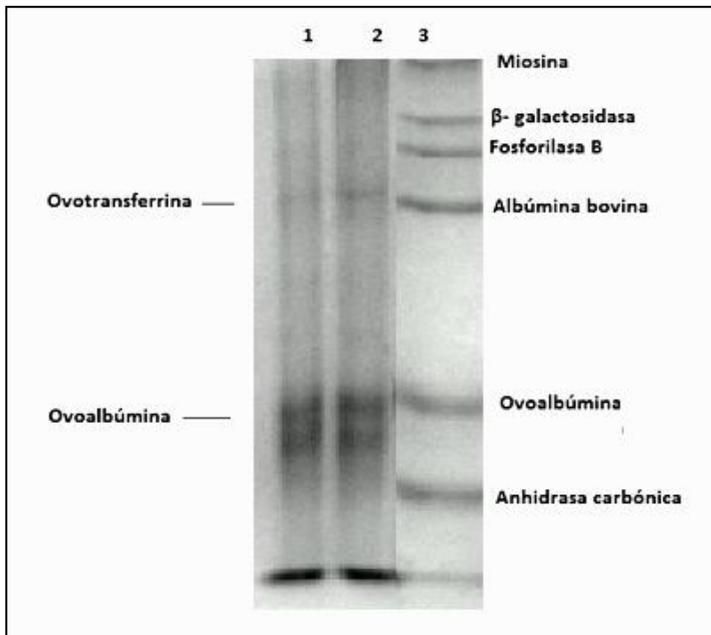
En las albúminas de huevo deshidratadas se observaron bandas de peso molecular superior a 100 kDa que, se supone, corresponden a agregados moleculares dado que aparecen en estas muestras conjuntamente con la disminución de la intensidad de las bandas de ovoalbúmina y ovotransferrina.

Con la finalidad de determinar los enlaces predominantes en los agregados presentes en las muestras pasteurizadas, se estudió:

1. El efecto del 2-mercaptoetanol (2-ME): En la Figura 13 se muestran los resultados de la electroforesis donde se observó que los agregados permanecieron no disociados (aunque con menor intensidad en la albúmina de huevo con propiedades de gelificación) indicando que la formación de puentes disulfuros no es mecanismo predominante en la formación de agregados, concurrente con lo reportado por Matsudomi *et al.*,

(2001), Van Der Plancken *et al.*, (2007) Enomoto *et al.*, (2009).

2. El efecto de la urea: La urea desestabiliza interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno en las proteínas (Totosaus *et al.*, 2002). En la Figura 13 se muestra el resultado obtenido a partir de esta electroforesis.



Calle 1: AAG, calle 2: AAB, calle 3: Marcador de peso molecular

Figura 13. Electroforesis PAGE con urea

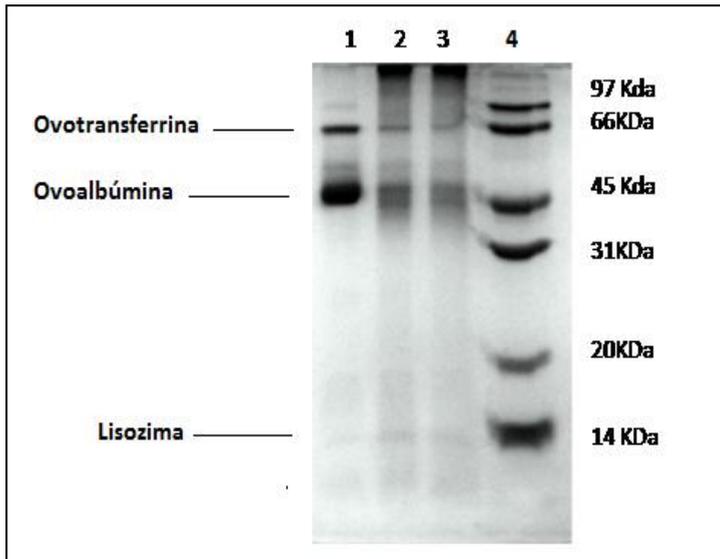
La desaparición de las bandas de agregados apoyan la conclusión encontrada por Broersen *et al.*, (2006) quienes informan que los puentes disulfuro no son la fuerza que promueve la agregación de la ovoalbúmina sino la estabilidad que alcanza la red de gel después que se forma, producto de interacciones físicas.

Cuando la albúmina de huevo deshidratada se somete a una temperatura de pasteurización de 72°C para obtener propiedades de batido, la ovoalbúmina sufre cambios conformacionales que se traducen en la formación de agregados solubles en agua generados por uniones entre sí y con las moléculas de ovotransferrina, que dependen del balance entre las interacciones atractivas y repulsivas. La ovotransferrina contribuye a esta sinergia a través de agregados covalentes y es la proteína más desnaturalizada durante este proceso (Lechevalier *et al.*, 2007).

Por otra parte, cuando se somete a una temperatura de pasteurización de 82°C para obtener propiedades gelificantes, se desnaturaliza la ovoalbúmina y se produce la formación de agregados de menor tamaño, debido a interacciones hidrofóbicas y enlaces puente hidrógeno (Broersen *et al.*, 2006; Hoppe, 2010)

de moléculas de ovoalbúmina y ovotransferrina que generan una red con gran capacidad para formar un gel firme.

En la Figura 14 se muestra la imagen correspondiente a la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% sin 2-ME.



Calle 1: ADNP, calle 2: AAB, calle 3: AAG, Calle 4: Marcador de peso molecular

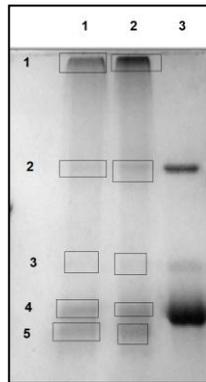
Figura 14. Electroforesis PAGE con gel de poliacrilamida al 12%

Se puede ver, en las tres muestras, el mismo patrón de corrida. Con esta concentración del gel se pudo observar, la banda correspondiente a la lisozima, de aproximadamente 14 kDa, identificada por comparación con movilidades del

estándar, el peso molecular estimado y en su proporción relativa en la albúmina de huevo de acuerdo a lo reportado por Roy *et al.*, (2003), Raikos *et al.*, 2006, Hoppe (2010). Esta proteína aparece menos visible en la albúmina con propiedades gelificantes donde ha sufrido desnaturalización ($T_D = 69-77^\circ\text{C}$).

I.1.1.5. Identificación de las proteínas por mapeo peptídico

Las proteínas separadas por SDS-PAGE que se indican en la Figura 15 se identificaron mediante espectrometría de masas por MALDI-ToF-ToF. Se seleccionaron las bandas mayoritarias de las muestras de albúmina de huevo pasteurizada.



Calle 1: AAG, calle 2: AAB, calle 3: ADNP

Figura 15. Bandas recortadas para los estudios proteómicos

Las bandas se numeraron del 1 al 5 para su identificación. La imagen corresponde a la Figura 12

En las Figuras 16 y 17 se presentan, a modo de ejemplo, el espectro de masas y el resultado obtenido tras la búsqueda en el programa MASCOT, que permitió identificar las proteínas ovoalbúmina y ovotransferrina en las bandas correspondientes a los agregados.

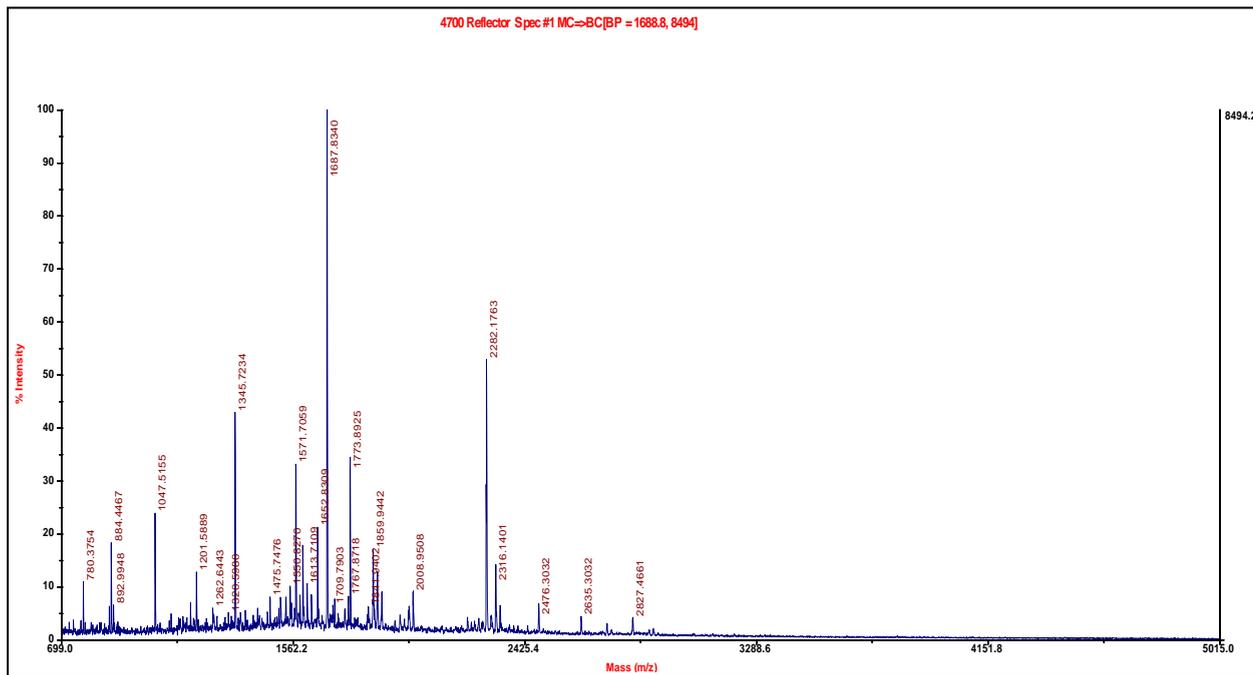


Figura 16. Espectro de masas obtenido en modo reflector positivo para la banda proteica N° 1

A)	1	GSIGAASMEF	CFDVFKEKLV	HHANENIFYC	PIAIMSALAM	VYLGAKDSTR
	51	TQINKVVRFD	KLPGFGDSIE	AQCGETSVNVH	SSLR DLINQI	TKFNDVYSFS
	101	LASRLYAEEER	YPILPEYLQC	VKELYR GGLE	PINFQTAADQ	ARELINSWVE
	151	SQTNGIIRNV	LQPSVSDSQT	AMVLVNAIVF	KGLWEKAFKD	EDTQAMPFRV
	201	TEQESKPVQM	MYQIGLFRVA	SMASEKMKIL	ELPFASGTMS	MLVLLPDEVS
	251	GLEQLESIIN	FEK LTEWTSS	NVMEERIKV	YLPRMKMEEK	YNLTSVLMAM
	301	GITDVFSSSA	NLSGISSAES	LK ISQAVHAA	HAETINEAGRE	VVGSAEAGVD
351	AASVSEEFRA	DHPFLFCIKH	IATNAVLFFG	RCVSP		
B)	1	APPKSVIRWC	TISSPEEKKC	NNLRDLTQQE	RISLTCVQKA	TYLDCIK AI A
	51	NNEADAISLD	GGQVFEAGLA	PYKCLKPIAAE	VYHETEGSTT	SYAVAVVVK
	101	GTEFTVNDLQ	GKTSCHTGLG	RSAGWNIPIG	TLIHRGAI EW	EGIESGSVEQ
	151	AVAKFFSASC	VPGATIEQKL	CRQCKGDPKT	KCARNAPYSG	YSGAFHCLKD
	201	GKGDVAFVKH	TTVNEAPDQ	KDEYELLCLD	GSRQVDNYK	TCNWARVAAH
	251	AVVARDDNKV	EDIWSFLSKA	QSDFGVDT KS	DFHLEFP PGK	KDPVLKDLLF
	301	KDSAIMLKRV	PSLMDSQLYL	GFEYYSAIQS	MRKDQLTPSP	RENRIQWCAV
	351	GKDEKSKCDR	WSVVSNGDVE	CTVVDETKDC	IIKIMKGEAD	AVALDGLLVY
	401	TAGVCGLVPV	MAERYDDESQ	CSK TDERPAS	YFAVAVARKD	SNVNNWNLKG
	451	KKSCHTAVGR	TAGWVIPMGL	IHNRTGTCNF	DEYFSEGCAPI	GSPPNSRLCQ
	501	LCQSGGGIPP	EKCVASSHEK	YFGYTGALRC	LVEKGDVAIF	QHTVBEENTG
	551	GKNKADWAKN	LQMDDFELLC	TDGRRANVMD	YRECNLAIEVP	THAVVVRPEK
	601	ANKIRDLLER	QEKRFVNGS	EKSKFMMFES	QNKDLLFKDL	TKCLEFKVREG
651	TTYKEFLGDK	FYTVISSLKT	CNPSDILQMC	SFLEGG		
C)	1	MKLILCTVLS	LGIAAVCFPA	PPKSVIRWCT	ISSPEEKKN	LRDLTQQER
	51	ISLTCVQKAT	YLD CIKAI AN	NEADAISLDG	GQVFEAGLAP	YKCLKPIAAEV
	101	YEHEGSTTS	YYAVAVVVKG	TEFTVNDLQ	KTSCHTGLGR	SAGWNIPIGT
	151	LIHRGAI EW	GIESGSVEQA	VAKFFSASCV	PGATIEQKLC	RQCKGDPKTK
	201	CARNAPYSGY	SGAFHCLKDG	KGDVAVFKHT	TVNENAPDQ	DEYELLCLDG
	251	SRQPDNYKT	CNWARVAAHA	VVARDDNKVE	DIWSFLSKAQ	SDFGVDTK SD
	301	FHLFGPPGK	DPVLKDLLFK	DSAIMLKRPV	SLMDSQLYL	FEYYSAIQMS
	351	RKDQLTPSPR	ENRIQWCAVG	KDEKSKCDRW	SVVNSGDVEC	TVVDETKDCI
	401	IKIMKGEADA	VALDGGGLVYT	AGVCGLVPVM	AERYDDESQC	SK TDERPASY
	451	FAVAVAR KDS	NVNWNLKGG	KSCHTAVGRT	AGWVIPMGLI	HNRTGTCNFD
	501	EYFSEGCAPI	SPNSRLCQL	CQSGGIPPE	KCVASSHEK Y	FGYTGALRCL
	551	VEKGDVAFIQ	HSTVEENTGG	KNKADWAKNL	QMDDFELLCT	DGRRANVMDY
	601	RECNLAIEVPT	HAVVVRPEKA	NKIRDLLERQ	EKRFGVNGSE	KSKFMMFESQ
651	NKDLLFKDLT	KCLFKVREGT	TYKEFLGDKF	YTVISNLKTC		

Figura 17. Resultado del análisis, estadísticamente significativo, utilizando el motor de búsqueda Mascot. A) Cadena A de ovoalbúmina, B) Cadena A de ovotransferrina unida a Aluminio, C) Ovotransferrina tipo BB de *Gallus gallus*.

Utilizando datos de ms y ms/ms, se identificaron, con resultado estadísticamente significativo, las siguientes proteínas que se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Listado de las proteínas identificadas con resultado estadísticamente significativo.

Rotulo de la muestra	Peso mol. en el gel (kDa.)	Proteína identificada por Espectrometría de masas	Gi
Banda 1	>100	“Cadena A de Ovoalbúmina” “Cadena A de Ovotransferrina unida a Aluminio” / “Ovotransferrina tipo BB ” de <i>Gallus gallus</i> .	157879563 83754919/ 71274075
Banda 2	75	“ovotransferrina tipo BB ” y/o “ovotransferrina tipo CC ” de <i>Gallus gallus</i> .	71274075 71274077
Banda 3	53	“ovoalbúmina-relacionada al gen Y” de <i>Gallus gallus</i> .	71897377
Banda 4	45	“Cadena A de Ovoalbúmina ”	157879563
Banda 5	42	“Cadena A de Ovoalbúmina”	157879563

Gi: número de identificación utilizado por el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI).

Se encontraron diferentes variantes genéticas de ovoalbúmina y ovotransferrina que coinciden con lo que han publicado otros autores tales como Raikos *et al.* (2006), Guérin-Dubiard *et al.* (2006), Hoppe, (2010).

Con estos resultados se puede inferir que el proceso de pasteurización en seco produce desnaturalización de las proteínas mayoritarias de la albúmina de huevo: ovoalbúmina y ovotransferrina, con la formación de agregados. Los resultados de la electroforesis e identificación de proteínas muestran la

desnaturalización de la ovotransferrina, visualizada con la disminución de la banda en la corrida lo cual se atribuye a su baja temperatura de desnaturalización ($T_D \approx 63^\circ\text{C}$).

Por otra parte, el grado de desnaturalización de la ovoalbúmina se observó en la aparición de dos bandas en el Rf de las albúminas de huevo pasteurizadas que se corresponde al de ovoalbúmina de la muestra sin pasteurizar; esto puede explicarse por la mayor temperatura de desnaturalización de esta proteína ($T_D \approx 82^\circ\text{C}$) según lo determinado por calorimetría diferencial de barrido. En ambos casos es mayor la degradación con el aumento de temperatura aplicada a la albúmina de huevo.

Se comprobó que los tratamientos térmicos inducen la agregación de proteínas con la coexistencia de formas poliméricas que se visualizaron en la electroforesis con pesos moleculares mayores a 100 kDa. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Matsudomi *et al.*, (2001) para ovoalbúmina, quienes pudieron comprobar que la concentración de agregados aumenta al disminuir la concentración de las formas monoméricas.

I.1.1.6. Identificación de péptidos bioactivos

En la Figura 18 se muestra la secuencia aminoacídica de la cadena A de ovoalbúmina y ovoalbúmina relacionada al gen Y identificadas en las muestras de albúmina de huevo con propiedades de batido y albúmina con propiedades gelificantes, tanto en forma monomérica como en los agregados, con indicación de los péptidos identificados.

A)

```

1 GSIGAASMEF CFDVKELKV HHANENIFYC PIAIMSALAM VYLGAKDSTR
51 TQINKVVRFD KLPFGGDSIE AQCSTSVNVH SSLRDILNQI TKPNDVYSFS
101 LASRLYAEER YPILPEYLQC VKELYRGGLE PINFQTAADQ ARELINSWVE
151 SQTNGIIRNV LQPSSVDSQT AMVLVNAIVF KGLWEKAFKD DTQAMPFRV
201 TEQESKPVQM MYQIGLFRVA SMASEKMKIL ELPFASGTMS MLVLLPDEVS
251 GLEQLESIIN FEKLTWETSS NVMEERKIKV YLPRMKMEEK YNLTSVLMAM
301 GITDVFSSSA NLSGISSAES LKISQAVHAA HAEINEAGRE VGSAAEAGVD
351 AASVSEEFRA DHPFLFCIKH IATNAVLFFG RCVSP
    
```

B)

```

1 MDSISVTNAK FCFDVFNEMK VHHVNENILY CPLSILTALA MVYLGARGNT
51 ESQMKKVLHF DSITGAGSTT DSQCGSSEYV HNLFKELLSE ITRPNATYSL
101 EIADKLYVDK TFSVLPEYLS CARKFYTGCVV EEVNFKTAAE EARQLINSWV
151 EKETNGQIKD LLVSSSIDFG TTMVFINTIY FKGIWKIAFN TEDTREMPPS
201 MTKEESKPVQ MMCMNNSFNV ATLPKMKKI LELPYASGDL SMLVLLPDEV
251 SGLERIEKTI NFDKLEWTS TNAMAKKSMK VYLPRMKIEE KYNLTSILMA
301 LGMTDLFSRS ANLTGISSVD NLMISDAVHG VFMEVNEEGT EATGSTGAIG
351 NIKHSLELEE FRADHPFLFF IRYNPTNAIL FFGRYWSP
    
```

Figura 18. Secuencia aminoacídica de: A) cadena A de ovoalbúmina, B) ovoalbúmina relacionada al gen Y

Letras en color rojo: péptidos caracterizados

Resaltado en amarillo: péptidos con actividad antihipertensiva

Resaltado en celeste: péptido con actividad antioxidante

Como puede apreciarse se identificaron los péptidos con actividad antihipertensiva (según datos bibliográficos): FRADHPFL e IVF. La primera secuencia corresponde al fragmento 358-365 de ovoalbúmina y contiene los péptidos RADHPFL y RADHPF (Miguel *et al.* 2004; Miguel *et al.*, 2006; Miguel *et al.*, 2007, Mine 2007; Hoppe 2010).

Es notoria la elevada incidencia de enfermedades coronarias en la población, y el tratamiento de la hipertensión constituye una de las estrategias más utilizadas para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. El mecanismo de acción de estos péptidos se ha explicado mediante la inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que cataliza la formación de angiotensina, con una potente actividad vasoconstrictora y, además, inactiva la bradiquinina, que produce vasodilatación (Miguel *et al.*, 2004).

Otro grupo de péptidos bioactivos de gran importancia es el de los péptidos con actividad antioxidante. El envejecimiento y diversas patologías (alteraciones neurológicas, procesos cancerosos, cataratas, etc.) están relacionados con la oxidación de componentes celulares, como lípidos, proteínas o ADN, por lo que la inclusión de antioxidantes en la dieta tiene un carácter preventivo. Además, de su acción biológica, estos compuestos

pueden prevenir la oxidación de las grasas, evitando la aparición de sabores desagradables en los alimentos, bien actuando como secuestradores de radicales libres o inhibiendo enzimas relacionadas con la oxidación de las grasas.

Los resultados de las investigaciones mencionadas anteriormente, sugieren la posibilidad de utilizar los péptidos antihipertensivos derivados de proteínas de albúmina de huevo con fines sanitarios. Resulta especialmente atractiva la idea de utilizarlos como ingredientes en alimentos funcionales para la prevención y/o el tratamiento de la hipertensión.

I.1.2. Caracterización funcional

I.1.2.1. Evaluación de la capacidad espumante y estabilidad de la espuma

La capacidad espumante está relacionada con la velocidad a que la tensión superficial de la interfase aire/agua disminuye. Los datos de expansión y estabilidad de espuma, tanto de albúmina de huevo sin pasteurizar como de albúmina con propiedades de batido, se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Expansión de la espuma en albúmina de huevo sin pasteurizar y en albúmina con propiedades de batido

Muestra	Expansión de la espuma (%)
Albúmina de huevo sin pasteurizar	913,33±11,55 a
Albúmina de huevo con propiedades de batido	956,66±15,27 b

Los datos se expresan como promedio \pm desviación estándar, n=10. Los promedios con diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0,05$)

La albúmina de huevo con propiedades de batido tiene significativamente mayor expansión en la formación de la espuma en relación a la albúmina sin pasteurizar, producto del tratamiento térmico y agregado de agentes espumantes. Este incremento fue de un 4,7%. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Lechevalier *et al.*, (2005), quienes reportan que el desglucosado y el proceso de secado disminuyen la capacidad de expansión de la espuma.

La estabilidad de la espuma se realizó midiendo el volumen de líquido de drenaje en función del tiempo y se presenta en la Figura 19.

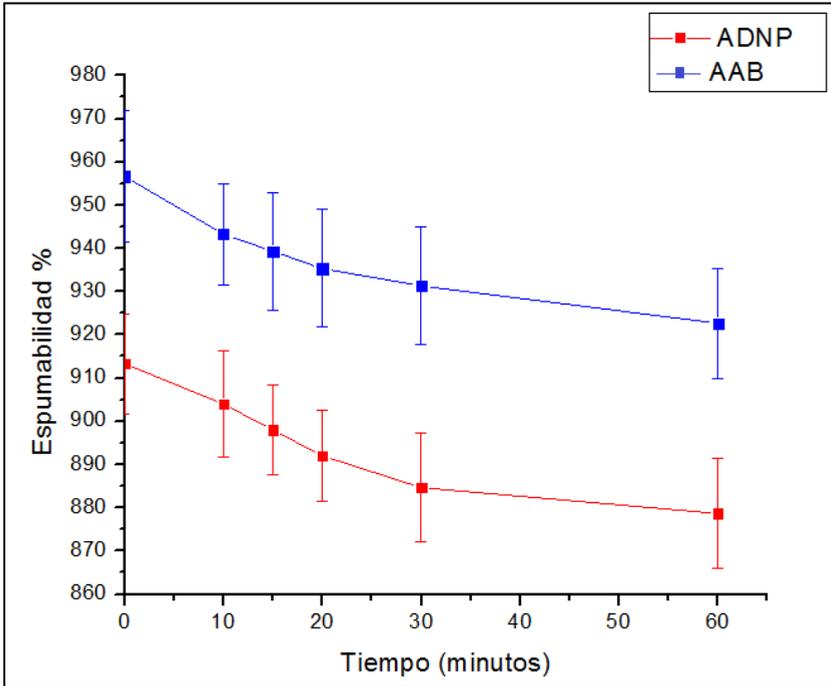


Figura 19. Estabilidad de la espuma en albúmina de huevo deshidratada con propiedades espumantes (AAB) y albúmina de huevo deshidratada no pasteurizada (ADNP)

La capacidad de estabilidad de la espuma está relacionada con la velocidad a la que disminuye la tensión superficial de la interfase aire/agua. Los datos de estabilidad son similares en las muestras estudiadas: 3,79% para la albúmina de huevo con propiedades de batido y 3,55% para la albúmina sin pasteurizar. Las dos muestras no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$).

I.1.2.2. Perfil de textura de geles por compresión

El análisis del perfil de textura por compresión (PTC) permitió determinar los parámetros de dureza, gomosidad, viscosidad, cohesividad y elasticidad.

El PTC se compone de un ciclo de dos compresiones que produce una salida de dos picos como se observa en la Figura 20.

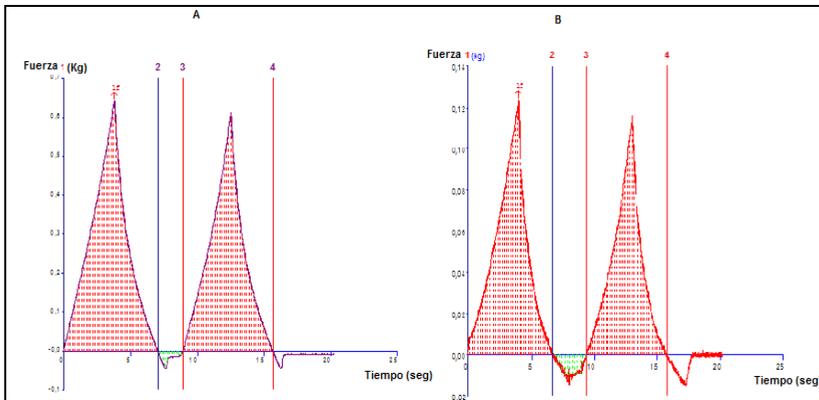


Figura 20. Curva representativa del PTC: A) en albúmina de huevo con propiedades gelificantes, B) en albúmina de huevo sin pasteurizar

Se efectuaron 6 repeticiones para cada unidad experimental ensayada y los resultados fueron expresados como media para cada tratamiento. Los parámetros texturales, calculados automáticamente por el programa de User Guide (Texture Expert for Windows Version 1.0, Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra) se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros del PTC y retención de agua

Muestra	Firmeza (Kg)	Cohesividad	Elasticidad	Adhesividad	Retención de agua %
Albúmina de huevo no pasteurizada	0,115 a	0,811 a	0,941 a	-0,015 a	47,85 a
Albúmina de huevo con propiedades gelificantes	0,587 b	0,878 a	0,992 a	-0,018 a	71,25 b

Los datos se expresan como promedio \pm desviación estándar, n=6. Los promedios en cada columna y con diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0,05$)

La firmeza es una medida de la intensidad del tratamiento térmico y la habilidad de la albúmina de huevo de unirse al agua y retenerla. Su monitoreo es un parámetro de calidad de las empresas de procesamiento de albúmina en polvo (Kato *et al.*, 1990). Se determina como la fuerza máxima en el primer ciclo de compresión. Como puede observarse, la albúmina de huevo con propiedades gelificantes aumentó un 19,6% a los tiempos ensayados, al mismo tiempo que la retención de agua se incrementó un 67,15% con el proceso de desnaturalización de las proteínas en estado seco. Fueron los únicos parámetros que presentaron diferencia significativa ($p < 0,05$) en los resultados obtenidos.

I.1.2.3. Determinación de la adsorción de agua

Los datos de humedad experimentales obtenidos en el equilibrio, en función de la a_w a 20°C se ajustaron con las ecuaciones de Guggenheim, Anderson y Boer (GAB) y Oswin para las muestras de albúmina de huevo con propiedades de batido, albúmina con propiedades gelificantes y la muestra control de albúmina de huevo sin pasteurizar, con el objetivo de evaluar el efecto de los tratamientos térmicos frente a la adsorción de agua.

En la Figura 21 se presentan las curvas ajustadas de acuerdo a las ecuaciones de GAB y Oswin.

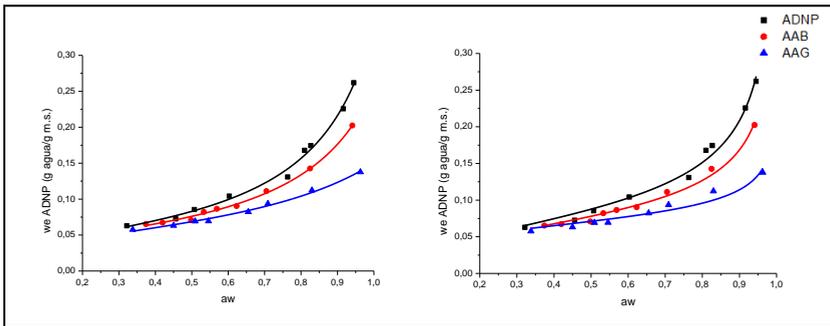


Figura 21. Gráficas de adsorción ajustadas según las ecuaciones de a) GAB y b) Oswin en albúmina de huevo deshidratada sin pasteurizar (ADNP), albúmina de huevo con propiedades de batido (AAB) y albúmina de huevo con propiedades gelificantes (AAG).

Puede observarse que se obtuvieron isotermas de Tipo II de las cinco establecidas por Brunauer, Deming y Teller en 1940 (Mathlouthi y Roge, 2003). Estas isotermas tienen forma sigmoidea característica de productos solubles y muestran una tendencia asintótica conforme la actividad de agua se acerca a la unidad. Esta tendencia se observa disminuida en la albúmina de huevo con propiedades gelificantes. Curvas similares describen Lagoudaki y Demertzis (1993), Martínez *et. al.*, (1998), Timmermann *et al.* (2001).

También se aprecia que el contenido de humedad de equilibrio presenta dependencia con el tratamiento de pasteurización, adsorbiendo más agua la muestra no pasteurizada, probablemente debido a la menor exposición de grupos no polares presentes en el interior de las proteínas globulares en las albúminas. Los tratamientos térmicos de pasteurización disminuyen la capacidad higroscópica del producto.

Las ecuaciones de GAB y Oswin modelan muy bien los datos experimentales de este estudio, si bien algunos autores como Chenoll (2008) describen que el mejor modelo para predecir las isotermas de proteínas es el de Oswin. En la Tabla

10 se presentan los valores de las constantes obtenidas a partir de estos modelos.

Tabla 10. Resumen de datos obtenidos para los ajuste según los modelos de GAB y Oswin en las tres muestras.

Modelo	Constantes del modelo	ADNP	AAB	AAG
GAB	W_0	0,051	0,047	0,049
	K	19,086	31,946	20,300
	C	0,853	0,818	0,676
	r^2	0,991	0,995	0,989
Oswin	A	0,087	0,078	0,071
	B	0,394	0,351	0,215
	r^2	0,984	0,988	0,933

W_0 : humedad de la monocapa (g agua/g masa seca), C: constante de Guggenheim, relacionada con el calor de sorción de la monocapa, K: factor relacionado con el calor de sorción de la multicapa. A y B: parámetros de ajuste del modelo de Oswin.

AAB: albúmina de huevo con propiedades de batido; AAG: albúmina de huevo con propiedades gelificantes; ADNP: albúmina de huevo sin pasteurizar.

Como puede observarse ambas ecuaciones ajustan adecuadamente los datos experimentales de las muestras estudiadas con factores de correlación (r^2) entre 0,933 y 0,988 para la ecuación de Oswin y 0,989 a 0,995 para la ecuación de GAB. Los valores de humedad de los productos (W_0) correspondientes a la situación en que los puntos de adsorción primarios están saturados por moléculas de agua son

respectivamente: 0,051 g agua/ g m.s. para albúmina de huevo sin pasteurizar, 0,047 g agua/ g m.s. para albúmina con propiedades de batido y 0,049 g agua/ g m.s. para albúmina con propiedades gelificantes. Los valores obtenidos para las constantes de Oswin y GAB son similares a los reportados por Lagoudaki y Demertzis (1993) para albúmina de huevo deshidratada.

En un mismo alimento se observan diferentes patrones de adsorción: la albúmina de huevo sin pasteurizar se hidrata más rápidamente, la albúmina con propiedades de batido posiblemente tiene un comportamiento diferente debido a la exposición de residuos hidrófobos de los aminoácidos que, generalmente, están ubicados en el interior de las proteínas globulares y por el agregado de espumantes y estabilizantes. En la albúmina con propiedades gelificantes puede, además, considerarse la formación de agregados insolubles por el aumento de la temperatura del tratamiento térmico.

Cabe señalar que desde el punto de vista de los microorganismos para un mismo valor de humedad hay más agua disponible en las albúminas de huevo pasteurizadas.

I.1.3. Análisis microbiológico

Se estudiaron los microorganismos presentes en las albúminas de huevo pasteurizadas, muestras que, como se ha mencionado anteriormente, son las matrices de calentamiento en los estudios de resistencia térmica. Los resultados se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados análisis microbiológicos

Determinaciones	Albúmina con propiedades de batido	Albúmina con propiedades gelificantes
Aerobios Mesófilos Totales	$6,0 \pm 3,5 \times 10^2$ UFC/g	$6,0 \pm 4,2 \times 10^2$ UFC/g
Coliformes Totales	100 ± 90 UFC/g	$50 \pm 40 \times 10^2$ UFC/g
Mohos filamentosos y Levaduras	70 ± 10 UFC/g	10 ± 10 UFC/g
<i>Bacillus cereus</i>	<10 UFC/g	<10 UFC/g
<i>Salmonella</i> spp. (PCR)	Ausencia en 25 g	Ausencia en 25 g

La baja densidad poblacional de microorganismos en las muestras y la ausencia de *Salmonella* spp. sugirieron que estas matrices pueden utilizarse sin previo tratamiento de eliminación de microorganismos en los estudios de resistencia térmica que se presentan en el próximo capítulo.

**CAPITULO II: CARACTERIZACIÓN DE
CEPAS DE SALMONELLA, TOLERANCIA A
ÁCIDO Y MUERTE TÉRMICA EN CALDO
NUTRITIVO Y ALBÚMINA DE HUEVO
DESHIDRATADA**

Desde el año 1998 en la Facultad de Bromatología de la Universidad Nacional de Entre Ríos se ha trabajado en el aislamiento de cepas de *Salmonella* en toda la cadena de la industria avícola, a través de proyectos de investigación en la temática y desde el Área de Servicios a Terceros.

En el caso particular de aislamientos de huevos se trabajó con muestras seleccionadas que procedían de granjas comerciales y domésticas situadas en los alrededores del casco urbano y de comercios de la ciudad de Gualeguaychú, Entre Ríos, o bien se obtuvieron de análisis que fueron solicitados.

Después del año 2008 resultó interesante encarar los estudios de resistencia térmica de cepas de *Salmonella* aisladas de huevos en albúmina deshidratada y pasteurizada a diferentes temperaturas, ya que son ingredientes de baja actividad de agua donde las células bacterianas pueden reducir su metabolismo y a su vez inducir mecanismos de respuesta al estrés que incrementen la resistencia al calor y prolonguen su supervivencia en el producto.

Otra cuestión que se consideró importante para llevar adelante estos estudios fue la prevalencia de *Salmonella* spp. en huevos en la región. Los trabajos presentados por investigadores del Centro Regional Entre Ríos del Instituto Nacional de

Tecnología Agropecuaria (INTA) informaron una prevalencia del 8% en 1,643 muestras estudiadas sobre huevos comercializados en supermercados del centro-este de la provincia. Asimismo, la prevalencia en granjas para *Salmonella* spp fue de un 60% y de éstas un 13% correspondió al serotipo S. Enteritidis (Soria, 2013).

Por otra parte, en los Estados Unidos, (USDA-FSIS) ha llegado a la conclusión de que las normas actuales del proceso de pasteurización de productos de huevo en polvo no son completamente eficaces en la eliminación de *Salmonella* spp. y que los modelos predictivos estiman que hasta 5.500 personas por año pueden contraer salmonelosis por estos productos. *Salmonella* fue recuperada de 0,47% de ovoproductos pasteurizados entre los años 1998 y 2003 (Gurtler y Kornacki, 2009).

Si bien *Salmonella* spp. no se caracteriza por ser una bacteria que presente elevada termorresistencia, se han encontrado serotipos que, en alimentos de baja humedad como en medios de cultivo, han presentado protección al calor (Doyle *et al.*, 2001).

Se ha documentado que son varios los factores que afectan la resistencia al calor, incluyendo temperatura de crecimiento,

etapa del crecimiento, la población inicial, las cepas bacterianas, composición y pH de la matriz, choque térmico, y la metodología utilizada para la detección de las bacterias supervivientes (Juneja *et al.*, 2001).

Los estudios publicados sobre la resistencia térmica de *Salmonella* demuestran que, en alimentos de actividad de agua baja, se presentan valores altos en el tiempo de reducción decimal cuando se compara con matrices húmedas, dependiendo del serotipo y de la matriz alimentaria (Podolak *et al.*, 2010).

Por todo lo expuesto se decidió evaluar, primeramente, la resistencia térmica en caldo nutritivo para comparar los efectos del calor en una matriz líquida. Posteriormente, se evaluó la supervivencia y mortalidad de *Salmonella* en albúmina de huevo deshidratada a las temperaturas de pasteurización utilizadas en la industria con el propósito de identificar las combinaciones eficaces de temperatura y tiempo que aseguren la inocuidad del producto, manteniendo las propiedades nutritivas y funcionales.

Los estudios térmicos se realizaron a tres temperaturas: 72, 77 y 82°C, utilizadas en la pasteurización industrial. Se eligió una temperatura intermedia para evaluar el efecto a esa temperatura y facilitar los cálculos de los parámetros z de cada cepa en estudio.

Resultó interesante también, evaluar si las cepas elegidas presentaban tolerancia a ácidos orgánicos, producto de su supervivencia en situaciones ambientales estresantes, que pudiese generar una ventaja en la resistencia térmica.

La metodología y los resultados de estos estudios son los que se presentan a continuación y se espera que proporcionen las bases que sustenten los estudios térmicos en cócteles de cepas de un mismo serotipo o en inóculos mixtos de distintos serotipos. Los resultados de estos estudios se aplicarán en posteriores investigaciones de esta tesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Materiales

Se estudiaron 204 lotes de huevos de gallina elegidos intencionalmente (fisurados, sucios, con cáscara incompleta) adquiridos en comercios, granjas domésticas y granjas comerciales de la ciudad de Gualguaychú o de la población rural y también de muestras de análisis a terceros. De cada lote se trabajó con una muestra compuesta por 5 a 15 huevos que se procesaron entre los meses de abril a noviembre durante los años 1998-2008.

II.2. Metodología

II.2.1. Aislamiento y tipificación de cepas de *Salmonella*

Para el aislamiento y tipificación de las cepas se siguieron las metodologías descritas por ICMSF (1985) y Parte I: Aislamiento, Identificación y Serotipificación de *Salmonella* del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (INEI-ANLIS) “Dr. Carlos G. Malbrán (Caffer y Terragno, 2001). Primeramente se realizó un pre-enriquecimiento no selectivo partiendo de una dilución 1/10 p/v de huevos o cáscaras en agua peptonada tamponada (pH 7,2) Merck Química Argentina S.A.I.C. (filial de Merck KGaA, Alemania) y se incubó a 37°C ± 1°C por 24 horas. Se inoculó 1 ml del agua peptonada

incubada en 10 ml de caldo selenito cisteína (SC) Oxoid (Inglaterra) y en 10 ml de caldo tetratonato verde brillante (TVB) Oxoid (Inglaterra); ambos caldos se incubaron a $41^{\circ}\text{C}\pm 0,2$ por 24 horas, el SC en baño maría y el TVB en estufa.

Posteriormente se procedió a la inoculación de una ansada por agotamiento sobre la superficie de agar xilosa lisina desoxicolato (XLD), agar verde brillante (VB) y agar sulfito bismuto (SB) Oxoid (Inglaterra). Se incubaron las placas a $37^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Se seleccionaron las colonias típicas y se les realizaron pruebas bioquímicas y de serotipificación.

Las pruebas bioquímicas ensayadas fueron: desarrollo en agar hierro triple azúcar (TSI), hidrólisis de la urea en agar de Christensen, determinación de lisina y ornitina decarboxilasa y arginina dehidrolasa, prueba de la β -galactosidasa (ONPG), prueba del rojo de metilo, reacción de Voges Proskauer, fermentación del dulcitol y utilización del malonato.

La serotipificación somática y flagelar se realizó en forma conjunta con el Instituto de Producción de Biológicos INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán, siguiendo el protocolo que se muestra en la Figura 22 y de acuerdo con el esquema de Kauffmann-White (Popoff, 2001).

Se realizó la tipificación de los aislamientos que se correspondieron con *Salmonella enterica* de los serotipos *S. Enteritidis* (3 cepas), *S. Typhimurium* (2 cepas), *S. Hadar* (2 cepas), *S. Oranienburg* (1 cepa), *S. Infantis* (2 cepas) y *S. Montevideo* (3 cepas).

Para los estudios del presente capítulo se seleccionaron en total 7 cepas: 3 de *S. Enteritidis*, 2 de *S. Typhimurium* y 2 de *S. Montevideo* utilizando los criterios de mayor ocurrencia en las muestras de huevo estudiadas, mayor incidencia en enfermedades transmitidas por los alimentos en Argentina y diferente resistencia a los antibióticos ensayados.

La cepa 1(SE/01/98) de *S. Enteritidis* fue aislada a partir de una muestra de huevo adquirida en un mercado local. La cepa 2 (SE/02/98) fue aislada en el año 1998 de una granja avícola de una empresa mediana localizada en las proximidades de la ciudad de Gualeguaychú. La cepa 3(SE/05/06) se aisló de una muestra de huevos que ingresó por servicios a terceros en el año 2006. Estos aislamientos se obtuvieron del análisis de huevo entero (yema y albúmina).

La cepa 1(ST/01/06) de *S. Typhimurium* se aisló de huevos de una granja doméstica en el año 2006 y la cepa 2 se aisló en el

año 2007 de huevos de gallinas de una granja comercial, ambas ubicadas en la periferia de la ciudad de Gualeguaychú. Las dos cepas se aislaron de cáscara de huevos.

La cepa 1(SM/01/97) de *S. Montevideo* se aisló de cáscaras de huevos adquiridos en el mercado local, en 1997, la cepa 2 (SM/02/98) se aisló de cáscaras de huevos provenientes de una granja comercial de gran escala, en 1998.

II.2.2. Conservación de cepas tipificadas

Todas las cepas fueron almacenadas a -30°C en caldo tripteína soja con el agregado de un 50% (v/v) de glicerol. Para los estudios se mantuvieron a 4°C en agar tripteína de soja o se subcultivaron caldo en infusión cerebro corazón (BHI) Britania (Argentina) a 37°C durante 24 horas, antes de utilizarlas en las experiencias.

II.2.3. Resistencia a los antibióticos

La determinación de la resistencia microbiana a los antibióticos se realizó con el propósito de completar la diferenciación fenotípica de las cepas. Se utilizó el método de disco- difusión en agar descrito en el Manual de Procedimientos Sensibilidad a los antimicrobianos en *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* del Centro Regional de Referencia

de la Organización Mundial de la Salud para América del Sur (Pasterán y Galas, 2008).

Se comenzó con colonias seleccionadas de cada aislamiento en agar tripteína de soja (ATS), Oxoid (Inglaterra) de 24 horas de incubación. Se ajustó la densidad de los cultivos (en fase logarítmica decimal) con solución salina por comparación visual hasta lograr una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. Dentro de los 15 minutos después de ajustado el inóculo, se inocularon placas de agar Mueller Hinton, Britania (Argentina) estriándolas en tres direcciones divergentes con un hisopo estéril embebido con el inóculo. Se colocaron los discos sobre la superficie del agar con una pinza estéril y las placas se incubaron en aerobiosis a $35^{\circ}\text{C}\pm 2$ por 24 horas, colocándolas invertidas en estufa dentro de los 15 minutos posteriores a la colocación de los discos. Una vez incubadas se midieron los diámetros de los halos de inhibición de acuerdo con lo recomendado por Pasterán y Galas (2008) y la interpretación de los resultados se realizó según los puntos de corte indicados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2009). El control de calidad de la prueba de sensibilidad se realizó con la cepa de referencia *E. coli* ATCC 25922.

Los antibióticos probados, marca Britania (Argentina) fueron los siguientes: ampicilina, 10 µg; ciprofloxacina; 5 µg; cloranfenicol 30 µg; cefotaxima, 30 µg; fosfomicina, 200 µg; gentamicina, 10 µg; ácido nalidíxico 30 µg; nitrofurantoína 300 µg; tetraciclina, 30 µg y trimetoprima/sulfametoxazol, 1,25/23,75 µg .

II.2.4.Respuesta de tolerancia al ácido

Se decidió determinar la cinética de inactivación de las células adaptadas a la acidez tras su exposición a un pH extremo en medios de laboratorio con el fin de comprobar la aparición de respuestas de tolerancia ácida en cada una de las cepas de *Salmonella* que fueron seleccionadas en este estudio.

Para realizar estas determinaciones se evaluó la respuesta de tolerancia al ácido acético pH 3,5. Estas condiciones se establecieron atendiendo lo reportado por Greenacre *et al.* (2003) quienes demostraron que este ácido fue más eficiente en la inducción de la respuesta de tolerancia al ácido en *S. Typhimurium*.

Experimentalmente existen diferentes formas de lograr una adaptación de los microorganismos a las condiciones ácidas, en forma gradual o mediante el empleo de un shock ácido, en cuyo

caso la adaptación se produce violentamente. En la adaptación gradual, los microorganismos se inoculan en un medio de desarrollo determinado que presenta en su composición un exceso de glucosa. Como producto de la fermentación de este glúcido, se produce un descenso progresivo del pH del medio de cultivo provocando la adaptación de los microorganismos, presentes en el mismo, en forma gradual.

Las células bacterianas se utilizaron en fase estacionaria de crecimiento dado que se ha demostrado que tanto la respuesta adaptativa como la de tolerancia al ácido proporcionan mayor resistencia a la acidez en esta fase que en la logarítmica (Doyle *et al.*, 2001).

Para los estudios de adaptación a ácido, se trabajó con cada uno de los aislamientos puros de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Montevideo* por separado. Los cultivos se inocularon en caldo nutritivo suplementado con 10 g/l de glucosa (CNG). La concentración del inóculo se ajustó a aproximadamente $8 \log_{10}$ (UFC/ml) utilizando un espectrofotómetro Biochrom Libra S22 UV-Vis, de simple haz (Inglaterra) a una densidad óptica entre 0,5 a 0,6 y a 600 nm.

La incubación se realizó a 37°C durante 18 horas en condiciones estáticas. Luego se midió el pH del cultivo y se sembró en la superficie de placas de ATS con 0,6% de extracto de levadura (EL) Britania (Argentina) para evaluar su viabilidad (Gurtler y Kornacki, 2009).

Para los estudios de tolerancia a ácidos orgánicos, las cepas se incubaron en caldo nutritivo (CN) suplementado con ácido acético marca Merck (Argentina) en una concentración de 12,28 moles/l hasta alcanzar un pH de 3,5 por 6 horas a 37°C (Da Silva *et al.*, 2009).

Para determinar la supervivencia de los cultivos en diferentes tiempos de tratamiento se tomaron 100 µl de muestra y se realizaron diluciones al décimo en agua peptonada 0,1%. Posteriormente se sembraron 100 µl sobre la superficie de placas de agar ATS con 0,6% de EL por 24-48 horas a 37°C. Una vez que el agar presentó desarrollo bacteriano se realizaron subcultivos en Agar verde brillante (AVB) Oxoid (Inglaterra) (Gurtler, 2009) y las colonias morfológicamente compatibles con *Salmonella* se identificaron en agar TSI y agar lisina hierro, Oxoid (Inglaterra).

Cuando la técnica de siembra directa no pudo detectar *Salmonella*, se realizó un enriquecimiento en caldo tripteína de soja adicionado de 0,6% de EL, seguido de un subcultivo en AVB y posterior confirmación de las colonias mediante las pruebas bioquímicas ya mencionadas (*vide supra*).

Cada experimento se llevó a cabo por duplicado.

II.2.5 Estudios de resistencia térmica

II.2.5.1. En caldo nutritivo

Para estudiar la termorresistencia en CN de las 7 cepas seleccionadas, se comenzó con una sola colonia, de cada cepa, desarrollada en ATS que se inoculó, por separado, en CN a 37°C por 24 horas \pm 2. Posteriormente estos cultivos se centrifugaron, se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron en CN pH 7,4 hasta obtener un valor de densidad óptica situado entre 0,5-0,6 a 600 nm utilizando un espectrofotómetro Biochrom Libra S22 UV-Vis, de simple haz (Inglaterra).

Se determinó la densidad del inóculo en el caldo realizando diluciones seriadas (1:10) en 9 ml de agua peptonada al 0,1%, y sembrando, por duplicado, 100 μ l en la superficie de placas de ATS con 0,6% de EL. Se incubaron a 37°C durante 24 horas y se realizaron los recuentos que se expresaron en UFC/ml.

Simultáneamente se cargaron 50 µl de CN inoculado mediante una jeringa, en tubos capilares estériles, con un extremo sellado (Oteiza *et al.*, 2003; Jordan *et al.*, 2010, Gurtler *et al.*, 2013), se selló el otro extremo y se sumergieron totalmente en un termostato de inmersión marca Julabo (Alemania) con estabilidad de temperatura $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$ a 72-77 y 82°C. En estos estudios se consideró instantáneo el tiempo necesario para alcanzar la misma temperatura en todo el capilar.

A diferentes tiempos de tratamiento, se retiraron dos tubos capilares del baño térmico e inmediatamente se enfriaron con hielo. Los capilares se limpiaron con alcohol étílico 96°, se rompieron asépticamente en un solo extremo y el contenido se introdujo dentro de un tubo de ensayo con 450 µl de agua peptonada al 0,1% y se mezcló exhaustivamente mediante vortex. Seguidamente, se realizaron diluciones seriadas (1:10) en 4,5 ml de agua peptonada al 0,1%. Se tomaron 100 µl de cada dilución y se sembraron, por duplicado, sobre la superficie de ATS con 0,6% de EL, pues fue el medio de cultivo que mejor recuperó las células bacterianas injuriadas por calor (ver Anexo 1). Se incubó a 37°C durante 24 horas. El crecimiento en ATS se subcultivó a placas de AVB y posteriormente se realizó una confirmación bioquímica utilizando agar TSI y agar lisina hierro.

Los recuentos se expresaron en UFC/ml. El límite de detección fue de $2 \log_{10}$ UFC/ml. Cuando no se pudo detectar *Salmonella* utilizando la técnica de siembra directa se realizó un enriquecimiento en caldo tripteína de soja adicionado con 0,6% de EL, seguido de un subcultivo en AVB y posterior confirmación de las colonias por pruebas bioquímicas.

II.2.5.2. Efecto de la actividad acuosa dada por diferentes tipos de albúmina de huevo deshidratada sobre la resistencia térmica de diferentes cepas de *Salmonella*

Para los estudios de resistencia térmica en albúmina de huevo deshidratada se utilizaron como matrices, por separado: albúmina con propiedades de batido y albúmina con propiedades gelificantes que presentaron una a_w de 0,374 y 0,338 respectivamente. Los estudios de muerte térmica se llevaron a cabo para las 7 cepas seleccionadas. Se comenzó con una colonia, de cada cepa, desarrollada en ATS que se inoculó, por separado, en CN a 37°C por 24 horas \pm 2 horas. Posteriormente estos cultivos se centrifugaron, se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron en CN a pH 7,4 hasta obtener un valor de densidad óptica situado entre 0,5-0,6 a 600 nm utilizando un espectrofotómetro Biochrom Libra S22 UV-Vis, simple haz (Inglaterra).

Se contaminaron las matrices inoculándolas mediante dispersión por atomización con *circa* 1 ml de cultivo/g de albúmina de huevo deshidratada. Cada muestra contaminada se secó en estufa a 30°C por 30 minutos, se colocaron en bolsas de polietileno estériles y se homogeneizaron. Se determinó la densidad del inóculo en ambas matrices previa realización de diluciones decimales a partir de 1 g de muestra y sembrando 100 µl de cada dilución sobre la superficie de placas de ATS adicionado con 0,6% de EL. Las placas se incubaron a 37° C por 24 horas y, después de la incubación, se realizaron los recuentos.

Simultáneamente se cargaron, con 25 µg, de cada una de las matrices contaminadas, tubos capilares estériles (Oteiza *et al.*, 2003; Jordan *et al.*, 2010), sellados en uno de sus extremos, se selló el otro extremo y se sumergieron totalmente en un termostato de inmersión marca Julabo (Alemania), como se observa en la Figura 23, con estabilidad de temperatura $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$.

Este experimento, de tipo isotérmico, se llevó a cabo empleando tres temperaturas de trabajo: 72, 77 y 82°C y se consideró instantáneo el tiempo necesario en alcanzar la misma temperatura en todo el capilar.



Figura 23. Imágenes del termostato utilizado en los estudios térmicos

Fuente: fotos tomadas por la autora de la tesis

A diferentes tiempos de tratamiento, se retiraron dos tubos capilares del baño térmico e inmediatamente se enfriaron con hielo para detener el proceso de calentamiento. Los capilares se limpiaron con alcohol etílico 96°, se rompieron asépticamente en un solo extremo y el contenido se introdujo dentro de tubos conteniendo 225 μl de agua peptonada al 0,1% (dilución 1:10), realizando una mezcla exhaustiva mediante vortex (Oteiza *et al.*, 2003). Seguidamente, se efectuaron las siguientes diluciones decimales: la dilución 1:100 se realizó tomando 100 μl que se

colocaron en 900 µl de agua peptonada al 0,1% y las restantes tomando 500 µl en 4,5 ml de agua peptonada al 0,1%. De cada dilución se tomaron 100 µl y se sembraron, por duplicado, en la superficie de placas conteniendo ATS adicionado de 0,6 % de EL. Se incubó a 37°C durante 24 horas.

Las colonias desarrolladas se subcultivaron en placas con AVB y fueron posteriormente identificadas en agar TSI y agar lisina hierro.

Los recuentos se expresaron en \log_{10} UFC/g. El límite de detección fue de $2 \log_{10}$ UFC/g. Cuando la técnica de siembra directa no pudo detectar *Salmonella*, se realizó un enriquecimiento en caldo tripteína de soja adicionado con 0,6% de EL, seguido de un repique en placas de AVB y posterior confirmación de las colonias por pruebas bioquímicas.

II.2.6. Evaluación de la cinética de muerte

Las curvas de supervivencia se generaron a partir de la información experimental para cada condición ensayada, por medio de la representación gráfica del logaritmo decimal de la razón entre el número de microorganismos sobrevivientes, N y el número inicial de microorganismos, N_0 ($\log_{10} (N/N_0)$) en función del tiempo de tratamiento (t).

Se utilizó la inversa de la pendiente de la curva de supervivencia para determinar el tiempo de reducción decimal “D”, tiempo necesario para destruir el 90% de la población bacteriana.

Para estudiar la influencia de la temperatura sobre el tiempo de reducción decimal, se representó el logaritmo (en base 10) de D en función de la temperatura. Se utilizó la inversa de la pendiente de la curva de destrucción térmica para determinar el valor “z” que representa la variación de temperatura a la que el valor D disminuye por un factor de 10.

II.2.7. Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial para evaluar los efectos de temperatura de calentamiento sobre las cepas de cada serotipo, las matrices y los tratamientos previos:

Tres temperaturas: 72, 77 y 82°C

7 cepas de tres serotipos: 3 cepas de *S. Enteritidis*, 2 cepas de *S. Typhimurium* y 2 cepas de *S. Montevideo*.

Tres matrices: Dos matrices sólidas de diferente a_w : albúmina de huevo con propiedades de batido ($a_w = 0,374$) y albúmina de

huevo con propiedades gelificantes ($a_w = 0,338$) y una líquida: caldo nutritivo.

Total: $3 \times 7 \times 3$: 63 experimentos.

II.2.8. Gráficas de supervivencia

El ajuste de las curvas de supervivencia a la regresión lineal fue realizado con el Software Origin Pro 8.5 (OriginLab Software Inc. 2009) con un intervalo de confianza del 95%.

II.2.9. Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) para determinar si las medias de los valores D y z diferían significativamente entre las temperaturas elegidas. Cuando se encontraron diferencias significativas entre las medias se realizó la prueba de Tukey para comparar los efectos del tratamiento (temperatura) por pares. El nivel de significación utilizado para determinar la diferencia entre medias de tratamientos fue de 5%. Se utilizó el programa SYSTAT 12 (SYSTAT Inc., Everston, Illinois).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

II.1. Elección y caracterización de las cepas de *Salmonella*

En este estudio se eligieron tres variantes séricas que presentaron mayor ocurrencia en las muestras de huevo estudiadas y que se reportan con mayor incidencia en enfermedades transmitidas por los alimentos en Argentina: *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* (Caffer, 2011) mientras que *S. Montevideo* se eligió porque se ha detectado en brotes alimentarios en los últimos años (Domínguez *et al.*, 2009; Harada *et al.*, 2011; Stöcker *et al.*, 2011; Lienau *et al.*, 2011) y porque no se conocen datos de su resistencia térmica en alimentos secos.

Estos aislamientos de huevo son coincidentes con los reportados por otros investigadores, entre los que se pueden citar los que han encontrado o recuperado *S. Enteritidis*: Humphrey *et al.*, (1991), Clay y Board, (1991); Schoeni *et al.*, (1994), Keller *et al.*, (1995); Humphrey, (1999); Gast y Holt (2000); Messens *et al.*, (2004); Suresh *et al.*, (2006); Gantois *et al.*, (2008); EFSA (2011), CDC (2010); entre otros.

El desarrollo y aislamiento de *S. Typhimurium* en huevos también ha sido reportado en varias publicaciones: Baker *et al.*, (1980), Hedberg *et al.*, (1993), Schoeni *et al.*, (1994), Guan *et*

al., (2006), Gantois *et al.*, (2008); Dyda *et al.*, (2009), Okamura *et al.*, (2010), Wales y Davies (2012), entre otros.

En general, ambos serotipos son los que comúnmente encuentran distribuidos en los cinco continentes. Mientras que a *S. Enteritidis* se la reporta en el primer lugar con un 63% de aislamientos en seres humanos, siendo el serotipo más frecuente en Europa, América del Sur y Asia, *S. Typhimurium* alcanza un 22,3% en muestras de origen no humano, siendo el serotipo más frecuente en Oceanía, África y América del Norte (De la Torre, 2006).

Por otra parte y en referencia a *Salmonella* Montevideo, en el año 2008, Patel *et al.*, describieron un prolongado brote causado por esta bacteria en una cadena de restaurantes en Arizona, Estados Unidos y posteriormente en el año 2012 el CDC también reporta un brote multiestado en ese país y en Puerto Rico que estuvo relacionado con este serotipo, donde se enfermaron 93 personas de las cuales 21 fueron hospitalizadas e inclusive se reportó una muerte. En referencia a la prevalencia de este serotipo en huevos se pueden citar los estudios de Murchie *et al.* (2007) que analizaron *Salmonella* en huevos grado A en Irlanda y encontraron *S. Montevideo* y *S. Infantis* en cáscara de huevo, los de Hamada *et al.* (2002) que trabajaron

con dos cepas aisladas, Murase *et al.* (2006) quienes estudiaron la infectividad de este serotipo en huevos y Okamura *et al.* (2001) que encontraron una contaminación de un 1.9% en cáscara al estudiar la capacidad de colonizar el tejido vaginal en gallinas.

Terzolo (2011) informa que el grado de invasión de las distintas serovariedades de *Salmonella* en el epitelio vaginal depende del tipo de LPS y puede clasificarse según el siguiente rango de frecuencia de aislamientos: el antígeno O9 (*S. Gallinarum*, *S. Enteritidis*) es mayor que el antígeno O4 (*S. Typhimurium*, *S. Heiderberg*) y este mayor que O7 (*S. Infantis*, *S. Montevideo*) quien a su vez es mayor que O8 (*S. Hadar*).

Se seleccionaron como bacterias de estudio en el presente trabajo de tesis, tres cepas de *Salmonella* Enteritidis, dos de *S. Typhimurium* y dos de *S. Montevideo*.

II.2. Pruebas bioquímicas

Todos los aislamientos respondieron a las pruebas bioquímicas realizadas de manera coincidente con los descriptos para este género bacteriano, a saber: producción de indol (-), crecimiento en citrato (+), producción de H₂S (+), lisina decarboxilasa (+), ornitina decarboxilasa (+), arginina

dehidrolasa (-), movilidad (+), gas de D-glucosa (-), ácido de lactosa (-), Voges-Proskauer (-), hidrólisis de la urea (-), rojo de metilo (+), fermentación del dulcitol (+) y utilización del malonato (-).

II.3. Serotipificación

La serotipificación se realizó según el esquema de Kauffman-White. La caracterización del antígeno somático O (AgO) se realizó sobre una placa de vidrio, mientras que la del antígeno flagelar H (AgH) se realizó en tubo. En las cepas lisas que mostraron aglutinación positiva para OS-A, se continuó la serotipificación con dos factores del AgO: factores 9 y 4-5. Cuando se observó aglutinación con el factor 4-5 se probaron los polivalentes flagelares. Si los resultados positivos se obtuvieron con los antisueros polivalentes HS-1 y HS-A se continuó con la serotipificación con los factores del antígeno flagelar 1-2 e *i* para confirmar *S. Typhimurium*. Las cepas positivas para el factor somático 9, y factor flagelar *g,m* se consideraron como *S. Enteritidis*.

Por otra parte se confirmó *Salmonella* Montevideo cuando el cultivo aglutinó primero con el antígeno somático OS-B, luego con el factor 6-7 y posteriormente con el antígeno flagelar HS-B y el factor *g,m*.

II.4. Pruebas de resistencia a los antibióticos

La respuesta de las cepas seleccionadas en este estudio con respecto a los antimicrobianos que fueron ensayados se presenta en la Tabla 12.

Tabla 12. Respuesta de las cepas de *Salmonella* seleccionadas frente a los antimicrobianos ensayados

	CIP	NIT	CTX	GEN	TET	FOS	AMP	TMS	NAL	CHL
SE cepa 1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SE cepa 2	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
SE cepa 3	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
ST cepa 1	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
ST cepa 2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SM cepa 1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
SM cepa 2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

CIP: ciprofloxacina; NIT: nitrofurantoína; CTX: cefotaxima; GEN: gentamicina; TET: tetraciclina; FOS: fosfomicina; AMP: ampicilina; TMS: trimetoprima/sulfametoxazol; NAL: ácido nalidíxico, CHL: cloranfenicol

La utilización de antimicrobianos para el tratamiento de enfermedades de las aves o como promotores de crecimiento se refleja en las resistencias a gentamicina y tetraciclina, antibióticos ampliamente utilizados en avicultura, el último es muy empleado posiblemente por sus bajo costo. En el estudio de esta tesis todas las cepas fueron sensibles al ácido nalidíxico, antibiótico que no suele ser directamente aplicado como tratamiento a las aves, pero cabe señalar que las salmonelas

pueden presentar resistencias que pueden ser explicadas por la utilización otras drogas emparentadas tales como la enrofloxacin, una quinolona derivada del ácido quinolín-carboxílico que se utiliza en tratamientos preventivos y terapéuticos (Cardozo *et al.*, 2006) o bien por el empleo del ácido oxolínico en los alimentos balanceados (Sandoval, 1989), ambas drogas estrechamente relacionadas al ser inhibidoras de la girasa del ADN.

II.5. Evaluación de la adaptación a ácido en caldo nutritivo con glucosa y respuesta de tolerancia a ácido a pH 3,5 en ácido acético

Se trabajó con cada una de las cepas por separado.

La fermentación de la glucosa por el crecimiento de *Salmonella* en caldo nutritivo adicionado con 10 g/l de glucosa resultó en una disminución del pH. Las cepas de *S. Enteritidis* generaron pH promedio de 3,93, las cepas de *S. Typhimurium* un pH promedio de 3,99 y las de *S. Montevideo* un pH promedio de 4,15. Esta disminución gradual del pH se utilizó para lograr la adaptación de las bacterias a la acidez.

La población inicial de células adaptadas que se inocularon en CN suplementado con ácido acético a pH 3,5 fue de

aproximadamente $7 \log_{10}$ (UFC/ml). Después de la adaptación al ácido los cultivos bacterianos mostraron diferentes grados de supervivencia en CN como se muestra en la Figura 24.

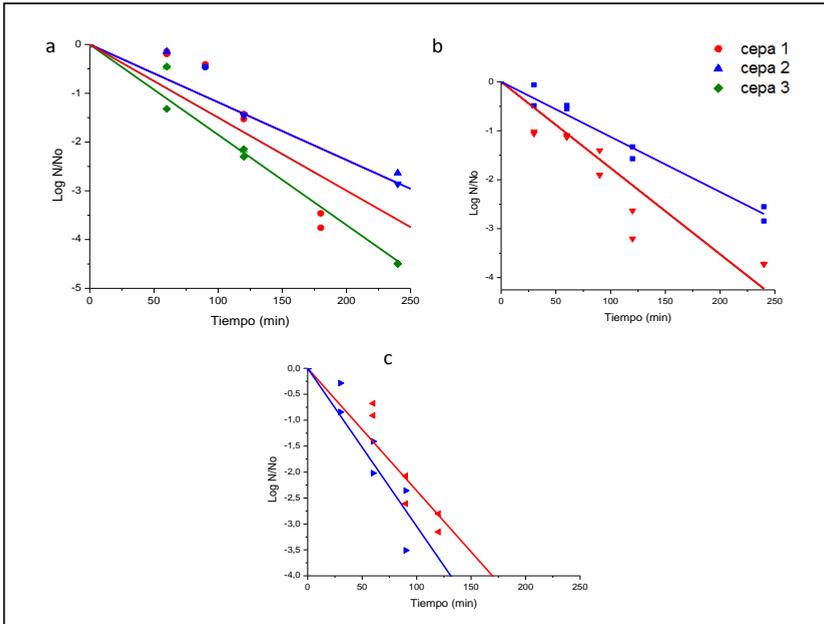


Figura 24. Supervivencia de los inóculos simples de *Salmonella* en caldo nutritivo acidificado a pH 3,5 con ácido acético, a) *S. Enteritidis*, b) *S. Typhimurium*, c) *S. Montevideo*.

Fueron necesarios aproximadamente unos 300 minutos para inactivar a las cepas de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* y unos 150 minutos para inactivar ambas cepas de *S. Montevideo*. Estos resultados son similares a los reportados por Da Silva (2009) quienes informan que fueron necesarios 210 minutos

para inactivar una población de $6 \log_{10}$ UFC/ml de *S. Enteritidis* y 180 minutos para la misma población de *S. Typhimurium*.

Como consecuencia de lo observado en la Figura 24 (a, b y c), donde las gráficas de supervivencia semilogarítmicas siguen una cinética de inactivación de primer orden que supone que la acción del ácido acético a un pH de 3,5 provoca la inactivación irreversible de una fracción constante de la población sobreviviente en cada momento, los valores D (tiempo en minutos para una reducción de 10 veces en el recuento de supervivencia) se consideraron parámetros útiles para propósitos de comparación de la resistencia. En la Tabla 13 se presentan los tiempos de reducción decimal con las desviaciones estándares respectivas de cada uno de los serotipos estudiados, con la adaptación a un pH 3,5 en ácido acético. Los valores de D surgen de la inversa de la regresión lineal de cada una de las rectas presentadas en la Figura 24.

Tabla 13. Tiempos de reducción decimal obtenidos para cada una de las cepas en caldo de cultivo a pH 3,5

S. Enteritidis		S. Typhimurium		S. Montevideo	
Cepa	D (minutos)	Cepa	D (minutos)	Cepa	D (minutos)
1	66,64±3,89 a $r^2=0,83$	1	56,84±2,90 a $r^2=0,95$	1	38,78±1,11d $r^2=0,96$
2	84,53±3,53 b $r^2=0,95$	2	88,98±4,25 b $r^2=0,99$	2	30,54±4,95 d $r^2=0,94$
3	54,03±0,90 a $r^2=0,99$	-	-	-	-

Valores D (media de dos experimentos ± DS) con diferente letra indican diferencia significativa ($p<0,05$).

De estos resultados se infiere que la resistencia al ácido acético de *Salmonella* depende de las cepas y los serotipos. En todos los casos, los valores D fueron más bajos para *S. Montevideo*. La cepa 2 de *S. Typhimurium* fue la que presentó mayor tolerancia a la acidez, con un valor D tres veces mayor que el menor valor obtenido para *S. Montevideo*.

Resultados similares fueron obtenidos por Da Silva *et al.*, (2007) quienes informaron, en las mismas condiciones y para serotipos aislados de brotes alimentarios ocurridos en el sur de Brasil, un valor D de 96,36 minutos para *S. Enteritidis*. Estos autores presentan valores menores que los informados en la

presente tesis doctoral para *S. Typhimurium* ya que reportan un D de 36,57 minutos. Sin embargo Alvarez (2009) reporta un valor D de 56,37 minutos a pH 3 en caldo infusión cerebro corazón.

Es un hecho generalmente aceptado que la resistencia a la acidez de *Salmonella* varía entre serovariedades (Arvizu-Medrano y Escartín, 2005) e, incluso, entre cepas de la misma serovariedad (Bacon *et al.*, 2003; Samelis *et al.*, 2003; Berk *et al.*, 2005; Yuk y Schneider, 2006).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo pueden deberse a que tanto *S. Enteritidis* como *S. Typhimurium* son bacterias con mayor prevalencia en las gallinas donde estas características adaptativas se seleccionan en la alimentación de las aves cuando se agregan ácidos grasos de cadena corta con la finalidad de inhibir bacterias Gram-negativas y mohos. La adaptación lograda permite que estos serotipos estén presentes en el tracto intestinal, en materia fecal y en el ambiente de las gallinas ponedoras (Ricke, 2003, Koyuncu *et al.*, 2013).

II.6. Estudios de resistencia térmica

II.6.1. Resistencia térmica en caldo nutritivo

Estos estudios se realizaron a cada una de las cepas de los tres serotipos en fase estacionaria de crecimiento y a las temperaturas de 72, 77 y 82°C. Se comenzó con inóculos entre 7,7 y 8,7 log₁₀ UFC/g.

Las gráficas de muerte obtenidas para cada una de las cepas estudiadas de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Montevideo* se muestran en las Figuras 25, 26 y 27.

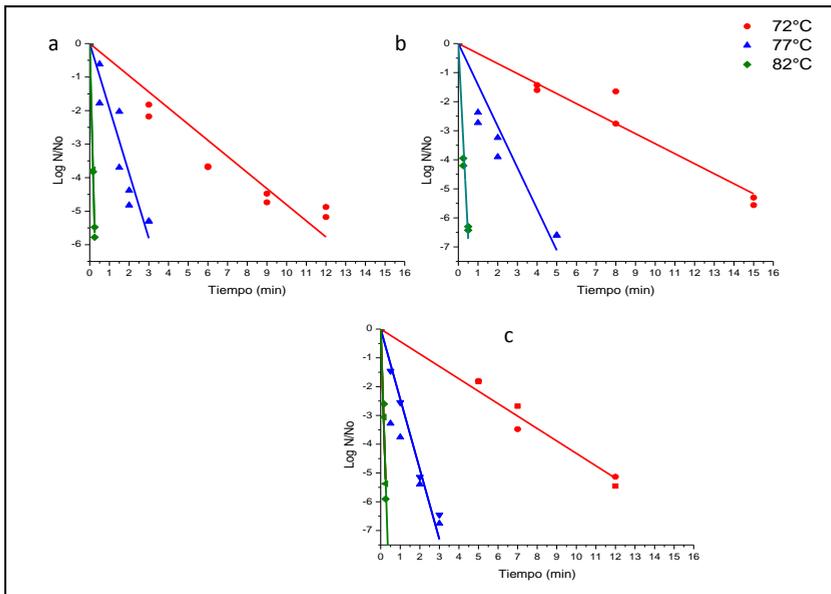


Figura 25. Supervivencia de *S. Enteritidis* en caldo nutritivo de a) cepa 1, b) cepa 2, c) cepa 3, a 72, 77 y 82°C.

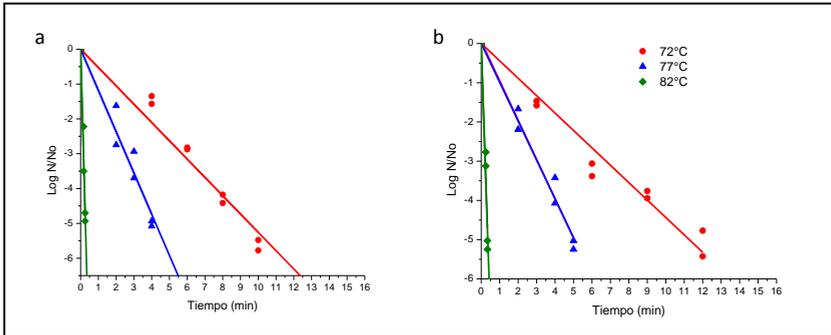


Figura 26. Supervivencia de *S. Typhimurium* en caldo nutritivo de a) cepa 1, b) cepa 2, a 72, 77 y 82°C.

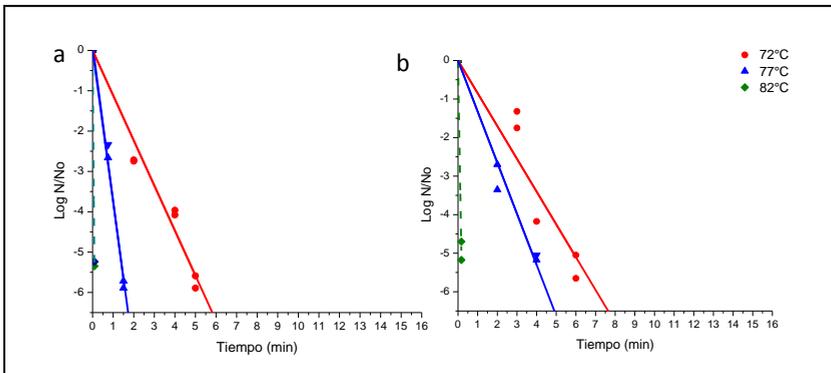


Figura 27. Supervivencia de *S. Montevideo* en caldo nutritivo de a) cepa 1, b) cepa 2, a 72, 77 y 82°C.

Línea de puntos para 82°C indican gráfica estimada.

Las gráficas de muerte obtenidas para cada una de las cepas, siguen una cinética de inactivación de primer orden, lo que supone que la acción del calor que se transmite en el medio líquido provoca la muerte de una fracción constante de la población sobreviviente. Debido al corto tiempo de vida de *S. Montevideo* a 82°C solo se pudo obtener un solo recuento de

células supervivientes por lo que la gráfica se ha considerado como “estimada”.

A 72°C se necesitaron entre 15 y 20 minutos para inactivar a las tres cepas de *S. Enteritidis* y las dos cepas de *S. Typhimurium* mientras que entre 7 y 10 minutos se inactivaron las cepas de *S. Montevideo*. A 82°C entre 45 y 60 segundos se inactivaron las cepas de *S. Enteritidis*, 30 segundos para las cepas de *S. Typhimurium* y 5-10 segundos para inactivar las de *S. Montevideo*.

Da Silva (2009) informó que fueron necesarios 20 minutos para inactivar una población de 6-7 log₁₀ UFC/ml a 60°C en caldo nutritivo, tanto para *S. Enteritidis* como para *S. Typhimurium*; estos resultados son similares a los obtenidos en este estudio de tesis.

En la Tabla 14 se muestran los tiempos de reducción decimal obtenidos, expresados como el valor medio de dos experimentos independientes y las desviaciones estándares respectivas.

Tabla 14. Tiempos de reducción decimal obtenidos para cada una de las cepas en caldo nutritivo a las temperaturas de 72,77 y 82°C

Temp. (°C)	Cepa	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Montevideo</i>
		<i>D (minutos)</i>	<i>D (minutos)</i>	<i>D (minutos)</i>
72	1	2,08±0,05a $r^2=0,97$	1,90±0,07a $r^2=0,98$	0,89±0,01c $r^2=0,99$
	2	2,90±0,23b $r^2=0,97$	2,25±0,05a $r^2=0,98$	1,19±0,01c $r^2=0,95$
	3	2,31±0,03a $r^2=0,99$	-	-
77	1	0,52±0,01a $r^2=0,96$	0,840±0,009a $r^2=0,98$	0,265±0,009a $r^2=0,95$
	2	0,70±0,02a $r^2=0,98$	1,01±1,02a $r^2=0,99$	0,75±0,03a $r^2=0,98$
	3	0,41±0,03a $r^2=0,95$	-	-
82	1	0,040±0,001a $r^2=0,99$	0,053±0,006a $r^2=0,98$	-5,293log ₁₀ /5seg b
	2	0,074±0,007a $r^2=0,98$	0,07±0,07a $r^2=0,98$	-4,937log ₁₀ /10seg b
	3	0,048±0,001a $r^2=0,95$	-	-

Valores D (media de dos experimentos ± DS) con diferente letra para cada temperatura indican diferencia significativa (p<0,05).

La resistencia a temperatura en caldo nutritivo depende de los serotipos y de la temperatura. En todos los casos las células de esta bacteria se mostraron sensibles a la temperatura con valores D menores a 3 minutos. Los D más bajos lo presentaron las células de *S. Montevideo* mientras que *S. Enteritidis* y *S.*

S. Typhimurium, con valores más altos, no presentaron diferencia significativa ($p < 0,05$).

Varios autores han reportado resultados que pueden considerarse análogos a los obtenidos en la presente tesis. Para *S. Enteritidis*, Doyle y Mazzotta (2000) han informado un D de 3,51 minutos en caldo nutritivo a 57°C y Shah *et al.* (1991) de 3,2 minutos a 62,6°C en el mismo medio de cultivo. También estos autores, utilizando los datos de las publicaciones de otros investigadores, calcularon que en un proceso de calentamiento a 71°C se requiere 1,2 segundos para desactivar un ciclo logarítmico de células/ml de *Salmonella* (valor z igual a 5,3°C).

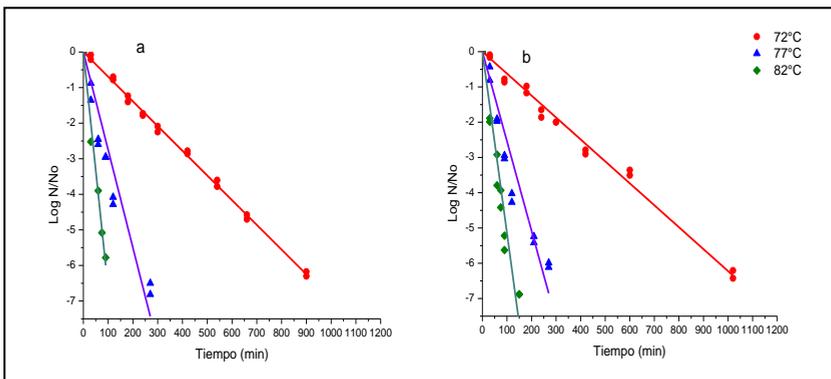
Para *S. Typhimurium* se han informado valores D a 62°C en caldo tripteína de soja de 0,3 minutos y en caldo infusión cerebro-corazón de 0,4 minutos mientras que a 65°C en buffer fosfato se ha informado un valor D de 0,056 minutos. Para *S. Montevideo* se ha publicado un valor D de 1,2 minutos a 57,2°C en caldo nutritivo (Goepfert y Biggie, 1968).

II.6.2. Resistencia térmica en albúmina de huevo deshidratada de diferentes aw

Los estudios de termorresistencia de *Salmonella* se realizaron en las dos muestras de albúmina deshidratada con propiedades de batido y con propiedades gelificantes y diferentes valores de actividad de agua (a_w : 0,338 y 0,374).

II.6.2.1. En albúmina de huevo deshidratada con propiedades de batido ($a_w = 0,374$)

Las gráficas de supervivencia de cada una de las cepas estudiadas siguen una cinética de inactivación de primer orden y se muestran en las Figuras 28, 29 y 30 para *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Montevideo*, respectivamente.



Continuación

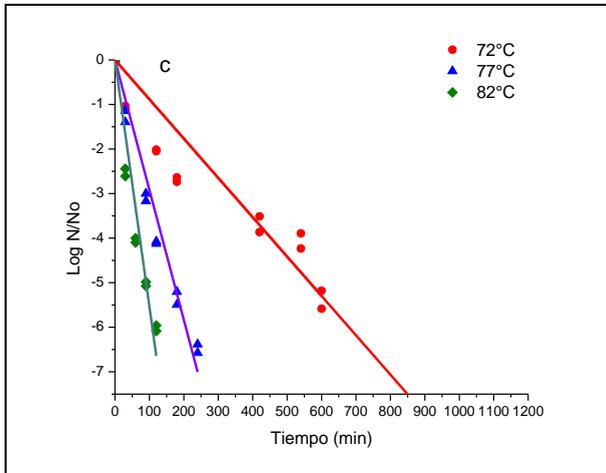


Figura 28. Supervivencia de *S. Enteritidis* en albúmina de huevo deshidratada ($a_w=0,374$) a) cepa 1, b) cepa 2, c) cepa 3, a 72,77 y 82°C.

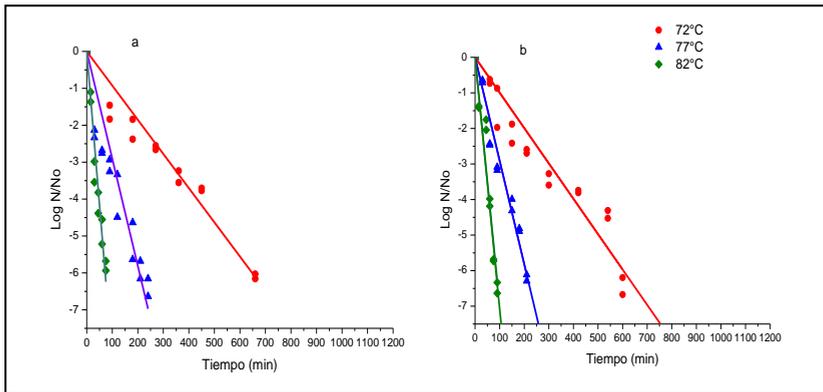


Figura 29. Supervivencia de *S. Typhimurium* en albúmina de huevo deshidratada ($a_w= 0,374$) de a) cepa 1, b) cepa 2, a 72,77 y 82°C.

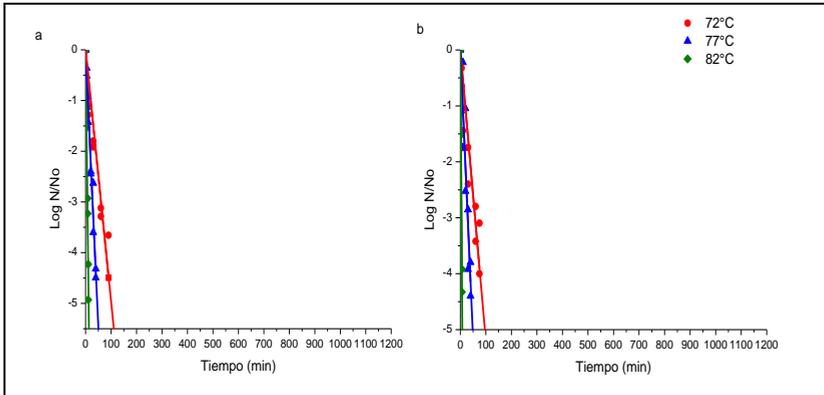


Figura 30. Supervivencia de *S. Montevideo* en albúmina de huevo deshidratada ($a_w=0,374$), a) cepa 1, b) cepa 2, a 72,77 y 82°C.

En la albúmina de huevo deshidratada con propiedades de batido ($a_w=0,374$) contaminada, los inóculos fueron de aproximadamente $8 \log_{10}$ UFC/g. Cuando se utilizó como temperatura de estudio 72°C, se necesitaron entre 15 y 24 horas para inactivar a *S. Enteritidis*, entre 12 y 16 horas para *S. Typhimurium* y entre 90 minutos y 3 horas para inactivar a *S. Montevideo*.

Por otra parte, cuando la temperatura de estudio fue de 82°C, se necesitaron entre 2,5 a 3 horas para inactivar a *S. Enteritidis*, 3 horas para inactivar a *S. Typhimurium* y entre 15 a 30 minutos para inactivar a *S. Montevideo*.

En la Tabla 15 se presentan los tiempos de reducción decimal y las desviaciones estándares respectivas de cada uno de los serotipos estudiados. Los valores de D surgen de la inversa de la regresión lineal de cada una de las rectas presentadas en la Fig. 28, 29 y 30.

Tabla 15. Tiempos de reducción decimal obtenidos para cada una de las cepas en albúmina de huevo deshidratada ($a_w=0,374$) en los estudios de muerte térmica a 72, 77 y 82°C.

Temp. (°C)	Cepa	<i>S. Enteritidis</i> <i>D (minutos)</i>	<i>S. Typhimurium</i> <i>D (minutos)</i>	<i>S. Montevideo</i> <i>D (minutos)</i>
72	1	122,50±31,40a $r^2=0,99$	108,00±1,48a $r^2=0,98$	20,25±1,99b $r^2=0,95$
	2	160,77±0,01a $r^2=0,99$	100,55±0,78a $r^2=0,97$	17,19±0,07b $r^2=0,92$
	3	113,39±5,82a $r^2=0,99$	-	-
77	1	36,39±0,70a $r^2=0,96$	34,54±2,93a $r^2=0,96$	9,10±0,56b $r^2=0,98$
	2	39,41±0,70a $r^2=0,97$	34,36±0,28a $r^2=0,98$	9,90±2,26b $r^2=0,94$
	3	34,11±0,72a $r^2=0,98$	-	-
82	1	15,01±0,07a $r^2=0,99$	12,03±0,59c $r^2=0,98$	2,39±0,17d $r^2=0,98$
	2	19,47±0,84b $r^2=0,99$	14,36±0,36a $r^2=0,98$	1,57±0,14e $r^2=0,96$
	3	18,06±0,15b $r^2=0,97$	-	-

Valores D (media de dos experimentos ± DS) con diferente letra para cada temperatura indican diferencia significativa ($p<0,05$).

II.6.2.2. En albúmina de huevo deshidratada con propiedades gelificantes ($a_w=0,338$)

Las gráficas de supervivencia de cada una de las cepas estudiadas en albúmina de huevo deshidratada con propiedades gelificantes ($a_w=0,338$) también siguen una cinética de inactivación de primer orden y se muestran en las Figuras 31, 32 y 33 para *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Montevideo* respectivamente.

Se comenzó con una concentración de inóculos de aproximadamente $7 \log_{10}$ UFC/g.

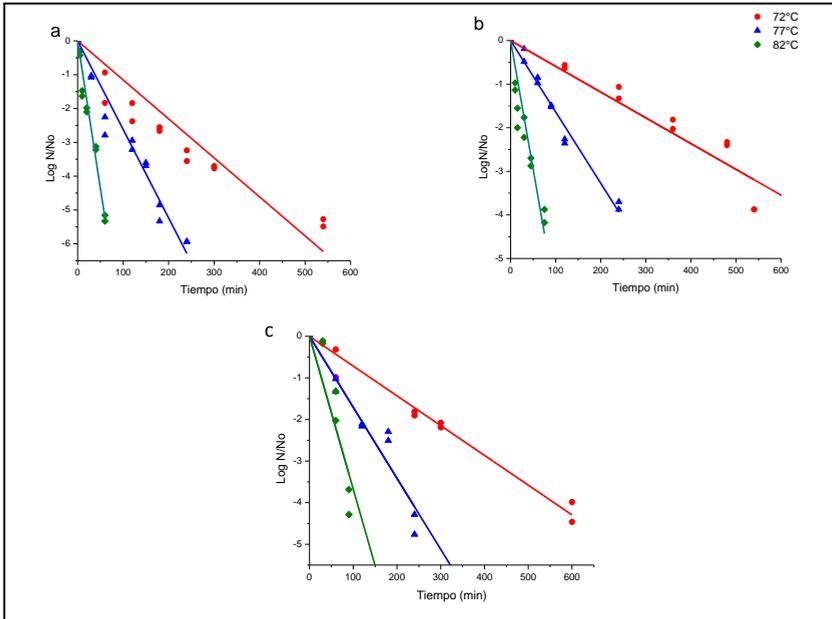


Figura 31. Supervivencia de *S. Enteritidis* en albúmina de huevo deshidratada ($a_w=0,338$): a) cepa 1, b) cepa 2, c) cepa 3, a 72,77 y 82°C.

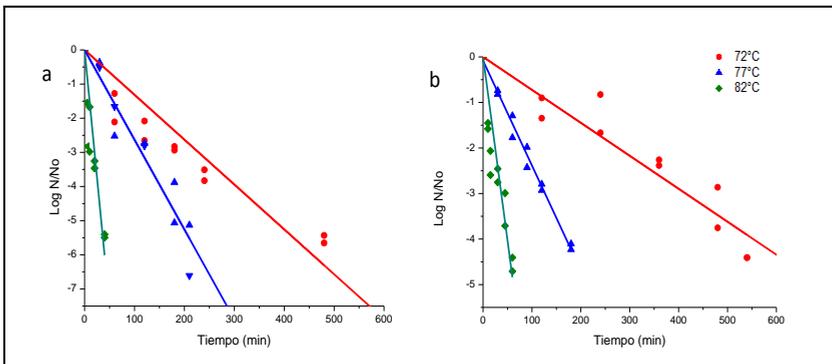


Figura 32. Supervivencia de *S. Typhimurium* en albúmina de huevo deshidratada ($a_w=0,338$) de a) cepa 1, b) cepa 2, a 72,77 y 82°C.

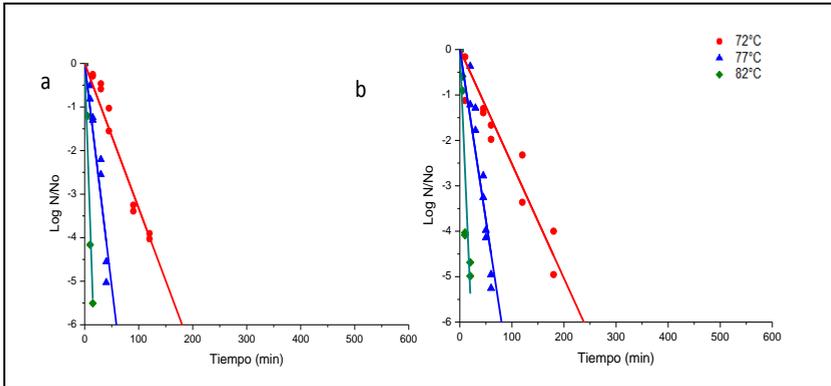


Figura 33. Supervivencia de *S. Montevideo* en albúmina de huevo deshidratada ($aw=0,338$), de a) cepa 1, b) cepa 2, a 72,77 y 82°C.

Se necesitaron entre 12-18 horas para inactivar a *S. Enteritidis*, 11 a 12 horas para *S. Typhimurium* y entre 3 y 6 horas para inactivar a *S. Montevideo* cuando se utilizó como temperatura de estudio 72°C y entre 2 a 3 horas para inactivar a *S. Enteritidis*, 2,5 a 3 horas para inactivar a *S. Typhimurium* y entre 25 a 45 minutos para inactivar a *S. Montevideo* cuando la temperatura de estudio fue de 82°C.

La Tabla 16 muestra los valores D obtenidos para cada cepa.

Tabla 16. Tiempos de reducción decimal D (minutos), para cada una de las cepas de *Salmonella* en albúmina de huevo deshidratada (aw= 0,338) en los estudios de muerte térmica a 72, 77 y 82°C.

Temp. (°C)	Cepa	S. Enteritidis	S. Typhimurium	S. Montevideo
		D (minutos)	D (minutos)	D (minutos)
72	1	86,75±3,35a r ² = 0,95	76,22±3,89a r ² = 0,97	30,11±1,38d r ² = 0,98
	2	169,13±5,05b r ² = 0,96	138,62± 11,91c r ² = 0,97	39,73±1,67d r ² = 0,96
	3	139,95±7,32c r ² = 0,99		
77	1	36,91±3,12a r ² = 0,93	38,39±5,24a r ² = 0,97	9,81±0,76c r ² = 0,95
	2	61,05±1,71b r ² = 0,99	42,22±1,55a r ² = 0,97	13,33±0,36c r ² = 0,96
	3	58,55± 1,16b r ² = 0,97		
82	1	11,32±0,04a r ² = 0,98	6,66±0,29c r ² = 0,97	2,77±0,13c r ² = 0,97
	2	16,66±0,69a r ² = 0,96	12,44±1,05a r ² = 0,97	3,72±0,13d r ² = 0,93
	3	26,21±5,74b r ² = 0,89		

Valores D (media de dos experimentos ± DS) con diferente letra, para cada serotipo diferencia significativa (p<0,05)

La resistencia a temperatura en albúmina de huevo deshidratada depende de los serotipos y de la temperatura. *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* se mostraron resistentes, con valores D a 72°C que pueden expresarse en horas. Los tres

serotipos presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los tiempos de reducción decimal de las cepas estudiadas a 82°C.

Varios investigadores han informado sobre la naturaleza resistente de *Salmonella* en productos de baja actividad de agua: Goepfert y Biggie (1968) informaron un valor D a 66°C de 816 minutos para *S. Typhimurium* en chocolate fundido; Barrile y Cone (1970) informan un valor D a 71°C en chocolate de 20 horas; Dega *et al.*, (1972) reportan que el incremento en la concentración de sólidos de leche en caldo tripteína de soja aumentó el valor D y el valor z en *S. Typhimurium* y *S. Alachua*; Corry (1975) citado por Laroche *et al.*, (2004) señaló que la resistencia térmica de las formas vegetativas bacterianas, en particular *Salmonella Typhimurium*, es máxima para actividad de agua en el rango 0-0,2 a temperaturas de 125-160°C, por encima del cual la resistencia térmica disminuye con el aumento de la actividad de agua; Shachar y Yaron (2006) en mantequilla de maní, encontraron que *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* no mostraron diferencia significativa en su resistencia al calor y determinaron que a 90°C es necesario una hora para reducir 7 log₁₀ UFC/g la población de células.

Por otra parte hay autores que reportan mayor resistencia térmica en *Salmonella* pero expuestas a menores temperaturas:

Doyle y Mazzotta (2000) informan que en huevo deshidratado los valores D a 50°C para *Salmonella spp.* se expresan en días y Prost y Reimann (1967) reportan que sometieron albúmina de huevo en polvo a temperaturas de 49-50°C y comprobaron que era necesario una semana para eliminar esta bacteria.

Para evaluar el comportamiento de los serotipos y realizar una mejor comparación de los parámetros de resistencia térmica, en ambas matrices sólidas con los obtenidos cuando estas bacterias se inocularon en caldo nutritivo, se volvieron a considerar los valores D a 72, 77 y 82°C y los valores z para cada cepa en las tres matrices de calentamiento, datos que se muestran en la Tabla 17.

Los valores D a 82°C y z son los que se utilizaron a los fines de comparar los comportamientos de los diferentes serotipos y en las distintas matrices de calentamiento.

Tabla 17. Tiempos de reducción decimal D (minutos) y diferencial de temperatura z (°C), para cada una de las cepas de *Salmonella* en caldo nutritivo, albúmina de huevo deshidratada (aw=0,374) y albúmina de huevo deshidratada (aw=0,338).

Medio de Calentamiento	Cepa	S. Enteritidis		S. Typhimurium			S. Montevideo				
		Valor D (minutos)	Valor z (°C)	Valor D (minutos)			Valor z (°C)	Valor D (minutos)			Valor z (°C)
		82°C		72°C	77°C	82°C		72°C	77°C	82°C	
Caldo nutritivo	1	0,040±0,001 ^a ₁	5,961±0,007 ^a ₁	1,90±0,07	0,844±0,009	0,053±0,006 ^a ₁	6,44±0,14 ^a ₁	0,89±0,01	0,265±0,009	-5,29 log ₁₀ /5 seg ^c ₁	ND
	2	0,074±0,007 ^b ₁	6,28±0,14 ^a ₁	2,25±0,05	1,02±0,02	0,070±0,001 ^b ₁	6,64±0,03 ^a ₁	1,19±0,01	0,75±0,03	-4,93 log ₁₀ /10 seg ^c ₁	ND
	3	0,048±0,001 ^a ₁	5,93±0,12 ^a ₁	-	-	-	-	-	-	-	-
Albúmina Deshidratada (aw=0,374)	1	15,01±0,07 ^d ₂	11,41±1,36 ^{bc} ₂	108,00±1,48	34,54±2,93	12,03±0,59 ^d ₂	10,49±0,30 ^b ₂	20,25±1,99	9,10±0,56	2,39±0,17 ^e ₂	10,78±0,87 ^b ₂
	2	19,47±0,84 ^{de} ₂	10,91±0,22 ^{bc} ₂	100,55±0,78	34,36±0,28	14,36±0,36 ^d ₂	11,83±0,01 ^c ₂	17,19±0,07	9,90±2,27	1,57±0,14 ^e ₂	9,62±0,34 ^b ₂
	3	18,06±0,15 ^{de} ₂	12,54±0,20 ^{bd} ₂	-	-	-	-	-	-	-	-
Albúmina Deshidratada (aw=0,338)	1	11,32±0,04 ^d ₂	11,31±0,24 ^{bcd} ₂	76,22±3,89	38,39±5,25	6,66±0,29 ^d ₂	9,45±0,02 ^b ₃	30,11±1,38	9,81±0,76	2,77±0,13 ^e ₃	9,65±0,02 ^b ₂
	2	16,66±0,69 ^d ₂	9,94±0,30 ^d ₂	138,62±11,9	42,22±1,55	12,44±1,05 ^d ₂	9,57±0,670 ^b ₃	39,73±1,67	13,33±0,36	3,72±0,13 ^{ef} ₃	9,73±0,32 ^b ₂
	3	26,21±5,75 ^e ₂	13,72±1,37 ^d ₂	-	-	-	-	-	-	-	-

Valores D a 82°C y z (media de dos experimentos ± DS) con igual letra indican que no existe diferencia significativa (p<0,05) en los valores calculados para cada serotipo, con igual número indican que no existe diferencia significativa (p<0,05) en los valores calculados para cada matriz de calentamiento.

En caldo nutritivo los tres serotipos presentaron diferencia significativa ($p < 0,05$) en los valores D a 82°C. Claramente los tiempos de reducción decimal de *S. Montevideo* se presentaron menores a los otros dos serotipos.

Los valores z obtenidos en esta matriz de calentamiento fueron independientes de los serotipos y resultaron similares a los obtenidos por otros investigadores dado que las diferencias no son importantes y pueden deberse a cuestiones de operatividad y metodología de estudio: Doyle y Mazzotta (2000) reportan que Wolfson *et al.*, (1994) informaron valores z para *S. Typhimurium* en caldo Infusión cerebro-corazón de 4,3°C y en caldo tripteína de soja de 7,3°C y Mañas *et al.*, (2003) refieren, para esta bacteria, un valor de 5°C y para *S. Enteritidis* un valor de 4,7°C.

Cuando se evaluó la termorresistencia en ambas matrices de albúmina de huevo deshidratada el análisis de varianza permitió determinar que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores D a 82°C en los serotipos estudiados y en los diferentes tratamientos térmicos, resultando *S. Enteritidis* > *S. Typhimurium* > *S. Montevideo*. Con respecto a los dos primeros serotipos estos resultados coinciden con los de varios autores, que en diversos experimentos con huevos reportan que *S.*

Enteritidis ha resultado más resistente que *S. Typhimurium* (Humphrey *et al.*, 1991; Shah *et al.*, 1991; Palumbo *et al.*, 1995).

En estas matrices sólidas se observó un incremento en los valores D, de manera independiente a las temperaturas de calentamiento. En promedio aproximado, *S. Enteritidis* aumentó la termorresistencia 60 veces más en albúmina de huevo deshidratada que en caldo nutritivo a 72°C y 300 veces a 82°C, *S. Typhimurium* 50 veces más a 72°C y 216 a 82°C y *S. Montevideo* 25 veces más a 72°C. Estos resultados son diferentes a los reportados en 1996 por Garibaldi quien informó que *Salmonella* spp. resultó 600 a 700 veces más termorresistente en albúmina de huevo en polvo que en estado líquido, probablemente porque la albúmina en este estado físico conservaba inalterables los componentes antimicrobianos que ejercían un efecto sinérgico.

Este autor señaló que la resistencia al calor observada en un sistema acuoso no es aplicable a un producto de baja humedad, situación que también se comprobó en este trabajo de tesis probablemente debido a que a medida que la célula adquiere temperatura las moléculas de agua comienzan a vibrar y estos movimientos producen la ruptura de enlaces disulfuro y puentes

de hidrógeno en las proteínas celulares modificando las configuraciones tridimensionales y por lo tanto la funcionalidad. Cuando hay menos agua, como en la albúmina de huevo deshidratada con propiedades de batido ($a_w = 0,374$) o en la albúmina de huevo con propiedades gelificantes ($a_w = 0,338$), se reducen estas vibraciones disminuyendo la desnaturalización proteica por este mecanismo (Kim *et al.*, 2012).

Por otra parte, también se ha reportado que la actividad de agua reducida puede inducir una serie de mecanismos de "respuesta al estrés" como son los mecanismos de osmoregulación, factores sigma alternativos, estado viable no cultivable, degradación del ARN ribosomal, formación de formas filamentosas y de biopelículas que, en consecuencia mejoran la resistencia al calor y prolongan su supervivencia en el producto. Sin embargo, la fisiología de *Salmonella* bajo estrés por desecación y los mecanismos moleculares específicos de su supervivencia y resistencia térmica en alimentos bajos en actividad de agua no se han explorado completamente (He *et al.*, 2013).

El análisis de varianza también permitió inferir que no existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores D a 82°C y entre los valores z de las matrices sólidas, posiblemente

porque la diferencia en la actividad de agua no es suficiente para inducir diferencias en los mecanismos de respuesta térmica. Otros investigadores han encontrado que a altas temperaturas las diferencias en la resistencia térmica son menos notables (He *et al.*, 2013) y los que encontraron valores D y z diferentes hicieron sus estudios modificando la actividad de agua en el primer decimal (Podolak *et al.*, 2010).

Los valores z se vieron significativamente afectados cuando las condiciones de tratamiento se evaluaron en caldo nutritivo y en albúmina de huevo deshidratada. El incremento de la termorresistencia expresado en valores z en albúmina deshidratada con respecto a los obtenidos en caldo nutritivo fue *circa* 1,85 veces mayor para *S. Enteritidis* y de *circa* 1,58 veces mayor para *S. Typhimurium*.

En muchos casos de alimentos con baja actividad de agua se han informado parámetros de proceso en valores D y z similares a los obtenidos en este estudio, entre ellos Archer *et al.*, (1998) reportan para *S. Weltevreden* en harina de trigo con actividad de agua de 0,36-0,40 un valor z de 15,2°C a temperaturas de 72-77°C y un valor z de 29,2°C para aw 0,31-0,35 a temperaturas entre 69-77°C. Dega *et al.*, (1972) reportaron para *S. Alachua* en leche en polvo que tenía modificaciones en el contenido de

sólidos valores z de: 4,1; 6,2 y 6,9°C con 10, 42 y 51% de sólidos lácteos, respectivamente. Otros autores han informado valores mayores: Podolak *et al.*, (2010) cita que Akinleye en 1994 informó para *S. Typhimurium* en solución salina con a_w de 0,42 a temperaturas entre 90 y 120°C un valor z de 30,3°C y con a_w 0,31 a las mismas temperaturas un valor z de 40°C y también estos investigadores señalan que determinaron, sobre la base de la porción lineal de la curva de inactivación de *Salmonella* en aceite de almendras tostadas, un valor D de 0,85 minutos a 121°C y el valor z de 27°C.

La resistencia térmica de *Salmonella* que reporta la bibliografía permite inferir que se ve afectada por muchos factores, incluyendo la cepa y los serotipos, la composición de los alimentos (la matriz donde se realiza el estudio), la actividad acuosa, las condiciones de almacenamiento, los medios de cultivo de prueba y los medios de cultivo utilizados para recuperar a las células dañadas de calor.

En base a estos resultados se consideró que las células más termorresistentes fueron la cepa 2 de *S. Enteritidis*, la cepa 2 de *S. Typhimurium* y la cepa 2 de *S. Montevideo*. Estas cepas presentaron mayor tolerancia a ácido acético pH 3,5 pero se mostraron independientes del perfil de resistencia a antibióticos,

tal como era lo esperado, ya que es un fenómeno independiente que es bien conocido.

Estos resultados son de utilidad para los estudios térmicos aplicados a los cócteles de cepas de un mismo serotipo y a inóculos mixtos de distintos serotipos, datos que se presentan en el próximo capítulo.

**CAPITULO III: RESISTENCIA TÉRMICA DE
UN COCTEL DE CEPAS E INÓCULO MIXTO
DE SALMONELLA EN ALBÚMINA DE HUEVO
DESHIDRATADA CON PROPIEDADES
GELIFICANTES. EFECTO DEL CHOQUE
TÉRMICO.**

La evaluación de la resistencia microbiana al calor, generalmente, se realiza utilizando microorganismos individuales obtenidos en óptimas condiciones de crecimiento o con cócteles o mezclas de bacterias. En los últimos años varios investigadores han trabajado con mezclas de cepas o de serotipos de *Salmonella* tanto en alimentos húmedos Murphy *et al.*, (2004), Osaili *et al.*, (2006), Juneja *et al.*, (2007), Bucher *et al.*, (2008) como en alimentos de baja humedad y actividad de agua: Burnett *et al.*, (2000), Shachar y Yaron (2006), Ma *et al.*, (2009), Park *et al.*, (2008), He *et al.*, (2011), entre otros.

En este estudio y con la finalidad de evaluar la resistencia de *Salmonella* en albúmina de huevo deshidratada expuestas a condiciones más drásticas resultó interesante evaluar el tratamiento térmico aplicado a un cóctel o mezcla de distintas cepas pertenecientes a un mismo serotipo y, por otro lado, un inóculo mixto constituido por una selección de las cepas más termorresistentes de cada uno de los tres serotipos estudiados en esta tesis. Como también repetir estos mismos estudios después de someter a las células bacterianas a un choque térmico a 50°C durante 30 minutos ya que algunos autores han reportado que un estrés térmico previo al calentamiento, en productos de huevo líquido, puede aumentar la resistencia térmica de los

microorganismos (Mackey y Derrick, 1986; Bunning *et al.*, 1990; Nemeth *et al* 2011).

Se consideró importante conocer si el tratamiento térmico aplicado a la albúmina de huevo produciría los mismos efectos que a un cultivo simple. Aunque los datos sobre el desarrollo de la tolerancia cruzada en cepas de *Salmonella* deshidratadas sobre diferentes matrices son todavía escasos (Gruzdev *et al.*, 2011) algunos autores sugieren que pueden ocurrir variaciones en la respuesta de inactivación debido a posibles efectos de protección, formación de biopelículas o interacciones célula-célula (Miller y Bassler, (2001); Waters y Bassler, (2005); Skandamis y Nychas, (2012), Avilés *et al.*, 2013). Estas variaciones podrían manifestarse sobre las distintas cepas o serotipos que colonizan en los alimentos secos.

Gruzdev *et al.*, (2011) demostraron que se incrementó la resistencia al calor y se indujo tolerancia a múltiples factores estresantes que estos patógenos pueden encontrar durante la preparación y elaboración de alimentos.

Estos autores sugieren que existe una correlación entre el bajo contenido de agua del producto y el aumento de la resistencia térmica del patógeno y pudieron demostrar que la reducción de actividad de agua, ya sea por desecación o por la

adición de solutos, da como resultado aumento de la tolerancia térmica. También reportan que la tolerancia al calor no es más que una propiedad física asociada con la falta de agua sino que es un fenómeno más complejo que debe ser estudiado.

Mackey y Derrick (1986) reportaron que cuando las bacterias son sometidas a condiciones de estrés, pueden aumentar su capacidad de supervivencia, aún en condiciones que normalmente serían letales. Estos autores demostraron que la tolerancia inducida en *S. Typhimurium*, después de un choque de calor a 48°C, generó un aumento en la termotolerancia adicional de la cepa. Estos son los fundamentos que se tuvieron en cuenta para estudiar el efecto del choque térmico a 50°C, situación que puede ocurrir cuando la albúmina de huevo se somete al proceso de secado por atomización. Existen estudios previos que citan la recuperación de células de *Salmonella* en leche en polvo (Avilés *et al.*, 2013).

Comparativamente se conoce poco acerca de la genética y las respuestas fisiológicas a la desecación en *Salmonella*, pero está claro que hay una superposición significativa con otras respuestas de estrés que pueden ser inducidas simultáneamente durante el proceso de desecación, incluyendo las que reaccionan

contra el estrés térmico y el estrés oxidativo (Spector y Kenyon, 2012).

Por último se consideró importante evaluar la persistencia de esta bacteria en albúmina de huevo deshidratada con propiedades gelificantes, con menor contenido de actividad de agua ($a_w = 0,338$) ya que en varios trabajos se ha demostrado la capacidad de *Salmonella* para sobrevivir por períodos prolongados en alimentos de baja actividad de agua, como cáscaras de huevo (Messens *et al.*, 2006), granos de almendras (Uesugi *et al.*, 2006) materias primas de confitería (Komitopoulou e Izurieta, 2009), así como en superficies secas (Hiramatsu *et al.*, 2005) y hasta en el suelo seco (Bernstein *et al.*, 2007).

Los estudios de la presente tesis pueden ser transferidos a las industrias procesadoras de huevos para que los apliquen en forma práctica y desarrollen procedimientos de tratamiento adaptados a las reales necesidades de cada establecimiento industrial, cumpliendo al mismo tiempo con los estándares de letalidad exigidos para el comercio internacional. Los estudios de esta tesis corroboran el conocido hecho de que los cálculos estadísticos que usualmente se aplican sobre los resultados obtenidos en el muestreo del producto terminado no suelen ser

suficientes para demostrar que el producto cumple con las reducciones establecidas para los microorganismos patógenos y/o sus toxinas. Se considera que el análisis que se aplique debe estar basado en fundamentos científicos obtenidos a partir de datos experimentales realizados en las condiciones de elaboración de cada planta de procesamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Materiales

III.1.1. Inóculos

Para los estudios térmicos de mezclas se utilizaron las 7 cepas seleccionadas de los siguientes serotipos de *Salmonella enterica*: *S. Enteritidis* (3 cepas), *S. Typhimurium* (dos cepas) y *S. Montevideo* (2 cepas), de la siguiente manera:

Cóctel de cepas: Se formaron tres inóculos: uno con las tres cepas de *S. Enteritidis*, otro con las dos cepas de *S. Typhimurium* y el tercero con las dos cepas de *S. Montevideo*.

Inóculo mixto: Se formó un inóculo mixto compuesto por las tres cepas más termorresistentes de cada serotipo: cepa 2 de *S. Enteritidis*, cepa 2 de *S. Typhimurium* y cepa 2 de *S. Montevideo*.

III.1.2. Matriz de calentamiento

Se utilizó como matriz de calentamiento albúmina de huevo deshidratada con propiedades gelificantes. Como se mencionó en el capítulo anterior la termorresistencia de las cepas de *Salmonella* no mostró diferencias significativas entre las albúminas de huevo deshidratadas, por lo que se decidió trabajar con la matriz de menor actividad de agua ($a_w = 0,338$).

III.2. Metodología

III.2.1. Estudios de inactivación térmica de un cóctel de cepas de un mismo serotipo en albúmina a $a_w = 0,338$

Estos estudios se realizaron por duplicado. Se prepararon tres cócteles que se conformaron con las cepas de cada serotipo.

Preparación de los inóculos: Se tomaron iguales alícuotas de cada inóculo simple en fase estacionaria de crecimiento y se transfirieron a un tubo hasta volumen final de 9,9 ml, se centrifugaron, se eliminaron los sobrenadantes y se resuspendieron en CN pH 7,4 hasta obtener un valor de densidad óptica entre 0,5-0,6 a 600 nm utilizando un espectrofotómetro Biochrom Libra S22 UV-Vis, de simple haz (Inglaterra).

La albúmina de huevo con propiedades gelificantes se inoculó mediante dispersión por atomización con aproximadamente 1ml de inóculo/g de albúmina de huevo deshidratada. Cada muestra contaminada se secó en estufa marca San Jor modelo SL60CDB (Argentina) a 30°C por 30 minutos, luego se colocó en bolsa de polietileno estéril y se homogeneizó manualmente. Se determinó la densidad del inóculo en la albúmina de huevo luego de una previa realización de diluciones decimales a partir de 1 g de muestra e inoculando

100 µl sobre la superficie de placas conteniendo ATS adicionado de 0,6% de EL. Se incubaron las placas a 37°C por 24 hs y se realizaron los recuentos.

Simultáneamente se cargaron 25 µg, de albúmina inoculada tubos capilares estériles, con un extremo sellado, se sellaron los otros extremos del tubo y se sumergieron totalmente en un termostato de inmersión marca Julabo (Alemania), con estabilidad de temperatura $\pm 0,01^\circ\text{C}$. Este experimento se llevó a cabo a tres temperaturas de trabajo: 72, 77 y 82°C.

A diferentes tiempos de tratamiento, se retiraron dos tubos capilares del baño térmico y se enfriaron con hielo. Los capilares se limpiaron con alcohol etílico 96° y se rompieron asépticamente en un solo extremo. Se volcó el contenido dentro de tubos con 225 µl de agua peptona 0,1% (dilución 1:10) y se realizó una mezcla exhaustiva mediante vortex. Seguidamente, se realizaron las siguientes diluciones decimales: la dilución 1:100 se realizó tomando 100 µl que se colocaron en 900 µl de agua peptonada y las restantes tomando 500 µl en 4,5 ml de agua peptonada 0,1%. De cada dilución se tomaron 100 µl y se sembraron, por duplicado, en la superficie de placas conteniendo ATS adicionado con 0,6 % de EL. Se incubó a 37°C durante 24 horas.

Las células desarrolladas se subcultivaron en placas de AVB y posteriormente se identificación utilizando agar TSI y agar lisina hierro.

Los recuentos se expresaron en \log_{10} UFC/g. El límite de detección fue de $2 \log_{10}$ UFC/g. Cuando la técnica de siembra directa no pudo detectar *Salmonella*, se realizó un enriquecimiento en caldo tripteína de soja adicionado con 0,6% de EL, seguido por un repique en placas de AVB y posterior confirmación de las colonias obtenidas por pruebas bioquímicas.

III.2.2. Estudios de inactivación térmica de un inóculo mixto formado por cepas de diferentes serotipos

Se trabajó con un solo inóculo conformado por tres cepas, seleccionadas por su mayor resistencia térmica, una por cada uno de los tres serotipos estudiados: cepa 2 de *S. Enteritidis*, cepa 2 de *S. Typhimurium* y cepa 2 de *S. Montevideo*.

La preparación de los inóculos y la metodología utilizada se describen en el Apartado III.2.1.

III.2.3. Resistencia térmica de inóculos sometidos a shock térmico.

Se trabajó con los cócteles de cepas de un mismo serotipo y con el inóculo mixto de distintos serotipos y se procedió con la metodología descrita en el Apartado III.2.1. Después de inocular la muestra de albúmina de huevo deshidratada con propiedades gelificantes, con cada inóculo en forma líquida, se procedió al secado en una estufa marca SAN JOR modelo SL60CDB (Argentina) con control de temperatura a 50°C por 30 minutos. Luego se realizaron los estudios de muerte térmica siguiendo con la metodología descrita en II 2.1.

III. 2.4. Evaluación de la cinética de muerte:

Las curvas de supervivencia se generaron a partir de la información experimental para cada condición ensayada, por medio de la representación gráfica de la razón de los logaritmos decimales entre el número de microorganismos sobrevivientes, N y el número inicial de microorganismos, N_0 en función del tiempo de tratamiento (t).

Se utilizó la inversa de la pendiente de la curva de supervivencia para determinar el tiempo de reducción decimal

“D”, que se define como el tiempo necesario para destruir el 90% de la población bacteriana.

Para estudiar la influencia de la temperatura sobre el tiempo de reducción decimal, se representó el logaritmo (en base 10) de D en función de la temperatura. Se utilizó la inversa de la pendiente de la curva de destrucción para determinar el valor “z” que representa la variación de temperatura a la que el valor D disminuye por un factor de 10 o sea la reducción de $1 \log_{10}$.

III.2.5. Diseño experimental

Un diseño factorial se utilizó para evaluar los efectos de temperatura de calentamiento y los tratamientos previos:

Temperaturas de calentamiento: 72, 77 y 82°C

Inóculos: 3 cócteles de un mismo serotipo y un inóculo mixto de las cepas más termorresistentes de los distintos serotipos elegidos.

Tratamientos: con y sin choque térmico a 50°C por 30 minutos

Total: $3 \times 4 \times 2$: 24 experimentos

III.2.6. Supervivencia de *Salmonella* en albúmina de huevo con propiedades gelificantes ($a_w = 0,338$)

Las muestras de albúmina de huevo con propiedades gelificantes se inocularon con aproximadamente 1ml de inóculo/g albúmina de huevo deshidratada, formado por un cóctel de cepas de cada uno de los serotipos de *Salmonella* que se dispersó por atomización, posteriormente se secó en estufa a 30°C por 30 minutos. En ambas matrices homogeneizadas se determinó la densidad de la población de cada inóculo por siembra sobre la superficie de placas de ATS adicionado de 0,6% de EL e incubadas a 37°C por 24 horas.

Las muestras inoculadas se mantuvieron a temperatura ambiente en una bolsa de polietileno estériles durante un año, que es el tiempo de vida útil comercial de este ingrediente alimentario. Cada dos meses se realizaron recuentos de *Salmonella* para evaluar su viabilidad. Las células desarrolladas se subcultivaron en placas de AVB y posteriormente se identificaron utilizando agares TSI y lisina hierro.

III.2.7. Curvas de supervivencia bacteriana

El ajuste de las curvas de supervivencia a regresión lineal fue realizado con el Software Origin Pro 8.5 (OriginLab Software Inc. 2009) con un intervalo de confianza de 95%.

III.2.8. Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) para determinar si las medias de los valores D y z diferían significativamente entre los inóculos, las temperaturas y los tratamientos previos que fueron elegidos. Cuando se encontraron diferencias significativas entre las medias se realizó la prueba de Tukey para comparar los efectos de la conformación del inóculo, del tratamiento y la temperatura, por pares. El nivel de significación utilizado para determinar la diferencia de medias entre los tratamientos fue de 5%. Se utilizó el programa SYSTAT 12 (SYSTAT Inc., Everston, Illinois).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1. Inactivación térmica de un cóctel de cepas del mismo serotipo en albúmina de huevo deshidratada con propiedades gelificantes ($a_w= 0,338$)

Se trabajó con tres cócteles, uno compuesto por las tres cepas de *S. Enteritidis*, otro compuesto por las dos cepas de *S. Typhimurium* y el tercero compuesto por las dos cepas de *S. Montevideo*.

Los tiempos de tratamiento para cada temperatura se escogieron analizando los resultados obtenidos en las etapas anteriores, cuando se trabajó con inóculos simples.

En la Figura 34 se presentan los resultados obtenidos a partir del estudio de la respuesta del cóctel de cepas de cada uno de los serotipos de *Salmonella* en albúmina de huevo deshidratada con propiedades gelificantes, tratada por calor a 72, 77 y 82° C.

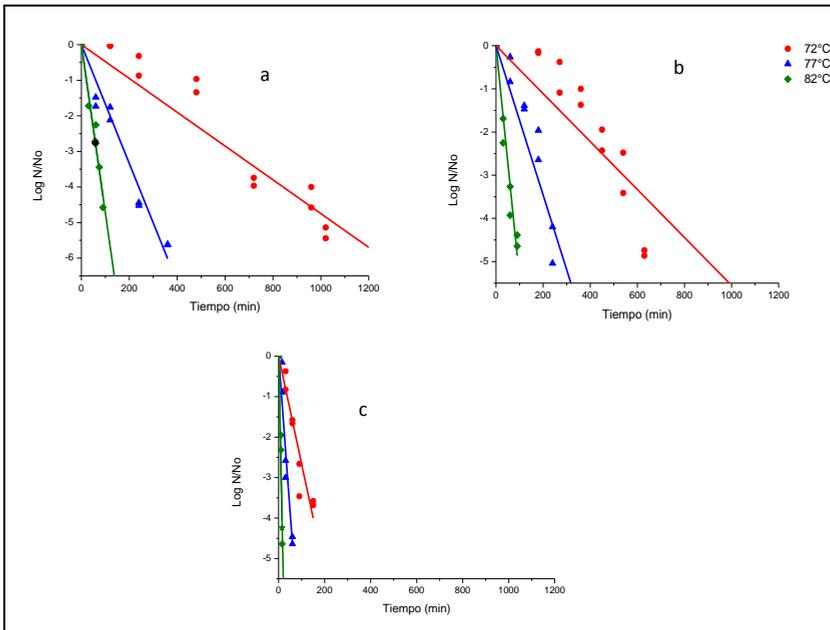


Figura 34. Supervivencia de los cócteles de a) *S. Enteritidis*; b) *S. Typhimurium* y c) *S. Montevideo* en albúmina de huevo deshidratada ($aw=0,338$), a 72, 77 y 82°C.

En el tratamiento a 72°C las gráficas de supervivencia de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* se presentaron con más de una fase y con presencia de hombros o períodos de retraso al igual que colas o subpoblaciones de bacterias más resistentes al tratamiento. A esta temperatura, el comportamiento indica que los miembros de la población fueron inactivados a diferentes tiempos de tratamiento. A medida que aumentó la temperatura se observó que la mayor parte de la población bacteriana fue destruida en un muy corto tiempo y a 82°C el comportamiento,

en término media refleja que la mayor parte de la población microbiana mostró una resistencia más homogénea. De todos modos, en todas las condiciones experimentales ensayadas, las curvas de supervivencia obtenidas se ajustaron a una cinética de inactivación de primer orden con valores de r^2 próximos o superiores a 0,9.

Para una mejor comparación entre los parámetros de resistencia térmica se volvieron a considerar los valores de D para cada una de las cepas individuales, cuyo comportamiento se describió en el capítulo anterior, tal como se muestran en la Figura 35, 36 y 37 para *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Montevideo* respectivamente.

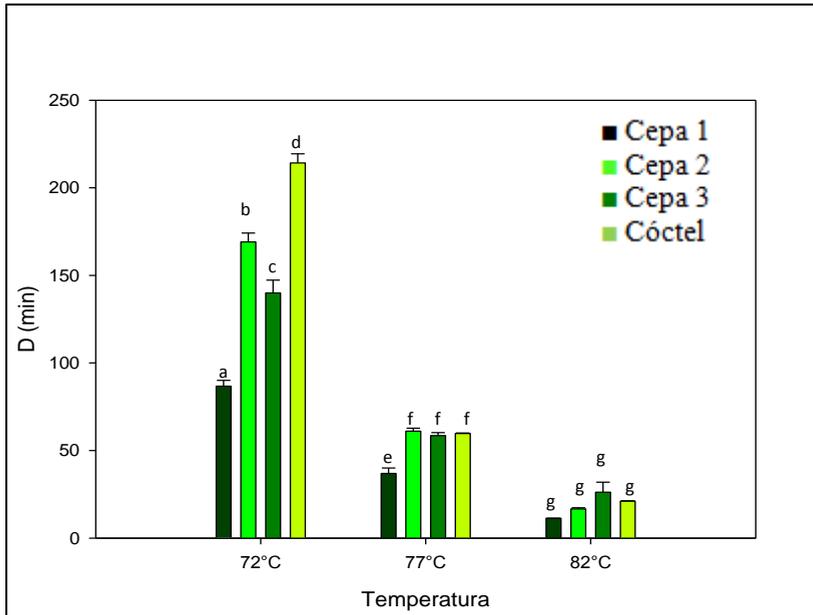


Figura 35. Tiempos de reducción decimal de los inóculos simples y el cóctel de *S. Enteritidis*

Las barras representan los promedios de los valores D, que se determinaron por duplicado, con sus respectivos desvíos estándares. Para cada temperatura de los tratamientos, las letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

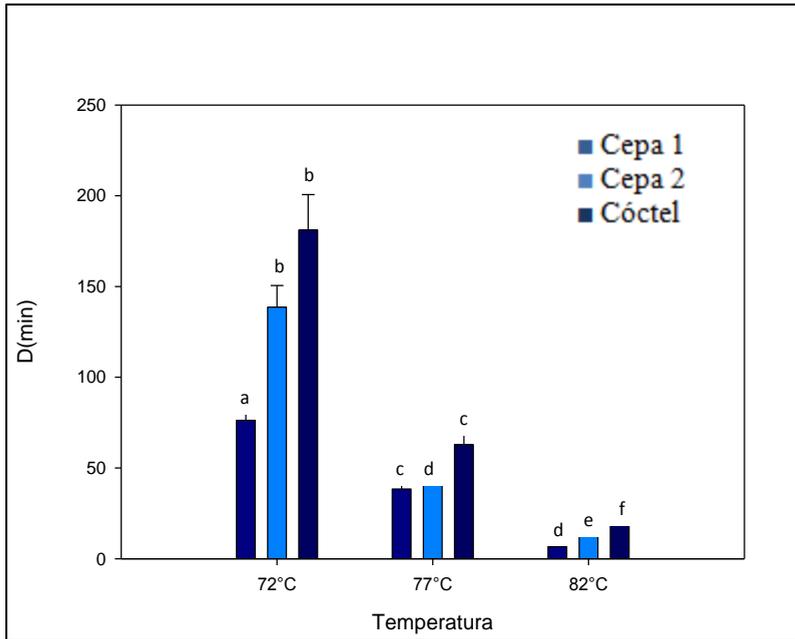


Figura 36. Tiempos de reducción decimal de los inóculos simples y el cóctel de *S. Typhimurium*

Las barras representan los promedios de los valores D, que se determinaron por duplicado, con sus respectivos desvíos estándares. Para cada temperatura de los tratamientos, las letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

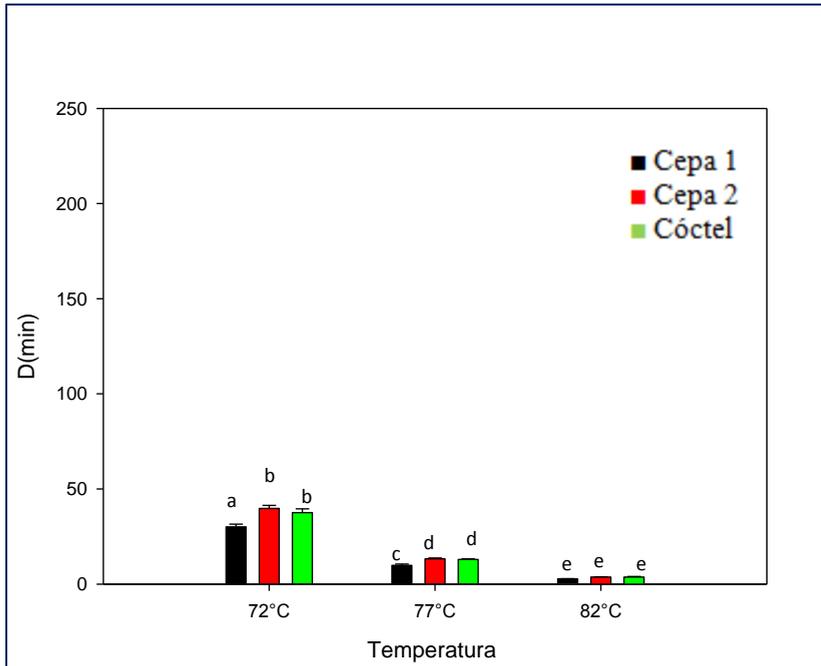


Figura 37. Tiempos de reducción decimal de los inóculos simples y el cóctel de *S. Montevideo*.

Las barras representan los promedios de los valores D, que se determinaron por duplicado, con los respectivos desvíos estándares. Para cada temperatura de los tratamientos térmicos, las letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

Para realizar estos estudios se comenzó con un inóculo de $7,9 \log_{10}$ UFC/g para *S. Enteritidis* que se inactivó en 20 horas a 72°C y en 2,5 horas a 82°C ; un inóculo de $7,3 \log_{10}$ UFC/g para *S. Typhimurium* que se inactivó durante 12 horas a 72°C y en 3 horas a 82°C y un inóculo de $6,9 \log_{10}$ UFC/g para *S. Montevideo* que se inactivó en 3 horas a 72°C y en 45 minutos a 82°C . Resultados similares fueron reportados por Jung y

Beuchat (1999) quienes reportan que el calentamiento a 82°C durante 8 horas no logró eliminar 5 log₁₀ de *S. Typhimurium*/g de albúmina de huevo deshidratada, independientemente del contenido de humedad.

En este estudio los cócteles de cepas de un mismo serotipo no generaron un incremento en la resistencia térmica, con respecto a los inóculos más termorresistentes, en las temperaturas estudiadas. Solo *S. Enteritidis* presentó diferencias significativas a 72°C.

III.2. Inactivación térmica de un inóculo mixto de distintos serotipos

Los inóculos mixtos se conformaron con las cepas que presentaron los valores D mayores en las matrices estudiadas: cepa 2 de *S. Enteritidis*, la cepa 2 de *S. Typhimurium* y la cepa 2 de *S. Montevideo*.

Se presentan, en la Figura 38 las gráficas de supervivencia del inóculo mixto de los tres serotipos.

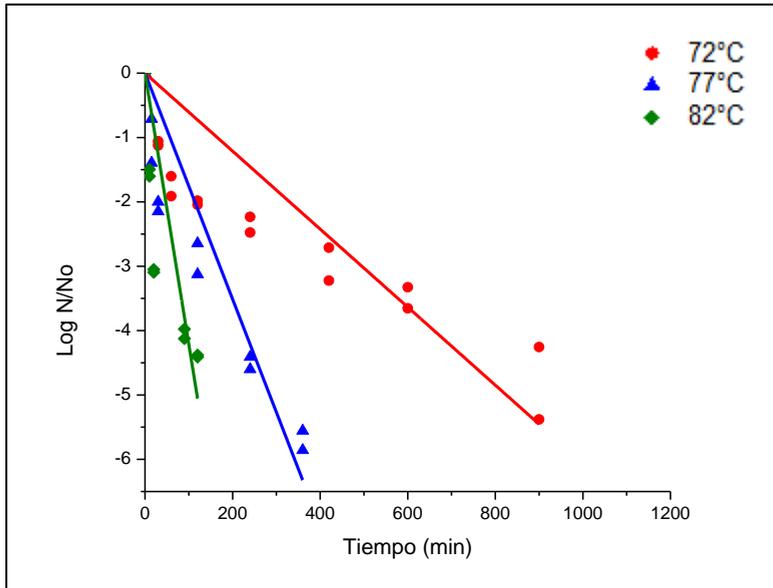


Figura 38. Supervivencia del inóculo mixto de serotipos de *Salmonella* en albúmina de huevo deshidratada ($a_w = 0,338$), a 72, 77 y 82°C.

Para este inóculo mixto, se necesitaron 24 horas para inactivar 7,8 \log_{10} UFC/g de la población celular a 72°C y 2,5 horas a 82°C.

Las curvas de inactivación obtenidas para todas las temperaturas mostraron respuestas muy diferentes de los inóculos bacterianos simples, se presentaron con más de una fase y con una inactivación más marcada en los primeros minutos de tratamiento, lo que indicaría la pérdida de viabilidad

de *S. Montevideo* que presentó menor resistencia térmica individual.

Para una mejor comparación de los parámetros de resistencia térmica se volvieron a considerar los valores D de cada una de las cepas individuales, cuyo comportamiento se describió en el capítulo anterior, tal como se muestran en la Figura 39.

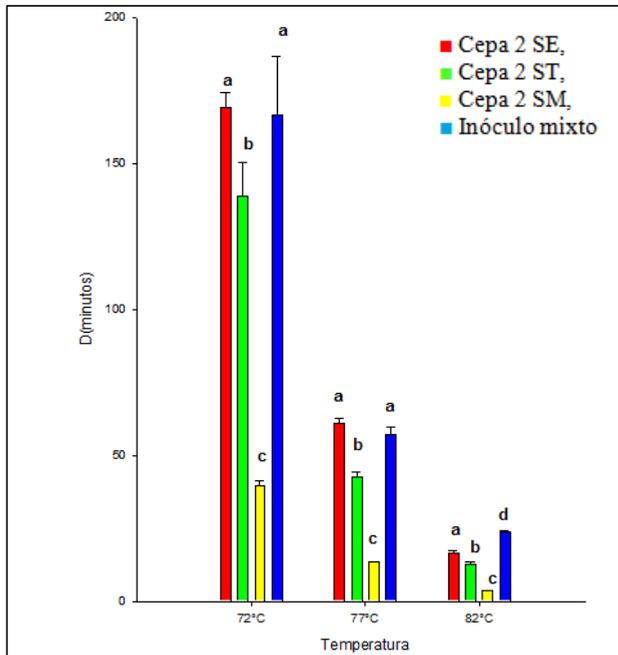


Figura 39. Tiempos de reducción decimal de los inóculos simples más termorresistentes y el inóculo mixto

Para cada temperatura las letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

Como puede observarse se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores D de los inóculos simples y entre éstos y el inóculo mixto sólo a 82°C. A las temperaturas más bajas el inóculo mixto tuvo un comportamiento similar a la cepa más termorresistente.

Las diferencias en los valores D entre los estudios pueden atribuirse a interacciones célula-célula, mediante autoinductores liberados al medio, que pudieran manifestarse entre los distintos serotipos, a las condiciones fisiológicas de las células o la metodología utilizada para la recuperación de los sobrevivientes.

III.3. Inactivación térmica de inóculo sometido a choque térmico a 50°C por 30 minutos

III.3.1. Inóculos de cócteles de cepas de igual serotipo

Para este estudio se utilizaron los tres cócteles de cepas. Con cada cóctel se contaminó la muestra de albúmina de huevo y se secó en estufa a una temperatura constante de 50°C por 30 minutos.

En la Figura 40 se muestran las gráficas de supervivencia de cada uno de los cócteles.

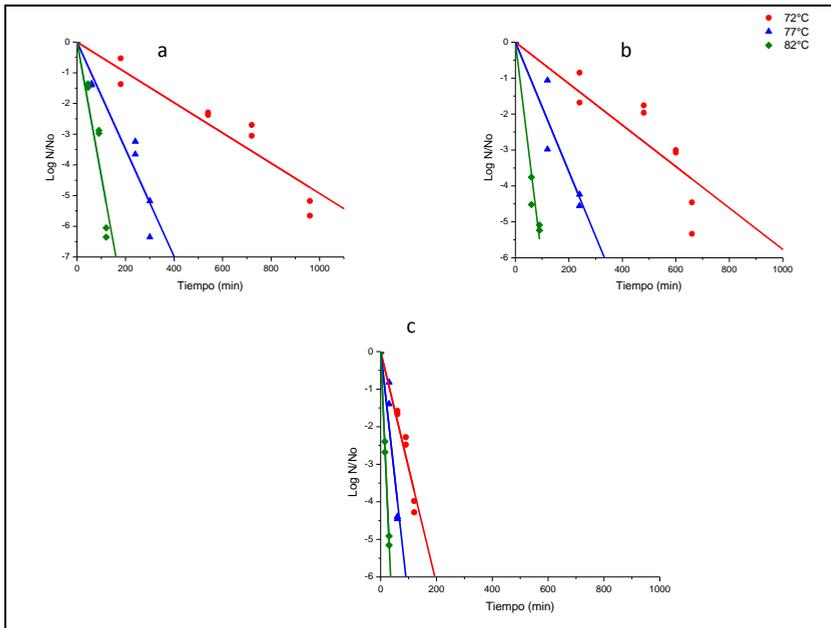


Figura 40. Supervivencia de los cócteles de cepas de *Salmonella* a) *S. Enteritidis*; b) *S. Typhimurium* y c) *S. Montevideo* sometidos a choque térmico en albúmina de huevo deshidratada ($a_w=0,338$), a 72, 77 y 82°C.

Los tiempos de inactivación de los cultivos fueron similares a los obtenidos para los inóculos sin aplicar shock térmico a 50°C por 30 minutos: en *S. Enteritidis* se iniciaron los estudios con un inóculo de 8,6 log₁₀ UFC/g que se inactivó en 24 hs a 72°C y en 3 horas a 82°C; en *S. Typhimurium* se comenzó con un inóculo de 7,9 log₁₀ UFC/g que se inactivó en 12 horas a 72°C y en 2,5 horas a 82°C y en *S. Montevideo* se comenzó con un inóculo de 6,9 log₁₀ UFC/g que se inactivó en 3 horas a 72°C y 45 minutos a 82°C.

Las gráficas de inactivación se presentaron con un perfil similar a las obtenidas sin shock térmico. Ello se evidencia también en la concordancia de los parámetros característicos de las mismas.

En la Figura 41 se comparan los valores D obtenidos para los cócteles con y sin shock térmico.

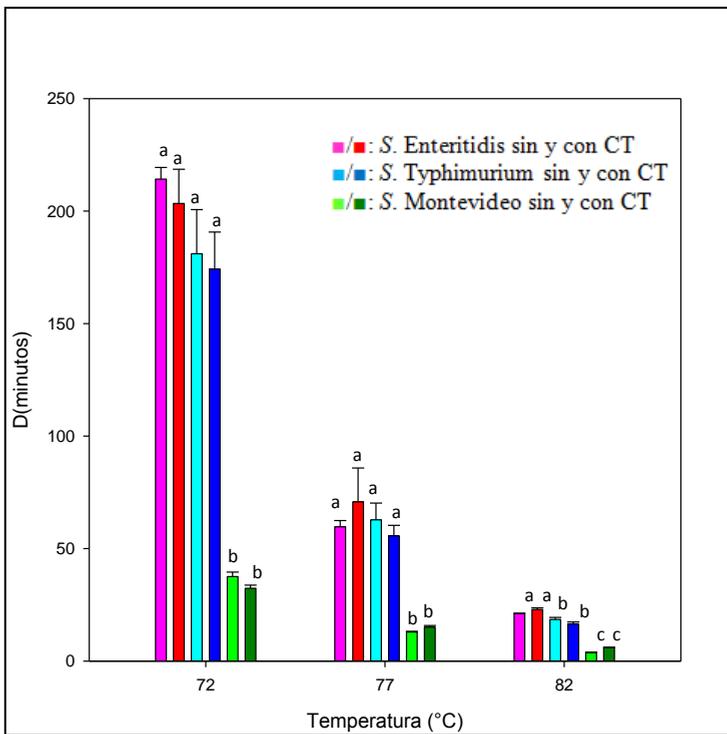


Figura 41. Tiempos de reducción decimal de los cócteles de cepas
 Para cada temperatura las letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$). CT: choque térmico a 50°C por 30 minutos

De estos resultados se pudo inferir que el choque térmico a 50°C por 30 minutos no produjo modificaciones en la termorresistencia de los cócteles en ninguna de las temperaturas estudiadas posiblemente porque la temperatura de estudio no haya sido suficiente para inducir cambios en las células de *Salmonella*. Según Gupte *et al.*, el choque térmico debe darse a 80°C para que la temperatura interna de las células alcance a 56°C.

III.3.2. Inóculo mixto de distintos serotipos

Para este estudio se utilizaron las cepas con mayor resistencia térmica: cepa 2 de *S. Enteritidis*, cepa 2 de *S. Typhimuirum* y cepa 2 de *S. Montevideo*. Con este inóculo mixto se contaminó la muestra de albúmina de huevo con propiedades gelificantes y se secó en estufa a una temperatura constante de 50°C por 30 minutos.

Se muestra, en la Figura 42, las gráficas de supervivencia obtenidas a las tres temperaturas de ensayo: 72, 77 y 82°C.

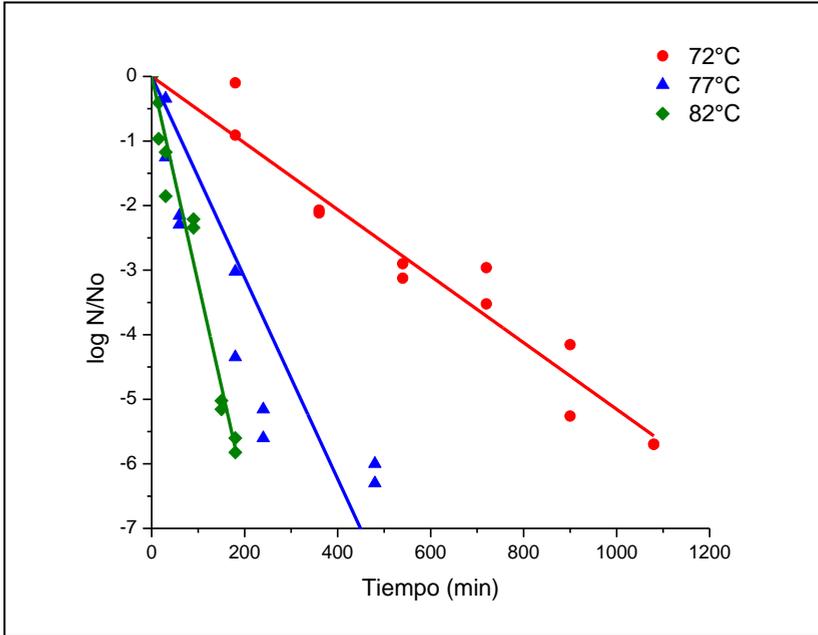


Figura 42. Supervivencia del cultivo mixto de serotipos de *Salmonella* sometido a choque térmico en albúmina de huevo deshidratada ($a_w = 0,338$), a 72, 77 y 82°C.

Se comenzó con una concentración de inóculo en la albúmina de huevo deshidratada de $8,3 \log_{10}$ UFC/g y se necesitaron los mismos tiempos de inactivación que se habían obtenido para el inóculo mixto sin previo shock a 50°C por 30 minutos: 24 horas para inactivar $7,8 \log_{10}$ UFC/g de la población celular a 72°C y 2,5 horas a 82°C. Resultados similares a estos son los obtenidos por Farakos *et al.*, (2013) quienes informan,

para un polvo de proteínas de $a_w = 0,36$ inoculado con una mezcla de cuatro serotipos, una disminución de $3 \log_{10}$ la población microbiana, en 60 minutos.

En este inóculo mixto sometido a shock térmico (50°C durante 30 min) también se observaron curvas de inactivación con más de una fase, con mayor pendiente en los primeros minutos de tratamiento, lo que se corresponde con la inactivación de *S. Montevideo*.

Para una mejor comparación de los parámetros de resistencia térmica se volvieron a considerar los valores D del inóculo mixto con o sin shock térmico a 50°C 30 minutos, cuyo comportamiento se describió en Apartado anterior, tal como se muestran en la Figura 43.

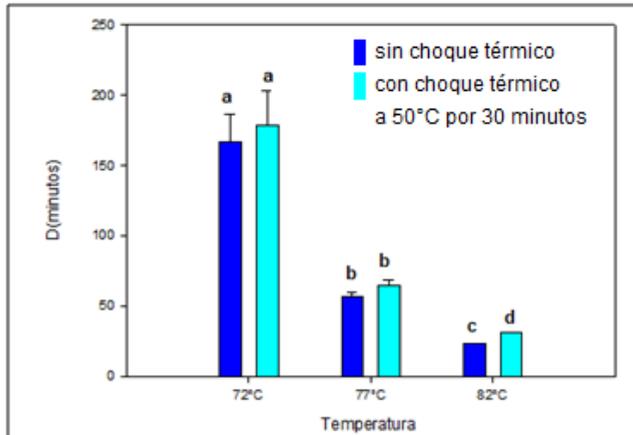


Figura 43. Tiempos de reducción decimal del inóculo mixto a 72,77 y 82°C

Para las temperaturas de los tratamientos térmicos, las letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$).

Como puede observarse, las diferencias fueron significativas ($p < 0,05$) cuando se compararon los valores D sólo a 82°C pero este aumento, de 7,51 minutos, no resulta importante para los procesos térmicos a los que se somete la albúmina de huevo.

Los valores z calculados para los cócteles de cepas de igual serotipo y los inóculos mixtos de distintos serotipos sin y con tratamiento previo a 50°C por 30 minutos se muestran en la Tabla 18 en donde también se presentan comparativamente los datos de los valores D.

Tabla 18. Tiempos de reducción decimal D (minutos) y diferencial de temperatura z (°C), para cada uno de los cócteles del mismo serotipo e inóculo mixto de los serotipos con y sin tratamiento térmico a 50°C por 30 minutos.

Inóculos	Valor D (minutos)			Valor z (°C)
	72°C	77°C	82°C	
Cóctel de S. Enteritidis sin CT	214,19±5,19 a r ² = 0,96	59,71±2,75 a r ² = 0,98	21,15±0,15 a r ² = 0,99	9,94±0,13 a r ² = 0,98
Cóctel de S. Enteritidis con CT	203,40±15,17 a r ² = 0,96	70,80±15,03 a r ² = 0,96	22,90±0,75 a r ² = 0,94	10,56±0,52 a r ² = 0,98
Cóctel de S. Typhimurium sin CT	181,07±19,59 a r ² = 0,88	62,80±7,44 a r ² = 0,93	18,51±0,88 b r ² = 0,95	10,13±0,69 a r ² = 0,99
Cóctel de S. Typhimurium con CT	174,23±16,45 a r ² = 0,92	55,68±4,67 a r ² = 0,95	16,43±0,95 b r ² = 0,98	9,94± 0,13 a r ² = 0,97
Cóctel de S. Montevideo sin CT	37,57±1,97 b r ² = 0,90	12,96±0,32 b r ² = 0,96	3,70±0,28 c r ² = 0,96	9,94± 0,12 a r ² = 0,98
Cóctel de S. Montevideo con CT	32,37±1,38 b r ² = 0,98	16,43±0,95 b r ² = 0,94	5,95±0,26 c r ² = 0,99	13,61±0,70 b r ² = 0,99
Inóculo mixto sin CT	166,40±20,40 a r ² = 0,88	56,99±2,48 a r ² = 0,92	23,73±0,26 a r ² = 0,84	11,91±0,61 b r ² = 0,96
Inóculo mixto con CT	178,55±24,77 a r ² = 0,98	64,33±4,69 a r ² = 0,90	31,24±0,38 d r ² = 0,98	12,60±0,02 b r ² = 0,98

Para las temperaturas de los tratamientos térmicos y para los valores z en las columnas, las letras diferentes indican diferencia significativa (p<0,05).

CT: choque térmico 50°C por 30 minutos

Puede observarse que las diferencias en los valores D del inóculo mixto sólo fueron significativas (p<0,05) cuando la temperatura de calentamiento fue de 82°C. Para los cócteles de

cepas del mismo serotipo. Los valores D en todas las temperaturas fueron dependientes de los serotipos y estos resultados fueron similares a los que se obtuvieron con los inóculos simples. Cuando se compararon los valores D según el serotipo se observó esta relación entre ellos: *S. Enteritidis* > *S. Typhimurium* > *S. Montevideo*.

Por otra parte, las condiciones utilizadas para estudiar la termorresistencia en albúmina de huevo deshidratada no mostraron diferencia significativa ($p > 0,05$) que pudieran afectar a los valores z calculados para cada bacteria. El choque térmico solo modificó este parámetro cuando se trabajó con un inóculo mixto de las cepas más termorresistentes. De todos modos se puede generalizar, al igual que lo planteado por Bunning *et al* (1990) que el tratamiento térmico subletal no modificó la termorresistencia de *Salmonella* o lo hace en un grado de menor importancia en términos de los procesos térmicos a los que usualmente se somete la albúmina de huevo.

En cuanto a la resistencia observada en cócteles de cepas o en el inóculo mixto, cabe citar varias investigaciones: Silva y Gibbs (2012) reportaron resultados similares a los encontrados en este estudio de tesis, ya que señalan estudios previos efectuados en cócteles de serotipos de *Salmonella* spp. que

resultaron ser resistentes al calor en los alimentos de baja actividad de agua. Izurieta *et al.*, (2008) informaron la supervivencia de esta bacteria después de tratar cacao tostado a 130°C durante 5 minutos. Ma *et al.*, (2009) reportaron que el tratamiento térmico de estas bacterias a 90°C durante de 30 minutos no fue suficiente para reducir en 5 log₁₀ UFC/g de *Salmonella* en mantequilla de maní. Krapf y Gantenbein (2010) señalaron que un tratamiento térmico a 90°C por 26 minutos en chocolate negro sólo redujo la concentración de *Salmonella* en 1D.

También Mc Donough y Hargrove (1968) observaron que un inóculo mixto de *Salmonella entérica* formado por *S. Senftenberg*, *S. Typhimurium* y *S. New Brunswick*, fue extremadamente resistente a la destrucción por el calor seco en leche en polvo sin grasa. Estos investigadores, de manera coincidente con los resultados de este trabajo de tesis, informan que temperaturas situadas entre 60°C y 76,6°C no destruyeron las células de *Salmonella* cuando la población inicial fue de 4 log₁₀ UFC/g después de 10 hs y sostienen que el nivel de humedad en la leche en polvo influyó, de manera significativa, en la resistencia al calor de *Salmonella*.

III.4. Supervivencia de las cepas seleccionadas en albúmina de huevo deshidratada con propiedades gelificantes ($a_w = 0,338$).

Se estudió la cinética de supervivencia de cada serotipo de *Salmonella entérica* con los que se trabajó en este estudio, durante un año pues es la vida útil o fecha de vencimiento del producto.

Las concentraciones iniciales de las mezclas de serotipos que se inocularon en albúmina de huevo deshidratada fueron: *S. Enteritidis*: 6×10^8 UFC/g; *S. Typhimurium*: $1,5 \times 10^6$ UFC/g y *S. Montevideo*: $2,5 \times 10^7$ UFC/g. Los resultados se presentan en la Figura 44.

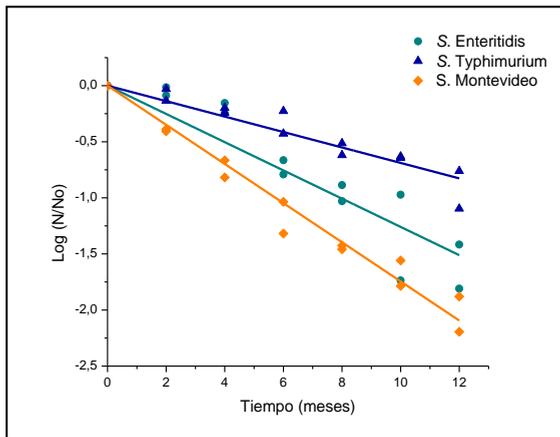


Figura 44. Supervivencia de *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium y Montevideo en albúmina de huevo deshidratada ($a_w = 0,338$) durante un año.

Después de un año de conservación a temperatura ambiente la concentración de bacterias disminuyó, en promedio 0,92 log UFC/g para *S. Typhimurium* que presentó una velocidad de muerte (μ) de $\mu = 0,07 \log \text{mes}^{-1}$, $1,51 \log_{10} \text{ UFC/g}$ para *S. Enteritidis* con $\mu = 0,12 \log \text{mes}^{-1}$, y $1,95 \log/\text{UFC/g}$ para *S. Montevideo* con $\mu = 0,17 \log \text{mes}^{-1}$.

Varios estudios también demuestran que *Salmonella* puede sobrevivir en alimentos secos por períodos prolongados (Janning *et al.*, 1994; Hiramatsu *et al.*, 2005). Janning *et al.*, 1994) estudiaron la supervivencia de 18 cepas bacterianas (incluyendo *Salmonella*) en alimentos de actividad de agua de 0,20 a 22 °C y encontraron que después de una disminución inicial en el número de células, las cepas de *Salmonella* evaluadas se mantuvieron estables durante un tiempo muy largo y fueron necesarios 248-1.351 días para lograr una reducción de 1,0 \log_{10} . Uesugi *et al.*, (2006) informan que por 160 días la concentración de células de *Salmonella* se mantuvo invariable en almendras secas.

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis se infiere que la combinación de un alto contenido proteico de la albúmina de huevo junto con una la baja actividad de agua ($a_w = 0,338$) tienen un notable efecto sinérgico sobre la supervivencia de

Salmonella. Por ello la contaminación post-proceso de la albúmina de huevo con salmonelas puede resultar en la supervivencia de estas bacterias durante un período que supera la duración asignada como vida útil del producto, cuando el mismo es mantenido durante todo el tiempo a temperatura ambiente.

Las respuestas frente a las altas temperaturas de tratamiento térmico descritas en esta tesis para *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium tienen importantes consecuencias para la seguridad alimentaria y evidencian la necesidad de realizar en los próximos años un mayor esfuerzo investigador centrado en el uso de inóculos menores que reflejen las posibilidades concretas de contaminación de la albúmina de huevo, con la aplicación de metodología basada en la detección molecular de *Salmonella*, con el objetivo que la Industria del huevo pueda realizar una selección inteligente de tecnologías menos drásticas que preserven las propiedades de estos ingredientes alimentarios evitando el riesgo de contaminación con esta bacteria.

CONCLUSIONES

Este estudio aportó información cuantitativa relevante sobre la termorresistencia de tres serotipos de *Salmonella* de interés sanitario y tecnológico en albúmina de huevo deshidratada. También proveyó información acerca de las modificaciones de las proteínas por la pasteurización en seco y su efecto sobre la presencia de péptidos bioactivos. En particular permitió arribar a las siguientes conclusiones:

- La pasteurización en seco mejora las propiedades funcionales de formación de espuma, capacidad gelificante y retención de agua en la albúmina de huevo deshidratada lo que conduce a que estos ingredientes puedan ser utilizados en diversas formulaciones alimenticias para mejorar sus características reológicas, además de aportar beneficios para la salud de los consumidores al ser la albúmina de huevo una fuente de proteína de alto valor nutricional.
- La identificación de los péptidos bioactivos FRADHPFL e IVF con actividad antihipertensiva y GGLEPINFQ con actividad antioxidante, sugieren la posibilidad de uso con fines médicos. Resulta especialmente atractiva la idea de utilizarlos como ingredientes en alimentos funcionales para la

prevención y/o el tratamiento de enfermedades coronarias ya que el proceso de pasteurización en seco facilita la digestión de la albúmina de huevo y posiblemente la liberación de las secuencias de estos péptidos con actividad biológica.

- En este estudio también se comprobó que las curvas de supervivencia obtenidas para *Salmonella* spp. en caldo nutritivo y en albúmina de huevo deshidratada con propiedades de batido y con propiedades gelificantes a 72, 77 y 82°C se ajustaron a una cinética de inactivación de primer orden. Los valores del tiempo necesario para reducir a la décima parte la población microbiana en minutos (D) y la variación de temperatura, expresada en grados centígrados, a la que el valor D disminuye por un factor de 10 (z) resultaron parámetros adecuados para comparar la resistencia que exhibieron las células sometidas a las diferentes temperaturas, en las distintas matrices e inóculos y en choque térmico (50°C por 30 minutos).
- La resistencia térmica de las cepas de *Salmonella* entérica: Enteritidis, Typhimuirum y Montevideo fue

dependiente de la actividad de agua, de tal manera que, los valores D obtenidos en caldo nutritivo fueron claramente inferiores a los encontrados en albúmina de huevo deshidratada. Aproximadamente, y de manera independiente de la actividad de agua de la albúmina de huevo deshidratada y pasteurizada: $a_w=0,374$ para albúmina de huevo con propiedades de batido y $a_w=0,338$ para albúmina de huevo con propiedades gelificantes, *S. Enteritidis* aumentó la termorresistencia 60 veces más que en caldo nutritivo a 72°C y 300 veces a 82°C, *S. Typhimurium* 50 veces más a 72°C y 216 veces mayor a 82°C y *S. Montevideo* 25 veces más a 72°C.

- La resistencia térmica de los inóculos simples en ambas matrices de albúmina de huevo deshidratada depende de los serotipos y de la temperatura. Cuando se compararon los valores D según el serotipo, se observó que la relación entre ellos fue: *S. Enteritidis* > *S. Typhimurium* > *S. Montevideo*, con valores D a 72°C aproximados de 3 horas, 2 horas y 30 minutos y a 82°C, de 17 minutos, 9 minutos y 3 minutos respectivamente. En todos los medios de calentamiento se comprobó que *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* desarrollaron una respuesta de

protección frente al calor de mucha mayor intensidad que *S. Montevideo*.

- Las cepas que presentaron mayor resistencia térmica también mostraron mayor tolerancia a ácido acético a pH 3,5. Es indudable que los factores ambientales previos al tratamiento térmico han influido en la termorresistencia adquirida por las células de *Salmonella*.
- La termorresistencia de los cócteles de cepas de un mismo serotipo como el inóculo mixto de distintos serotipos, seleccionados por su mayor grado de termorresistencia fue dependiente de la temperatura de tratamiento e independiente del choque térmico. Estas mezclas de bacterias, no generaron un incremento en la resistencia térmica a 72°C (valores D aproximados de 3,5 horas para *S. Enteritidis*, 3 horas para *S. Typhimurium* y 30 minutos para *S. Montevideo* para los cócteles de cepas y de 3 horas para el inóculo mixto) pero sí mostraron mayor resistencia al calor a mayor temperatura (valores D a 82°C aproximadamente de 20 minutos para *S. Enteritidis*, 17 minutos para *S. Typhimurium* y 5 minutos para *S. Montevideo* en forma

de cóctel y de 30 minutos para el inóculo mixto). De todos modos estos aumentos de resistencia no generan un nuevo problema en términos de los procesos térmicos a los que se somete la albúmina de huevo en la industria.

- Los valores z obtenidos fueron independientes de los serotipos pero dependientes de la actividad de agua (aproximadamente 6°C en caldo nutritivo y 10°C en albúmina de huevo deshidratada) y del choque térmico pero solo para el inóculo mixto ($z=12,6^{\circ}\text{C}$).
- Durante la vida útil de 1 año de la albúmina de huevo deshidratada una gran proporción de células mantuvieron su viabilidad. En promedio se observó una disminución de $0,92 \log_{10}$ UFC/g para *S. Typhimurium*, $1,51 \log_{10}$ UFC/g para *S. Enteritidis*, y $1,95 \log_{10}$ UFC/g para *S. Montevideo*. Estos valores indican la habilidad, de estos serotipos de *Salmonella*, para sobrevivir en alimentos proteicos de baja actividad de agua.
- La tecnología de pasteurización aplicada a estos productos de albúmina de huevo con la finalidad de mejorar las propiedades funcionales y obtener propiedades de batido y propiedades gelificantes se

evaluó como adecuada para reducir el riesgo microbiológico por *Salmonella*. Para su correcta aplicación, se hace imprescindible que la industria determine los tiempos en los que ocurren las modificaciones funcionales en las proteínas para incorporar procesos menos agresivos en estos ingredientes alimentarios.

REFERENCIAS

- Alvarez, A., Fernandez, A., Bernardo, A., Lopez, M. 2009. Comparison of acids on the induction of an Acid Tolerance Response in *Salmonella* Typhimurium, consequences for food safety. *Meat Science* 81: 65-70.
- AOAC International. 2005. 18 ed. Rev. 1. Official Method of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. United States of America.
- Archer, J., Jervis, E., Bird, J., Gaze, J. 1998. Heat resistance of *Salmonella weltevreden* in low-moisture environments. *Journal of Food Protection* 61: 969-973.
- Argenfood 2010. Tabla de composición de los alimentos. Universidad Nacional de Luján. Dirección URL: www.unlu.edu.ar/~argenfood/. [Consulta: 18 mar, 2011].
- Arvizu-Medrano, S.M., Escartín, E.F. 2005. Effect of acid shock with hydrochloric, citric, and lactic acids on the survival and growth of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* in acidified media. *Journal of Food Protection* 68(10):2047-53
- Aviles B., Klotz C., Eifert J., Williams R., Ponder M. 2013. Biofilms promote survival and virulence of *Salmonella enterica* sv. Tennessee during prolonged dry storage and after passage through an in vitro digestion system. *International Journal of Food Microbiology* 162:252–259
- Azanza, M., Rustia, A. 2005. Heat resistance characteristics of *Salmonella* Enteritidis in liquid quail egg. *Journal of Food Science and Technology Research* 11(2):151-156.
- Bacon, R.T., Sofos, J.N., Kendall, P.A., Belk, K.E., Smith, G.C. 2003. Comparative analysis of acid resistance between susceptible and multi-antimicrobial-resistant *Salmonella* strains cultured under stationary-phase acid tolerance-inducing and non-inducing conditions. *Journal of Food Protection* 66: 732-740.

- Baker, R.; Golf, J.; Timoney, J. 1980. Prevalence of *Salmonellae* on eggs from poultry farms in New York State. *Poultry Science* 59: 289–292.
- Banwart, G., Ayres, J. 1964. The effect of high temperature storage on the content of *Salmonella* and on the functional properties of dried egg white. *Food Technology* 10: 68-73
- Barrile, J.C., Cone, J.F. 1970. Effect of added moisture on the heat resistance of *Salmonella anatum* in milk chocolate. *Journal of Applied Microbiology* 19: 177-178
- Baylis C., Mac Phee S., Betts R. 2000. Comparison of methods for the recovery and detection of low levels of injured *Salmonella* in ice cream and milk powder. *Journal of Applied Microbiology* 30:320-324.
- Berk, PA, Jonge, R, Zwietering, MH, Abee, T, Kieboom, J. 2005. Acid resistance variability among isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Journal of Applied Microbiology* 99(4):859-866.
- Bernstein, N., Sela S., Neder-Lavon S. 2007. Effect of irrigation regimes on persistence of *Salmonella enterica* serovar Newport in small experimental pots designed for plant cultivation. *Irrigation Science* 26:1–8.
- Bourgeois, M. 1994. *Microbiología Alimentaria* 1. Editorial Acribia: 324-331
- Bourne, M. C. 1982. Food texture and viscosity: concept and measurement New York: Academic Press (Chapter 3): 44-117. Dirección URL: <http://digitalcommons.unl.edu/foodscidiss/7>. [Consulta: 10 mar 2010].
- Braun, P., Fehlhaber, K. 1995. Migration of *Salmonella* Enteritidis from the albumen into the egg yolk. *International Journal of Food Microbiology* 25: 95–99.

- Broersen. K., Van Teeffelen. A., Vries. A., Voragen. A., Hamer. R., De Jongh, H. 2006. Do sulfhydryl groups affect aggregation and gelation properties of ovalbumin? *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54(14):5166-5174.
- Bucher, O., D'Aoutst, J.Y, Holley. R. 2008. Thermal resistance of *Salmonella* serovars isolated from raw, frozen chicken /strips, nugget meat and pelleted broiler feed. *International Journal of Food Microbiology* 124:195-198
- Bunning, V.K., Crawford, R.G., Tierney, J.T., Peeler, J.T. 1990. Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat shock. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 3216–3219.
- Burnett, S.L., Gehm, E. R., Weissinger, W. R., Beuchat, L. R. 2000. Survival of *Salmonella* in peanut butter and peanut butter spread. *Journal of Applied Microbiology* 89:472-477.
- Caffer, M., Terragno, R. 2001. Manual de procedimientos para la caracterización de *Salmonella*. Dirección URL: www.cdc.gov/Manual_procedimientos_Salmonella.pdf [Consulta: 12 ene, 2011].
- Caffer, M.I. 2011. Epidemiología y Estadística de la salmonelosis en la Argentina. Libro de resúmenes del I Congreso Internacional de Zoonosis y enfermedades emergentes y VII Congreso Argentino de Zoonosis.
- Campbell, L., Raikos, V., Euston, S. 2005. Heat stability and emulsifying ability of whole egg and egg yolk as related to heat treatment. *Food Hydrocolloids* 19: 533-539
- Cardozo M., Ribeiro A., Santos L., Piloto F., Hamilton L., Salle C., Rocha S., Pinheiro do Nascimento V. 2006. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. *Brazilian Journal of Microbiology* 37(3):368-371.

- Carraro, A. 2006. Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Scientia Agricola* 63 (3): 291-298.
- Carrique-Mas, J., Bedford, S., Davie, R. 2007. Organic acid and formaldehyde treatment of animal feeds to control *Salmonella*: efficacy and masking during culture. *Journal of Applied Microbiology* 103(1):88-96.
- CDC, 2010. Investigation Update: Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Enteritidis Infections Associated with Shell Eggs. Dirección URL: <http://www.cdc.gov/salmonella/enteritidis/#investigation>. [Consulta: 16 ago, 2011].
- CDC, 2011. Investigation Update: Multistate Outbreak of Human *Salmonella* Enteritidis Infections Associated with Shell Eggs. Dirección URL: <http://www.cdc.gov/Salmonella/enteritidis/#investigation>. [Consulta: 16 ago, 2011].
- Chen, C., Chi, Y., Zhao, M., Lv, L. 2012. Purification and identification of antioxidant peptides from egg white protein hydrolysate. *Amino Acids* 43(1):457-466
- Chenoll, C., 2008. Relaciones Agua-Solutos-Matriz Insoluble en Algunos Sistemas Alimentarios. Tesis Doctoral. Valencia, Universidad Politécnica de Valencia, Instituto de Ingeniería de Alimentos Para el Desarrollo. Dirección URL: <http://riunet.upv.es/handle/10251/2929> [Consulta: 10 mar 2010].
- Chmielewski, R., Frank, J. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2:22–32.
- Clay, C., Board, R. 1991. Growth of *Salmonella* Enteritidis in artificially contaminated hens' shell eggs. *Epidemiology and Infection* 106(2):271–281.

- CLSI, 2007. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. M100 S17, 27(1) Dirección URL: <http://www.microbiolab-bg.com/CLSI.pdf> [Consulta: 8 mar. 2008].
- D'Aoust, J.Y. 2001. *Salmonella*. In: Guide to foodborne pathogens. R.G. Labbe and S. Garcia, ed. John Wiley and Sons, Inc., New York 163-191.
- Da Silva, M. P. 2007. Avaliação da cinética de crescimento, resistência ácida e resistência térmica de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul e comparação com outros sorovares. Dirección URL: <http://hdl.handle.net/10183/11142> [Consulta: 16 mar, 2011]
- Da Silva, M.P., Brandelli, A., Noreña, C.P.Z., Tondo, E.C. 2009. Acid and thermal resistance of a *Salmonella* Enteritidis strain involved in several foodborne outbreaks. Journal of Food Safety 29: 302–317.
- Davalos, A., Miguel, M., Bartolome, B., López-Fandiño, R. 2004. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. Journal of Food Protection 67: 1939–1944.
- De la Torre, M.E. 2006. Caracterización molecular y fenotípica como herramienta de marcaje epidemiológico para cepas de *Salmonella* de origen porcino. Tesis doctoral. Dirección URL: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5604/metm1de1.pdf> [Consulta: 15 ago, 2011].
- Dega, C., Goepfert, J., Amundson, C. 1972. Heat resistance of *Salmonellae* in concentrated milk. Applied Microbiology 23:415–420.

- Deng, X., Li, Z., Zhang, W. 2012. Transcriptome sequencing of *Salmonella enteric* serovar Enteritidis under desiccation and starvation stress in peanut oil. *Food Microbiology*. 30, 311–315.
- Domínguez, M., Jourdan-Da, Silva, N., Vaillant, V., Pihier, N., Kermin, C., Weill, F., Delmas, G., Kerouanton, A., Brisabois, A., de Valk, H. 2009. Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Montevideo infections in France linked to consumption of cheese made from raw milk. *Foodborne Pathogens and Diseases* 6 (1):121–128.
- Donovan, J., Mapes, C., Davis, J., Garibaldi, J. 1975. A differential scanning calorimetric study of the stability of egg white to heat denaturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 26(1): 73–83.
- Doyle, M. E., Mazzotta, A. S. 2000. Review of studies on the thermal resistance of *Salmonellae*. *Journal of Food Protection*, 63(6): 779–795.
- Doyle, M., Beuchat L., Montville T. (2001). Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras. Editorial Acribia: 13-30 y 133-163
- Dubocage L., Heyndrickx M., Grijspeerdt K., Herman L. 2001. Growth of *Salmonella* in egg white. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet*. 66(3b):531-534.
- Dyda, A., Hundy, R., Moffatt, C., Cameron, S. 2009. Outbreak of *Salmonella* Typhimurium 44 related to egg consumption. *Communicable Diseases Intelligence* 33 (4): 414-418.
- Dykes, G.; Moorhead, S. 2001. Survival of three *Salmonella* serotypes on beef trimmings during simulated commercial freezing and frozen storage. *Journal of Food Safety* 2 (21):87-96

- EFSA Journal 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and foodborne outbreaks 2009. 9(3):2090. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2090.pdf> [Consulta: 15 ago. 2011].
- EFSA Journal 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and foodborne outbreaks 2009. 9(3):2090. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2090.pdf> [Consulta: 5 jul. 2012].
- Enomoto, H., Ishimaru, T., Li, C., Hayashi, Y., Matsudomi, N., Aoki, T. 2010. Phosphorylation of ovalbumin by dry-heating in the presence of pyrophosphate: Effect of carbohydrate chain on the phosphorylation level and heat stability. *Food Chemistry* 122 (3): 526–532
- FAO 2007. Código de prácticas de higiene para los huevos y los productos de huevo. Dirección URL: <http://www.fao.org/docrep/012/i1111s/i1111s01.pdf> [Consulta: 15 ago. 2011].
- Farakos S.M., Frank, J.F., Schaffner, D.W. 2013. Modeling the influence of temperature, water activity and water mobility on the persistence of *Salmonella* in low-moisture foods *International Journal of Food Microbiology* 166: 280–293.
- Ferreira, M., Hofer, C., Raemy, A. 1997. A calorimetric study of egg white proteins. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 48: 683–690.
- Figueroa, I., Rodriguez, A. 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 47:45-52
- Finn, S., Condell, O., McClure, P., Amézquita A., Fanning S. 2013. Mechanisms of survival, responses, and sources of

- Salmonella* in low-moisture environments. *Frontiers in Microbiology. FoodMicrobiology*: 4 (331)1-15
- Galvez, A., Aravena, E., Mondaca, R. Isotermas de adsorción en harina de maíz (*Zea mays* L.) 2006. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26 (4): 821-827.
- Gantois I., Eeckhaut V., Pasmans F., Haesebrouck F., Ducatelle R. y Van Immerseel F. 2008. A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. *Avian Pathology* 37: 399–406.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T. J. Van Immerseel, F. 2009, Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *Microbiology Reviews* 33:718–738.
- Garibaldi, J., Straka, R., Ijichi, K. 1969. Heat Resistance of *Salmonella* in Various Egg Products. *Applied Environmental Microbiology* 17(4):491-496
- Gast, R., Guard, J. 2011. Controlling egg contamination with *Salmonella* Enteritidis by understanding its pathobiology. *Memorias del Congreso Latinoamericano de Avicultura* 2011.
- Gast, R., Guard-Petter, J., Holt, P. 2002. Characteristics of *Salmonella* Enteritidis contamination in eggs after oral, aerosol, and intravenous inoculation of laying hens. *Avian Diseases* 46: 629–635
- Gast, R., Guraya, R., Guard-Petter, J. Holt, P. 2007. In Vitro Penetration of Egg Yolks by *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Heidelberg Strains During Thirty-Six-Hour Ambient Temperature Storage. *Poultry Science* 86:1431–1435
- Gast, R., Holt P. 2000. Deposition of phage type 4 and 13a *Salmonella* Enteritidis strains in the yolk and albumen of

- eggs laid by experimentally infected hens. *Avian Diseases* 44: 706–710.
- Global Poultry Trends. 2011. More Egg Products But Fewer Processors in Europe. Dirección URL: <http://www.thepoultrysite.com/articles/1954/global-poultry-trends-more-egg-products-but-fewer-processors-in-europe>. [Consulta: 16 ago. 2011].
- Goepfert, J., Biggie, R. 1968. Heat resistance of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Senftenberg 775W in milk chocolate. *Applied Microbiology* 16: 1939-1940
- Greenacre, E., Brocklehurst, T., Waspe, C., Wilson, D., Wilson, P. 2003. *Salmonella* enterica serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* acid tolerance response induced by organic acids at 20°C: optimization and modeling. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3945-3951
- Grimont, P., Weill, F. 2007. Antigenic formulae of the serovars, 9th edition. WHO Collaborating Center for Reference and Research on, Institute Pasteur, Paris, Francia. DirecciónURL:<http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089> [Consulta: 12 nov. 2010].
- Gruzdev N.; Pinto R., Sela S. (2011). Persistence of *Salmonella enterica* during dehydration and subsequent cold storage. *Food Microbiology* 32:415-422
- Gruzdev, N. Pinto, R., Sela, S. 2011. Effect of Desiccation on Tolerance of *Salmonella enterica* to Multiple Stresses. *Applied and Environmental Microbiology* 77(5):1667–1673
- Guan, J., Grenier, C., Brooks, B. 2006. In vitro study of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium definitive type 104: survival in egg albumen and penetration

- through the vitelline membrane. *Poultry Science* 85:1678–1681.
- Guérin-Dubiard, C., Nau, F. 2007. Minor proteins. In: R Huopalahti, R López-Fandiño, M Anton, R Schade, eds., *Bioactive Egg Compounds*, Berlin: Springer 93–98.
- Guérin-Dubiard, C., Pasco, M., Molle, D., Desert, C., Croguennec, T., Nau, F. 2006. Proteomic analysis of hen egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11):3901-3910
- Guibourdenche, M., Roggentin, P., Mikoleit, M., Fields, P., Bockemühl, J., Grimont, F. Weill, F. 2010. Supplement 2003–2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Research in Microbiology* 161 (1):26-29
- Gurtler, J. 2009. Evaluation of plating media for recovering *Salmonella* from thermally treated egg albumen. *Journal of Applied Poultry Research* 18 (2):297-309
- Gurtler, J., Kornacki J. 2009. Comparison of supplements to enhance recovery of heat-injured *Salmonella* from Egg Albumen. *Applied Microbiology* 49:503-509.
- Hamada, K., Tsuji, H., Oshima, K. 2002. *Salmonella* serovar Montevideo involved in a food poisoning outbreak at a club for elderly persons in April 2002 in Hyogo Prefecture. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 55(5):176-177.
- Hammershøj, M., Nording, J., Rasmussen, H., Carsten, J., Pedersen, H. 2006. Dry-pasteurization of egg albumen powder in a fluidized bed. I. Effect on microbiology, physical and chemical parameters. *International Journal of Food Science and Technology* 41: 249–261
- Harada, T., Sakata, J., Kanki, M., Seto, K., Taguchi, M., Kumeda, Y. 2011. Molecular Epidemiological Investigation of a Diffuse Outbreak Caused by *Salmonella enterica*

- Serotype Montevideo Isolates in Osaka Prefecture, Japan. *Foodborne Pathogens and Disease*. 8(10): 1083-1088.
- He, Y., Dongjing, G., Yang, J., Tortorello, M.L., Zhang, W. 2011. Survival and Heat Resistance of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in Peanut Butter. *Applied Environmental Microbiology*.77(23): 8434–8438.
- He, Y., Li, Y., Salazar, J.K., Yang, J., Tortorello, M.L., Zhang, W. 2013. Increased water activity reduces the thermal resistance of *Salmonella enterica* in peanut butter. *Applied Environmental Microbiology* 79(15):4763-4767.
- Hedberg, C., David, M., White, K., MacDonald, K., Osterholm, M. 1993. Role of egg consumption in sporadic *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* infections in Minnesota. *Journal of Infectious Diseases*167: 107-111.
- Heilig, R., Perrin, F., Gannon, F., Mandel, J.L., Chambon, P. 1980. The ovalbumin gene family: structure of the X gene and evolution of duplicated split genes. *Cell* 20(3):625-637.
- Hendriksen, R. 2010. Global epidemiology of non-typhoidal *Salmonella* infections in humans. Tesis. Dirección URL: www.food.dtu.dk/.../DWSDownload.aspx?File...Global_epidemiology [Consulta: 16 mar. 2011].
- Hiramatsu, R., M. Matsumoto, K. Sakae, Miyazaki Y. 2005. Ability of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. to survive in a desiccation model system and in dry foods. *Applied Environmental Microbiology*. 71:6657-6663.
- Holt, D., Watson, M., Dill, C., Alford, E., Edwards, R., Diehl, K. 1984. Correlation of the rheological behavior of egg albumen to temperature, pH and NaCl concentration. *Journal of Food Science*, 49(1): 137–141.

- Hoppe, A. 2010. Examination of egg white proteins and effects of high pressure on select physical and functional properties. Tesis de maestría Universidad de Nebraska - Lincoln. Dirección URL: <http://digitalcommons.unl.edu/foodscidiss/7> [Consulta: 16 dic. 2012)
- Huevo.org.es. Formación del huevo. Dirección URL: www.huevo.org.es. [Consulta 29 ago. 2008].
- Humpherson, L., Adams, M., Anderson, W., Cole M. 1998. Biphasic Inactivation kinetics in *Salmonella* Enteritidis PT 4. Applied Environmental Microbiology 64:459-464
- Humphrey, T. 1994. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella enteritidis*: a review. International Journal of Food Microbiology 21:31-40.
- Humphrey, T., Richardson, K., Statton, M., Rowbury, M. 1993. Effects of temperature shift on acid and heat tolerance in *Salmonella* enteritidis phage type 4. Applied Environmental Microbiology 59: 3120-3120.
- Humphrey, T., Slater, E., McAlpine, K., Rowbury, R., Gilbert, R. 1995. *Salmonella* enteritidis phage type 4 isolates more tolerant of heat, acid, or hydrogen peroxide also survive longer on surfaces. Applied Environmental Microbiology 61: 3161-3164.
- Humphrey, T., Whitehead, A., Gawler, A., Henley, A., Rowe, B. (1991). Numbers of *Salmonella* Enteritidis in the contents of naturally contaminated hen's egg. Epidemiology and Infection 106:489-496.
- Huntington, J., Stein, P. E. 2001. Structure and properties of ovalbumin. Journal of Chromatography B, 756(1-2):189-198.
- ICMSF, 1985. Comisión Internacional de especificaciones microbiológicas para alimentos. Microorganismos de los

- alimentos. Vol. I. Técnicas de análisis microbiológico. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España: 169-180.
- Izurieta, W. P., Komitopoulou, E. 2012. Effect of moisture on *Salmonella* spp. heat resistance in cocoa and hazelnut shell. *Food Research International* 45:1087-1092.
- Janning, B., in'tVeld, P., Notermans, S., Kramer, J. 1994. Resistance of bacterial strains to dry conditions: use of anhydrous silica gel in a desiccation model system. *Journal Applied Bacteriology* 77:319-324.
- Jones, F., Richardson, K. 2004. *Salmonella* in commercially manufactured feeds. *Poultry Science* 83: 384–391.
- Jordan, J., Gurtler, J., Marks, H., Jones, D. 2009 Thermal Inactivation of *Salmonella* in Commercially-Processed Liquid Egg Yolk. American Society of Microbiology 109th General Meeting. Philadelphia, PA p.1. Dirección URL: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2012.1366?journalCode=fpd> [Consulta 10 de octubre de 2012].
- Joseph, B.; Otta, S.; Karunasagar, I., Karunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology* 64 (3): 367-372.
- Juneja, V., Eblen, B., Ransom, G. 2001. Thermal Inactivation of *Salmonella* spp. in Chicken Broth, Beef, Pork, Turkey, and Chicken: Determination of D- and z-values. *Journal of Food Science* 66 (1): 142-156.
- Juneja, V.K., Melendres, M.V., Huang, L., Gumudavelli, V., Subbia, J., Thippareddi, H. 2007. Modeling the effect of temperature on growth of *Salmonella* in chicken. *Food Microbiology* 24: 328–335.
- Jung, Y., Beuchat, L. 1999. Survival of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 in egg powders as affected

- by water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 49 (1-2):1–8.
- Kaewmanee, T., Benjakul, S., Visessanguan, W. 2011. Effect of NaCl on thermal aggregation of egg white proteins from duck egg. *Food Chemistry* 125: 706–712.
- Kaiser, M., Lamont S. 2001. Genetic line differences in survival and pathogen load in young layer chicks after *Salmonella enterica* serovar Enteritidis exposure. *Poultry Science* 80: 1105-1108.
- Kato, A., Hisham, R.I., Watanabe, H., Honma, K., and Kobayashi, K. 1989. New approach to improve gelling and surface functional properties of dried egg white by heating in dry state. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37(2): 433-437.
- Kato, A., Hisham, R.I., Watanabe, H., Honma, K., and Kobayashi, K. 1990. Structural and gelling properties of dry heated egg white proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38(1): 32-37.
- Keller, L., Benson, C., Krotec, K., Eckroade, R. 1995. *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infection and Immunity* 63: 2443–2449.
- Kieboom, J., Harshi K., Tempelaars, M., Hazeleger, W., Abee, T., Beumer, R. (2006). Survival, elongation, and elevated tolerance of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis at reduced water activity. *Journal of Food Protection* 69:2681-2686.
- Kim, J., Diao, J., Marion, W. Shepherd, Jr., Singh, R., Heringa, S., Gong, C., Jiang, X. 2012. *Applied Environmental Microbiology*.78(4): 1302–1307.

- Kinoshita K., Okamoto S., Shimogiri T., Kawabe K., Nishida T., Kakizawa R., Yamamoto Y., Maeda Y. 2002. Asian-Aust. Journal of Animal Science 15 (2) :157-165.
- Komitopoulou, E., Izurieta, P. W. 2009. Fate of *Salmonella* in dry confectionery raw materials. Journal of Applied Microbiology 106 (6): 1892–1900.
- Koyuncu, S., Andersson, M., Löfström, C., Panagiotis, N. Skandamis, P., Gounadaki, A., Jürgen Zentek, J., Häggblom, P. 2013. Organic acids for control of *Salmonella* in different feed materials. Veterinary Research 9:81. Dirección URL: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/9/81> [Consulta: 12 ago. 2013].
- Krapf, T., Gantenbein-Demarchi, C. 2010. Thermal inactivation of *Salmonella* spp. during conching. Food Science and Technology 43: 720–723.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Lagoudaki, M., Demertzis, P. 1993. Equilibrium moisture characteristics of dehydrated food constituents as studied by a modified inverse gas chromatographic method. Journal of the Science of Food and Agriculture 65 (1): 101-109.
- Lan R., Reeves P., Octavia S. 2009. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. Infection, Genetics and Evolution 9 (5):996-1005.
- Laroche, C., Fine, F., Gervais, P. 2004. Water activity affects heat resistance of microorganisms in food powders. International Journal of Food Microbiology 97(3):307– 315.
- Lasa, I. 2006. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. International Microbiology 9: 21-28.

- Lau, M. H., Tang, J., & Paulson, A. T. 2000. Texture proWle and turbidity of gellan/gelation mixed gels. *Food Research :International* 33: 665-671.
- Lechevalier V., Croguennec T., Nau F., Guérin-Dubiard C. 2007. Ovalbumin and Gene-Related Proteins. Bioactive egg compounds. Part I, Subpart Ib 51-60.
- Lechevalier, V., Perinel, E., Jeantet, R., Lesaffre, C., Croguennec, T., Guerin-Dubiard, C., Nau F. 2005. Statistical analysis of effects of industrial processing steps on functional properties of pasteurized liquid egg white. *Journal of Agriculture and Food Sciences* 85: 757-769.
- Lesne, J., Berthet, S., Binard, S., Rouxel, A., Humbert, F. 2000. Changes in culturability and virulence of *Salmonella* Typhimurium during long-term starvation under desiccating conditions. *Journal of Food Microbiology* 60 (2-3):195-203.
- Lienau, E., Strain, E., Wang, C., Zheng, J., Ottesen, A., Keys, C. Hammack, T., Musser, S., Brown, E., Allard, M., Cao, G., Meng, J., Stones, R. 2011. Identification of a salmonellosis outbreak by means of molecular sequencing. *New England Journal of Medicine* 364(10):981-982.
- Li, H., Bhaskara, A., Megalis, C., Tortorello, M. 2012. Transcriptomic analysis of *Salmonella* desiccation resistance. *Foodborne Pathogen and Diseases* 9, 1143–1151.
- Liu, J., Yu, Z., Zhao, W., Lin, S., Wang, E., Zhang, Y., Hao, H., Wang, Z., Chen, F. 2010. Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates. *Food Chemistry* 122(4):1159-1163.
- Ma L., Zhang, G., Gerner-Smidt, P., Mantripragada, V., Ezeoke, I., Doyle, M.P. 2009. Thermal inactivation of *Salmonella* in peanut butter. *Journal of Food Protection* 72:1596–160.

- Mackey, B., Derrick, C. 1987. Changes in the heat resistance of *Salmonella typhimurium* during heating at rising temperatures. *Letters in Applied Microbiology* 4 (1): 13–16.
- Mañas, P., Pagán, R., Raso, J., Condón, S. 2003. Predicting thermal inactivation in media of different pH of *Salmonella* grown at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 87: 45-53.
- Marcus, S., Brumell, J., Pfeifer C., Finlay B. 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbs and Infection* 2: 145-156.
- Martínez, A. 2007. Virulencia, Resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica*. Tesis doctoral. Dirección URL: www.tdr.cesca.es/TDR-1030107.../index_cs.html. [Consulta: 12 nov. 2010].
- Martínez, N.; Grau, A.; Chiralt Boix, A. y Fito Maupoey, P. 1998. Termodinámica y Cinética de Sistemas Alimento Entorno. Universidad Politécnica de Valencia. Servicio de Publicaciones:180-221
- Mathlouthi, M., Roge, B. 2003. Water vapour sorption isotherms and the caking of food powders. *Food Chemistry* 82(1): 61–71.
- Matsudomi, N., Takahashi, H., Miyata, T. 2001. Some structural properties of ovalbumin heated at 80° C in the dry state. *Food Research International* 34: 229–235.
- Mc Donough, F., Hargrove, R. 1968. Heat resistance of *Salmonella* in dried milk. *Journal of Dairy Science* 51:1587–1591.
- Mc Meechan, A., Roberts, M., Cogan, T., Jorgensen, F., Stevenson, A., Lewis, C., Rowley, G., Humphrey, T. 2007. Role of the alternative sigma factors σE and σS in survival

- of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium during starvation, refrigeration and osmotic shock. *Food Microbiology* 153(1):263-269.
- Messens, W., Dubocage, L., Grijspeerdt, K., Heyndrick, M., Herman, L. 2004. Growth of *Salmonella* serovars in hens' egg albumen as affected by storage prior to inoculation. *Food Microbiology* 21(1): 25–32.
- Messens, W., Grijspeerdt, K., Herman, L. 2006. Eggshell penetration of hen's eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis upon various storage conditions. *British Poultry Science* 47: 554–560.
- Miguel, M., Recio, I., Gómez-Ruiz, J.A., Ramos, M., López-Fandiño, R. 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection* 67(9):1914-920.
- Miguel, M., Alexandre, A. 2006. Anti hypertensive peptides derived from egg proteins. *Journal of Nutrition* 136(6): 1457-1460.
- Miguel, M., Manso, M., Alexandre, A., Alonso, M. J., Salaices, M., Lopez F. R. 2007. Vascular effects, angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity, and anti hypertensive properties of peptides derived from egg white. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(26): 10615-10621.
- Miller, M. Bassler, B. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55: 165-199.
- Mine, Y. 1995. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology* 6:225-232.

- Mine, Y., Yang, M. 2008. Recent advances in the understanding of egg allergens: Basic, industrial, and clinical perspectives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13):4874-4900.
- Mine, Y., Zhang, J. 2002. Comparative studies on antigenicity and allergenicity of native and denatured egg white proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(9):2679-2683.
- Mukhopadhyay, S., Tomasula, P., Luchansky, J., Porto-Fett, A., Call, J. 2010. Removal of *Salmonella* Enteritidis from commercial unpasteurized liquid egg white using pilot scale cross flow tangential microfiltration. *International Journal of Food Microbiology* 142:309–317
- Murase, T., Chiba, K., Sato, T., Otsuki, K., Holt, P. 2006. Effects of different molting procedures on incidence of *Salmonella* infection in flocks of naturally contaminated laying hens in a commercial egg-producing farm by detection of yolk antibodies to *Salmonella* in eggs. *Journal of Food Protection* 69: 2883-2888.
- Murchie, L.; Whyte, P.; Xia, B.; Horrigan, S.; Kelly, L.; Madden, R. 2007. Prevalence of *Salmonella* in Grade A Whole Shell Eggs in the Island of Ireland. *Journal of Food Protection* 70 (5):1238-1240.
- Murphy, R., Osaili T., Duncan L., Marcy J. 2004. Thermal Inactivation of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in Ground Chicken Thigh/Leg Meat and Skin. *Poultry Science* 83:1218–1225.
- Murray, B., Ettelaie, R. 2004. Foam stability: proteins and nanoparticles. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 9: 314–320.

- Nazar, J. 2009. Modelo del negocio productivo de huevo para consumo, el caso argentino. Memorias 1º Curso Situación actual de la cadena avícola y salud humana. Foro de la Alimentación, la nutrición y la salud. Capital Federal, Argentina, 29 de mayo de 2009.
- Németh, C., Dalmadi, I., Mráz, B., Friedrich, L., Pásztor-Huszár, K., Suhajda, A., Janzso, E., Balla C. 2011. Study of Long Term Post-Treatment of Whole Egg Powder at 50–55°C. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 61 (4) 239-243
- Neuhoff, V., Arold, N.; Taube, D., Ehrhardt, W. 1988. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. Electrophoresis 9: 255–262
- Okamura, M., Miyamoto, T., Kamijima, Y., Tani, H., Sasai, K., Baba, E. 2001. Differences in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in intravaginally inoculated hens and in vitro adherences to vaginal explants between *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* serovars. Avian Diseases 45: 962–971.
- Okamura, M., Sonobe, M., Obara, S., Kubo, T., Nagai, T., Noguchi, M., Takehara, K., Nakamura M. 2010. Potential egg contamination by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium definitive type 104 following experimental infection of pullets at the onset of lay. Poultry Science. 89(8):1629-34
- Osaili, T., Griffis, C. L., Martin, E. M., Beard, B. L., Keener, A., Marcy, J. A. 2006. Thermal inactivation studies of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken-fried beef patties. Journal of Food Protection 69:1080–1086.

- Oteiza, J.M., Giannuzzi, L., Califano, A. 2003. Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Escherichia coli* isolated from morcilla as affected by composition of the produc. Food Research International 36: 703–712
- Palumbo, M., Beers, S., Bhaduri, S., Palumbo, S.A. 1995. Thermal resistance of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in liquid egg yolk and egg yolk products. Journal of Food Protection 58: 960–966.
- Park, E. J., Oh, S.W., Kang, D. H. 2008. Fate of *Salmonella* Tennessee in peanut butter at 4 and 22 °C. Journal Food Science 73: 82–86
- Pasterán F., Galas M. 2008. “Manual de Procedimientos Sensibilidad a los antimicrobianos en *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*”. Centro Regional de Referencia WHO-Global Salm Surv para América del Sur, Dirección URL: <http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=xNRt alCtJR4%3D&tabid=120&mid=460&language=es-ES> [Consulta: 8 mar. 2008].
- Patel, M., Chen, S., Pringle, J., Russo, E., Viñaras, J., Weiss, J., Anderson, S., Sunenshine, R., Komatsu, K., Schumacher, M., Flood, D., Theobald, L., Bopp, C., Wannemuehler, K., White, P., Angulo, F., Behravesh, C. 2008. A prolonged outbreak of *Salmonella* Montevideo infections associated with multiple locations of a restaurant chain in Phoenix, Arizona, Journal of Food Protection 73(10):1858-1863.
- Patrick, M., Adcock, P., Gomez, M., Altekruise, B., Holland, H., Tauxe, R., Swerdlow, D. 2004. Salmonella enteritidis infections, United States, 1985–1999. Journal Emerging Infectious Diseases 10:1–7.
- Pellegrini, A., Hulsmeier, A.J., Hunziker, P., Thomas, U. 2004. Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity. Acta Biochimica et Biophysica 1672: 76–85.

- Pilosof, A., Bartholomai, G. 2000. Caracterización funcional y estructural de proteínas. Editorial Eudeba:17-93
- Pinheiro do Nascimento, V., Ruschel, Dos Santos L., Rodrigues, L., Landinez, M., Perdoncini, G., Borsoi, A. 2011. Epidemiología de la tifosis y paratífosis en Latinoamérica. Memorias del Congreso Latinoamericano de Avicultura.
- Pinto A., Mendonça A., Silva E. 2009 Isolated or associated experimental contamination of albumen and egg yolk for *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* – influence of temperature and storage time. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 61 (1):128-134
- Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D.G., Elliott, P.H., 2010. Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. Journal of Food Protection 73: 1919–1936.
- Ponce, E., Pla, R., Sendra, E., Guamis, B., Mor-Mur, M. 1999. Destruction of *Salmonella* enteritidis inoculated in liquid whole egg by high hydrostatic pressure: comparative study in selective and non-selective media. Food Microbiology 16(4): 357-365.
- Popoff, M.Y. 2001. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars 8ª Ed, WHO Centre for Reference and Research on Salmonella, Instituto Pasteur, París, Francia.
- Pouzot, M., Nicolai, T., Visschers, R., Weijers, M. 2005. X-Ray and light scattering study of the structure of large protein aggregates at different ionic strength. Food Hydrocolloids 19: 231-238
- Prost, E., Riemann, H. 1967. Food-Borne Salmonellosis. Annual Review of Microbiology 21: 495-528

- Pui, C., Wong, W., Chai, L., Tunung, R., Jeyaletchumi, P., Noor Hidayah, M., Ubong, A., Farinazleen, M., Cheah, Y., Son, R. (2011). *Salmonella*: A foodborne pathogen. *Journal International Food Research* 18: 465-473
- Quiros, A., Chichon, R., Recio, I., Lopez F. R. 2007. The use of high hydrostatic pressure to promote the proteolysis and release of bioactive peptides from ovalbumin. *Food Chemistry* 104(4): 1734-1739.
- Raikos, V., Hansen R., Campbell, L., Euston, S. 2006. Separation and Identification of Hen Egg Protein Isoforms using SDS-PAGE and 2D Gel Electrophoresis with MALDITOF Mass Spectrometry, *Food Chemistry* 99:702-710.
- Ricke, S. C. 2003. The gastrointestinal tract ecology of *Salmonella* Enteritidis colonization in molting hens. *Poultry Science*.82:1003–1007.
- Rincón, D., Ramirez, R., Vargas, J. 2011 Transmisión de *Salmonella enterica* a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. *Revista Universidad. Industrial Santander Salud* 43 (2): 167-177.
- Roy, I, Roa, M., Gupta, N. 2003. Purification of lysozyme from other hen's white proteins using metal-affinity precipitation. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 37: 9-14.
- Samelis, J., Ikeda, J., Sofos, J. 2003. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: A comparative study with *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology* 95, 563–575.

- Sandoval, V.E.; Terzolo, H.R.; Moreira, A.R.; Micheo, G.L.; Eigner, T.; Caffer, M.I.; Fronchowsky, B. 1989. Paratífosis aviaria causada por *Salmonella* serovar. Enteritidis en Argentina. *Revista Argentina de Producción Animal* 9 (4): 295-308.
- Schell, H. 2010. Información de la Actividad avícola en Entre Ríos. Secretaría de la Producción, Área avícola y Porcina de la Provincia de Entre Ríos, Argentina.
- Schoeni, J. 1994. Growth and penetration of *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Typhimurium in eggs *International Journal of Food Microbiology* 24 (3): 385-396.
- Seuss-Baum, I. 2007. Nutritional evaluation of egg compounds. In: Huopalahti, R., Lopez Fandiño R, Anton M., Rüdiger S. (Eds), *Bioactive Egg Compounds*. Berlin; New York: Springer: 117-140
- Shachar, D., Yaron, S. 2006. Heat tolerance of *Salmonella enterica* serovars Agona, Enteritidis and Typhimurium in peanut butter. *Journal of Food Protection* 69 (11):2687-2691
- Shah, D., Bradshaw, J., Peeler, J. 1991. Thermal resistance of egg-associated epidemic strains of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Food Science*, 56: 391–393
- Shah D., Casavant C., Hawley Q., Addwebi T., Call D., Guard-Petter J. 2012. *Salmonella* Enteritidis strains from poultry exhibit differential responses to acid stress, oxidative stress, and survival in the egg albumen. *Foodborne Pathogens Diseases* 9:258–264.
- Shirota, K., Katoh, H., Murasa, T., Ho, T., Otsuki, K. 2001. Monitoring of Layer Feed and Eggs for *Salmonella* in Eastern Japan 1993 and 1998. *Journal of Food Protection* 64 (5):734-737

- Shivaprasad, H., Timoney, J., Morales, S., Lucio, B., Baker, R. 1990. Pathogenesis of *Salmonella* Enteritidis infection in laying hens. I. Studies on egg transmission, clinical signs, fecal shedding, and serological responses. *Avian Diseases* 34: 548–557.
- Silva F., Gibbs P. 2012. Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in foods. *Food Research International* 45:695–699
- Silva G., Lopez H. 2012. Genes involucrados en la patogénesis, persistencia y excreción de *Salmonella* en modelos animals. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 25 (1): 107-122
- Skandamis, P. N.; Nychas, G. J.E. 2012. Quorum Sensing in the Context of Food Microbiology Applied and environmental microbiology 78: 5473-5482
- Smith, E., Maurer J., Orta-Ramirez, A., Ryser, E., Smith, D. 2001. Thermal Inactivation of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhimurium DT104, and *Escherichia coli* O157:H7 in Ground Beef. *Journal of Food Science* 66 (8): 1164–1168
- Song, H. P., Kim, B., Choe, J. H., Jung, S., Kim, K. S., Kim, D.H., Jo, C. 2009. Improvement of foaming ability of egg white product by irradiation and its application. *Radiation Physics and Chemistry* 78: 217–221.
- Soria C. 2013. Salmonelas y aflatoxinas en granjas de gallinas ponedoras comerciales. Tesis doctoral. Dirección URL: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/26201/Documento_completo.pdf?sequence=1 [Consulta: 12 julio 2013].
- Spector M., Kenyon W. 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International* 45: 455–481

- Stein, P., Leslie, A., Finch, J., Carrell, R. 1991. Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 221: 941-959.
- Stöcker, P., Rosner, B., Werber, D., Kirchner, M., Reinecke, A., Wichmann-Schauer, H., Prager, R., Rabsch, W. 2011. Outbreak of *Salmonella* Montevideo associated with a dietary food supplement flagged in the Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) in Germany, 2010. *Euro Surveill.* 16(50) Dirección URL: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20040> [Consulta: 23 de febrero de 2013].
- Suresh, T., Hatha, A. A. M., Sreenivasan, D., Sangeetha, N. Lashamanaperumalsamy, P. 2006. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella Enteritidis* and other *Salmonella* in the eggs and egg-storing trays from retail markets of Coimbatore, South India. *Food Microbiology* 23:294-299.
- Tan, T., Kanyarat, K., Azhar, M. 2012. Evaluation of functional properties of egg white obtained from pasteurized shell egg as ingredient in angel food cake. *Journal International Food Research* 19(1):303-308.
- Terzolo, H. 2011. Estudio bacteriológico de las Salmonelosis Aviares (*S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. Enteritidis*, y *S. typhimurium*) en América Latina. Seminario Internacional sobre Salmonelosis aviar. Dirección URL: <http://www.abef.com.br/seminario/014.pdf> [Consulta: 12 ene. 2012].
- Timmermann, E.; Chirife, J.; Iglesias, H. 2001. Water sorption isotherms of foods and foodstuffs: BET or GAB parameters? *Journal of Food Engineering* 48: 19-31
- Totosaus, A., Montejano, J., Salazar, J., Guerrero, I. 2002. A review of physical and chemical protein-gel induction.

- International Journal of Food Science and Technology 37(6):589-601
- Uesugi, A. R., Danyluk, M. D., Harris, L. J. 2006. Survival of *Salmonella* Enteritidis phage type 30 on inoculated almonds stored at -20, 4, 23, and 35 °C. Journal of Food Protection, 69(8): 1851-1857.
- USDA-FSIS 1999. Performance standards for the production of certain meat and poultry products. Food Safety and Inspection Service, US Department of Agriculture, 9 CFR, Part 30. Fed. Regist. §64.3:732-749.
- Van der Plancken, I., Van Loey, A., Hendrickx, M. E. 2007. Foaming properties of egg white proteins affected by heat or high pressure treatment. Journal of Food Engineering 78(4): 1410-1426.
- Van Immerseel, F. 2010. Stress-induced survival strategies enable *Salmonella* Enteritidis to persistently colonize the chicken oviduct tissue and cope with antimicrobial factors in egg white: A hypothesis to explain a pandemic. Gut Pathogens 20;2(1):23.
- Viora, S.; Anselmo, R.; Barrios, H., De Franceschi, M. 1993. *Salmonella* Enteritidis en maples. Rev. Med. Vet. (Bs. As.) 74 (2): 96-99
- Wales, A., Davies, R. 2012. A critical review of *Salmonella* Typhimurium infection in laying hens. Avian Pathology 40(5):429-436.
- Wagner, J. R. 2000. Propiedades superficiales. En: Pilosof, A. M. R.; Bartholomai, G. Caracterización funcional y estructural de proteínas. Buenos Aires: Eudeba: 41-70.
- Waterman, S.R. and Small, P.L.C., 1998. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain

- solid food sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3882-3886.
- Waters, C., Bassler, B. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Review of Cell and Developmental Biology* 21:319-346.
- Weijers, M. 2005. Aggregate Morphology And Network Properties Of Ovalbumin. Tesis doctoral. Universidad de Wageningen, Netherlands. Dirección URL: <http://edepot.wur.nl/121625>. [Consulta: 12 nov. 2011].
- Wesche, A.M., Gurtler, J.B., Marks, B.P., Ryser, E.T. 2009. Stress, sublethal injury, resuscitation, and virulence of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection* 72: 1121–1138.
- Winiarska, M., Kwiecień, M. 2007. Avian egg's white ovomucoid as food-allergen for human. *Postepy Biochemistry* 53 (3):212-217.
- Wu, V. 2008. A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology* 25: 735–744
- Yuk, H.G., Schneider, K.R. 2006. Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerated and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. *Food Microbiology* 23: 694-700.

ANEXO I

Comparación de suplementos y medios selectivos para la recuperación de bacterias injuriadas

Para iniciar los estudios de resistencia térmica se consideró significativo analizar medios selectivos y suplementos adecuados para incorporar a un medio sólido no selectivo, como el agar tripteína de soja, ya que se conoce que la esterilización de los medios de cultivo estimula la autooxidación de compuestos tales como azúcares y fosfatos que forman especies reactivas de oxígeno y reducen la recuperación de células dañadas. Por otra parte, la albúmina de huevo posee compuestos antimicrobianos que podrían inhibir el crecimiento de *Salmonella*.

El trabajo experimental consistió en recuperar un inóculo mixto constituido por 7 cepas de los tres serotipos: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Montevideo*. Para ello, iguales alícuotas de cada inóculo simple en fase estacionaria de crecimiento fueron transferidos a un tubo con agua peptona, volumen final 9,9 ml. La concentración del inóculo se ajustó a aproximadamente 10 log UFC/ml utilizando un espectrofotómetro Biochrom Libra S22 UV-Vis, simple haz (Inglaterra) a una densidad óptica de 0,6.

Este inóculo mixto se dispersó por atomización en albúmina de huevo deshidratada, y posteriormente se secó en estufa a 50°C por 30 minutos. Finalizado este tiempo se realizó un recuento en ATS realizando diluciones decimales. Se comenzó con 1 g de muestra en 9 ml de agua peptonada 0,1%.

Posteriormente se cargaron veinticuatro tubos capilares estériles con 25 µg de albúmina de huevo inoculada, se sellaron y se sumergieron totalmente en un termostato de inmersión marca Julabo (Alemania) con estabilidad de temperatura $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$ a 82°C.

A los 30 minutos se retiraron los tubos capilares del baño térmico y se enfriaron en hielo. Los capilares se limpiaron con alcohol 96° y se rompieron asépticamente en un solo extremo, volcando el contenido en un tubo de ensayo conteniendo 225 µl de agua peptonada 0,1%. Seguidamente, se homogenizó exhaustivamente mediante vórtex y se realizaron diluciones seriadas (1:10). Para realizar la segunda dilución se tomaron 100 µl y se llevaron a 900 µl de diluyente mientras que para hacer las restantes se tomaron 0,5 ml que se colocaron en 4,5 ml de agua peptonada 0,1%.

Posteriormente se inocularon 6 placas en superficie de placas de Petri conteniendo cada uno de los medios de cultivo indicados en la Tabla 1, con 100 µl de la dilución 1/10 a 1/10000 de la muestra. Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C.

Tabla 1. Formulación de medios con suplementos utilizados para recuperar las cepas estudiadas

Medio o suplemento adicionado al medio	pH	Marca	Concentración del suplemento por litro de medio	Descripción del suplemento
Agar Tripteína Soya	7,40	Oxoid	-	-
ATS + extracto de levadura	7,41	Britania	6,000 g	Extracto de levadura
ATS + piruvato de Sodio (Pna)	7,30	Sigma	1,000 g	Na piruvato
ATS + sulfato ferroso (SO₄Fe)	7,40		0,035 g	FeSO ₄
Agar Verde Brillante	7,12	Oxoid	-	VB
Agar Xilosa lisina desoxicolato	7,30	Oxoid	-	XLD

Las células desarrolladas se identificaron por subcultivo en placas conteniendo AVB y posterior confirmación en agar TSI y agar lisina hierro. Los recuentos se expresaron en log₁₀ UFC/g.

El recuento inicial en albúmina de huevo, antes del calentamiento, y en ATS adicionado con 0,6% de EL fue de 8,11 log₁₀ UFC/g. Los recuentos después del tratamiento térmico se presentan en la Figura 1.

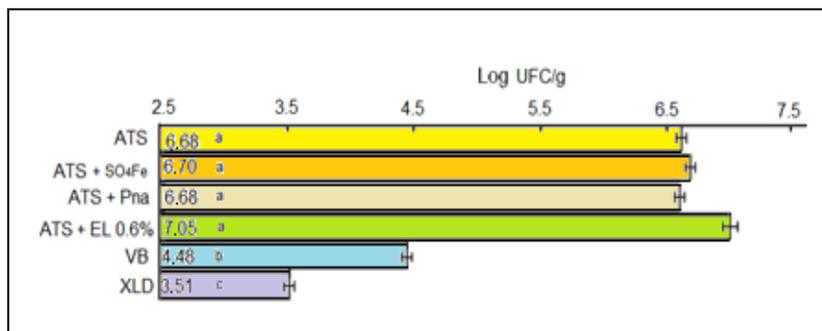


Figura 1. Recuentos de poblaciones obtenidos en los diferentes medios de cultivo

Valores medios establecidos con diferentes letras, para los recuentos, indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

La inactivación promedio de las células de *Salmonella* en ATS adicionado con 0,6% de EL, fue de 1,06 log₁₀ UFC/g y se determinó comparando los recuentos de células antes del tratamiento térmico (8,11 log₁₀ UCF/g) con los recuentos después del tratamiento en ATS adicionada con 0,6% de EL (7,05 log₁₀ UFC/g).

El logaritmo de las células injuriadas se calculó como la diferencia en log₁₀ UFC/g de los recuentos en ATS adicionado

con 0,6% de EL y los demás medios ensayados: ATS (0,34 log₁₀ UFC/g); ATS adicionado de FeSO₄ (0,35 log₁₀ UFC/g); ATS adicionado de piruvato de sodio (0,36 log₁₀ UFC/g); VB (2,58 log₁₀ UFC/g); XLD (3,45 log₁₀ UFC/g).

Los medios selectivos, en este estudio, recuperaron el 63,54% y el 49,78% de las células injuriadas por lo que no se consideraron adecuados para los estudios térmicos.

Se concluyó que cualquiera de los suplementos incorporados al ATS resultaba adecuado para los estudios de resistencia a temperatura. En este trabajo se eligió el ATS adicionado con 0,6% de EL, dado que fue el que mostró la mayor recuperación de células injuriadas.