

300627 9  
24



# UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA

Incorporada a la U. N. A. M.

FUNDAMENTOS TEORICOS Y METODOS OPERATIVOS  
PARA LA DETERMINACION Y COMPROBACION DE  
LA ESTERILIZACION COMERCIAL EN ALIMENTOS  
ENLATADOS DE ACIDEZ BAJA, POR MEDIO DE  
PRUEBAS CON ESPORAS P. A. 3679

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE;  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A

**MARIA DE LOURDES GONZALEZ-MENDEZ NAVARRETE**

MEXICO, D. F.

1966



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**"FUNDAMENTOS TEORICOS Y METODOS OPERATIVOS PARA LA DETERMINACION Y COMPROBACION  
DE LA ESTERILIZACION COMERCIAL EN ALIMENTOS ENLATADOS DE ACIDEZ BAJA,  
POR MEDIO DE PRUEBAS CON ESPORAS P.A.3679"**

**C O N T E N I D O**

	<u><b>Página</b></u>
-OBJETIVOS	1
-INTRODUCCION	1
CAPITULO 1. GENERALIDADES	6
I. MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS ENLATADOS	6
1. Organismos de mayor importancia en el deterioro de alimentos	6
2. Factores que afectan al procesamiento térmico para obtener estabilidad en el producto	6
3. Consideraciones básicas en los valores de pH	7
4. Influencia del pH en la microbiología y deterioro de alimentos	7
5. Clasificación de los alimentos con respecto a su acidez	8
6. Clasificación de microorganismos de acuerdo con la temperatura	10
1) Psicrófilos	10
2) Mesófilos	11
3) Termófilos	11
7. Clasificación de bacterias formadoras de esporas con referencia al requerimiento de oxígeno	11
A) Aerobios Obligados	11
B) Anaerobios Facultativos	12
C) Anaerobios Obligados	12
II. RESISTENCIA TERMICA DE LOS MICROORGANISMOS	14
1. Factores que influyen en el crecimiento de los microorganismos	14
- Requerimientos alimenticios	14
- Requerimientos de humedad	15
- Sustancias químicas	15
- Temperatura	15
2. Causas de muerte por calentamiento	16
A) Desnaturalización de proteínas por calor	16
B) Intoxicación	16
C) Cambios en lípidos esenciales	16
3. Efecto del calor en las esporas bacterianas	17
4. Factores que modifican la termoresistencia de las esporas	17
1) Naturaleza del producto	17
2) pH	17
3) Presencia de NaCl y otras sales	17
4) Presencia de azúcares	17
5) Grasas y aceites	17
6) Concentración	18
7) Factores Externos	18
5. Mecanismo de destrucción térmica	18
6. Leyes exponenciales de destrucción	18
III. LA ESTERILIDAD EN ALIMENTOS ENLATADOS	21
1. Esterilidad "Comercial"	22
2. Microorganismos de interés en la esterilización	24
3. Factores que modifican la penetración de calor	25
1) Naturaleza del envase	25
2) Tamaño y forma del envase	25
3) Consistencia del producto sólido	25

	<u>Página</u>
4) Concentración de los líquidos de gobierno y características de los mismos	26
5) Agitación del envase	26
4. Diferentes formas de contaminación en alimentos de baja acidez enlatados	26
A) Contaminación incipiente	26
B) Contaminación por Bajo Procesamiento	27
C) Contaminación por perforaciones en el contenedor, o por un cierre defectuoso ("Leakage")	27
D) Contaminación termoflítica	27
1. Acidez plana ("Flat Sour")	28
2. Termoflitos anaerobios	28
3. Con pestilencia a azufre	28
E) Contaminación por tratamiento térmico insuficiente	28
5. Botulismo	29
IV. TÉCNICAS DE OPERACION PARA DETERMINAR LA RESISTENCIA TERMICA DE MICROORGANISMOS	31
1. Técnicas operativas	31
A) Técnica de tubos TDT ("Tiempo de Muerte Térmica")	31
B) Técnica de latas TDT	34
C) Técnica de la cámara (Tank)	34
D) Termorresistómetro	34
2. Trazado de la gráfica de destrucción térmica	36
3. Cálculo del tiempo de destrucción térmica	38
4. Penetración de calor en el envase	40
A) Mecanismos de penetración de calor	40
B) Medida de la penetración de calor	41
C) Trazado de la gráfica de penetración de calor	42
5. Métodos de cálculo del tiempo de esterilización	45
1) Método General o Gráfico	46
2) Método de las Fórmulas	51
 CAPITULO 2. MATERIAL Y METODOS	 52
 CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSION	 60
1. Prueba de penetración de calor	60
2. Paquete Experimental Inoculado	60
3. Prueba Microbiológica	61
4. Tablas y Gráficas	64
 CAPITULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	 88
- Gráficas anexas	91
 CAPITULO 5. BIBLIOGRAFIA	 109

## INDICE DE FIGURAS

	<u>Página</u>
1. Intervalos de temperaturas	11
2. Esquema de un autoclave para la medida del tiempo de destrucción térmica	33
3. Esquema del tanque utilizado para medir el tiempo de destrucción térmica	35
4. Gráfica de destrucción térmica (TDT)	37
5. Cálculo matemático de t	39
6. Transmisión de calor	40
7. Colocación del pirómetro para la medida de penetración de calor	42
8. Gráfica de penetración de calor	43
9. Cálculo de la temperatura pseudo inicial	44
10. Curva de letalidad	47

## INDICE DE TABLAS

	<u>Página</u>
1. Valores de pH de algunos alimentos	9
2. Número de bacterias residuales	20
3. Tasa de letalidad	48
4. Valores de $F_0$ para diversas temperaturas de retorta	50

OBJETIVOS.-

Los objetivos fundamentales son:

- 1.- Determinar los procesos de esterilización para poder establecer un factor  $f$  de letalidad con el fin de obtener un producto comercialmente estéril y con el mínimo de daños hasta tener una mejor calidad en el producto final.
- 2.- Estudiar el comportamiento de la penetración de calor en diferentes presentaciones del mismo producto para ver qué diferencias se pueden presentar.
- 3.- Comprobar la optimización en el proceso de esterilización comercial para mejorar la calidad del producto enlatado y reducir los tiempos totales de autoclave.

## INTRODUCCION

Desde los primeros tiempos, el hombre ha sentido la necesidad de alargar el período de conservación de los alimentos perecederos, en condiciones adecuadas para el consumo. Han sido muy numerosos los procedimientos utilizados con este fin y de ellos, uno de los más extendidos es la aplicación de calor a productos envasados en recipientes herméticos.

A finales del siglo XVIII un confitero francés, Nicolás Appert - (1749-1841), establece las bases rudimentarias de lo que hoy se conoce genéricamente como Industria Conservera. Hijo de hosteleros, cocinero de profesión y desprovisto de conocimientos científicos, obsesionado por la idea de conservar los alimentos con su sabor original durante largo tiempo, logra, gracias a su tesón y, sin duda alguna, a una feliz idea, dar con el procedimiento que buscaba.

En el procedimiento Appert, naturalmente primitivo e imperfecto ("colocar alimentos en botellas bien cerradas, someterlas a Baño María y retirarlas después de un cierto tiempo")<sup>1</sup>, los defectos principales eran: la dificultad de cerrar las botellas herméticamente, su gran fragilidad, los tiempos de cocción excesivamente largos y la gran proporción de frascos alterados por causas desconocidas. Durante la primera mitad del siglo XIX estos defectos se van solucionando en forma empírica: en 1810, Peter Durand introduce en Inglaterra los envases metálicos, precursores de los actuales botes de hojalata; el empleo en el baño de soluciones salinas, en vez de agua, permite acortar los tiempos de cocción. La introducción de las marmitas cerradas para la cocción a presión es un nuevo e importante avance. En 1851, Chevalier Appert incorpora a estas marmitas un manómetro y un termómetro para el control de la presión y la temperatura, disminuyendo, en gran parte, lo peligroso de su utilización.

En la segunda mitad del siglo XIX, (1860) Pasteur demuestra la existencia de microorganismos capaces de producir fermentación y putrefacción. Este descubrimiento es la base sobre la que se desarrolla científicamente la conservación de alimentos por el calor.

Cuando comenzaron a contaminarse los alimentos, fué por causa de un incremento arbitrario en el proceso de hervir agua. Los resultados de este método no científico de procesamiento de alimentos enlatados fueron bien expresados en un razonamiento de una oración de un enlatador: "A veces se mantienen y a veces no."<sup>2</sup>

En 1874, un enlatador de Baltimore, Maryland, Mr. A. K. Shriver, inventó el sistema de retorta, usando vapor bajo presión para perfeccionar el procesamiento de alimentos a altas temperaturas. Este fué el principio de la era del procesamiento científico.

En 1895, el profesor H. L. Russell publica un informe sobre "Fermentación gaseosa en la industria conservera", que puede considerarse como el primer documento escrito sobre la aplicación de la bacteriología a la industria de la conserva<sup>3</sup>. En esta época, S. C. Prescott y W. L. Underwood, realizan gran cantidad de estudios sobre microbiología de las conservas, que culminan con los trabajos de Stumbo, Bigelow y Olin Ball que, a principios del siglo XX, establecen métodos científicos para el cálculo de las condiciones de esterilización, adecuadas a cada producto.

La esterilización por calor de los alimentos contenidos en envases herméticos, es la operación fundamental de la fabricación de conservas, y su finalidad es la destrucción térmica de los microorganismos que pueden alterar el producto o que son tóxicos. Desafortunadamente al aplicar calor suficiente para destruir microorganismos contaminantes del alimento y enzimas, -- también resultan algunos cambios indeseables en los alimentos. Cualquier descomposición del producto sería fatal en los alimentos procesados. Los procesos térmicos generalmente influyen en la calidad organoléptica del alimento.<sup>4,5,6,7</sup> Hay pérdida de calidad que puede ocurrir mientras dura el proceso de enlatado, por lo que se deben tomar en cuenta tanto tiempo como temperatura así como -- los diferentes procesos previos al enlatado (blanqueado, escaldado, etc.), deben realizarse con sumo cuidado.

El valor de esterilidad de un proceso térmico para alimentos de baja acidez es comúnmente expresado en valores F., siendo F. el número de minutos requerido para destruir un número específico de esporas a 250°F (121°C)

cuando  $z=18$  (NCA, 1968)<sup>8</sup>, donde  $z$  es el número de grados Fahrenheit requerido para que la curva de tiempo de muerte térmica atraviese un ciclo logarítmico.

Los valores  $F_0$  necesarios para medir la reducción arbitraria de esporas de Clostridium botulinum en varios tipos de productos alimenticios en distintos tamaños de lata y los valores  $F_0$  más altos necesarios para medir la destrucción promedio de cargas iniciales de organismos más termorresistentes de no significancia para la salud capaces de crecer bajo condiciones normales de almacenamiento, han sido compiladas por laboratorios asociados con la industria enlatadora.

La determinación de valores de  $F_0$  para la salud pública y los valores de  $F_0$  para la esterilidad comercial han sido complementados por medio de paquetes experimentales inoculados, estudios de tiempo de muerte térmica, análisis de la formulación del producto y experiencia pasada. Los procesos que resultan de valores específicos de esterilidad han sido establecidos por paquetes experimentales<sup>9</sup>.

La preparación de un paquete experimental inoculado es el paso final para checar un proceso desarrollado por estudios sobre penetración de calor y tiempo de muerte térmica. Estos paquetes inoculados son especialmente deseables al checar procesos calculados por productos empacados al vacío. Algunas veces es necesario hacer un paquete experimental sin medidas previas de la penetración de calor, pero en este caso es más difícil estimar los tipos de procesos que serán usados. Los paquetes experimentales inoculados se usan también al comparar métodos de procesamiento.

Un paquete de este tipo debe hacerse antes de empezar con cualquier línea de proceso para producir un producto nuevo del cual se tienen datos insuficientes acerca del procesamiento. A la formulación del producto, se le agrega un número conocido de esporas bacterianas a las cuales se les de terminó previamente la resistencia térmica en el producto específico, y posteriormente el producto se procesa térmicamente a diferentes tiempos y/o temperaturas para así obtener mejores valores de procesamiento térmico. De los resultados obtenidos en combinación con los datos de penetración de calor puede estimarse el procesamiento más seguro y efectivo.

Las esporas que comúnmente se emplean en este tipo de estudios - son las obtenidas del anaerobio putrefactivo, Clostridium sporogenes conocido como P.A.3679. Este microorganismo posee características muy similares a las del Clostridium botulinum a excepción de que no produce toxina.

Las pruebas de esterilidad son utilizadas para asistir en la determinación de la eficacia de un proceso térmico y en el asesoramiento de la sanidad de los contenedores. De esta manera, es extremadamente importante el establecer una técnica confiable para excluir la contaminación de cualquier tipo durante la operación de subcultivo.

La incidencia de contaminación durante las pruebas de esterilidad en alimentos ha sido reconocida y documentada: Williams and Clark (1942)<sup>10</sup>, hicieron un estudio de la importancia que tienen los controles en la prueba de esterilidad en salmón enlatado; Denny (1970)<sup>11</sup> encontró, en un estudio colaborativo de un producto estéril por nueve laboratorios, que 7.1% de las pruebas resultaron contaminadas durante el proceso de subcultivo. En un estudio subsecuente, Denny (1972)<sup>12</sup> reportó un 20% de contaminación cuando solamente un mínimo de precauciones fueron tomadas.

En la industria, no se pretende conseguir que el producto envasado sea totalmente estéril, principalmente porque sería necesario un tratamiento térmico excesivo que daría lugar a un producto de baja calidad organoléptica y escaso valor nutritivo.

El uso de termopares se introdujo en 1920 para medir las temperaturas durante el calentamiento y enfriamiento de alimentos en contenedores sellados. Esto dio paso a los procedimientos gráfico, matemático y computarizado que se emplean para estimar el mínimo calor requerido para producir "esterilidad comercial" en el alimento sin dañar excesivamente a su calidad o valor nutricional. El tipo de proceso de Alta Temperatura por Corto Tiempo (HTST) - es muy útil para procesar alimentos que se dañan fácilmente por el calor.

Del compromiso entre la necesidad de destruir las bacterias alterantes o tóxicas y la conveniencia de conservar al máximo las características del producto fresco, nace la llamada esterilización comercial, que constituye la técnica correcta de fabricación de conservas.

Actualmente pueden calcularse con precisión las condiciones de es

terilización óptimas, de forma que los envases así tratados, almacenados en condiciones normales, no se alteren ni representen peligro alguno para la salud del consumidor.

En este estudio se describen los fundamentos teóricos y los métodos operativos para determinar la resistencia térmica de los microorganismos y la penetración de calor en los envases así como los métodos de cálculo para el establecimiento del tiempo de esterilización óptima.

## CAPITULO 1. GENERALIDADES

### I. MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS ENLATADOS.

#### 1. ORGANISMOS DE MAYOR IMPORTANCIA EN EL DETERIORO DE ALIMENTOS ENLATADOS.

El objetivo principal del enlatado, es el de preservar los alimentos de manera que puedan ser consumidos con seguridad en fecha posterior - sin haberlos mantenido en condiciones de refrigeración. La contaminación microbiana de alimentos enlatados termoprocesados es causada por microorganismos que sobreviven a los procesos térmicos o que ganan entrada a través de un cierre defectuoso o de alguna perforación de la lata subsecuente al procesamiento térmico. Es virtualmente imposible el predecir qué tipos de microorganismos pudieran ganar entrada a través de este tipo de defectos del contenedor. Sin embargo, hay medidas importantes para minimizar este tipo de contaminación.

Desde el punto de vista del establecimiento de procesos de esterilización, las bacterias formadoras de esporas, excepto en productos de alta acidez, son los organismos de mayor importancia. Por la clase de contaminación microbiana, así como por la termorresistencia de las bacterias, está estrechamente relacionado con la acidez de los alimentos<sup>13</sup>. Si una célula bacteriana contaminante del alimento está en crecimiento activo, puede ser destruída por medio de calor a la temperatura de ebullición del agua por sólo unos minutos. Algunas bacterias pueden incluso existir en estado latente, en forma de esporas. Estas esporas son muy termorresistentes, y dependiendo de la acidez del alimento, pueden requerir temperaturas arriba del punto de ebullición del agua por periodos significativos de tiempo antes de que sean destruídas. Esto nos puede llevar a la relación de que mientras más alta sea la temperatura sobre el punto de ebullición, menor será el tiempo requerido para destruir a las esporas.

#### 2. FACTORES QUE AFECTAN AL PROCESAMIENTO TERMICO PARA OBTENER ESTABILIDAD EN EL PRODUCTO.

El procesamiento térmico de alimentos enlatados depende de mu--

chos factores asociados con el tipo de producto, su pH, consistencia, el tamaño del contenedor (lata), y el tipo de cocedor<sup>14,15</sup>. El factor más importante que determina el grado de procesamiento térmico para obtener estabilidad en el producto, es el pH, por el efecto inhibitorio de la acidez en los microorganismos sobrevivientes y en el crecimiento de microorganismos inactivos<sup>16,17</sup>. El pH es un factor importante que influye en la actividad y en la termorresistencia de enzimas y microorganismos en los alimentos<sup>18</sup>.

### 3. CONSIDERACIONES BASICAS EN LOS VALORES DE pH.

Una de las propiedades más importantes asociadas con la química de los alimentos y con el deterioro microbiológico de los mismos es la intensidad de acidez, o el pH del producto. Este factor de intensidad, o valor de pH, no debe confundirse con la cantidad de ácido presente en el alimento. Para relacionar esta intensidad de acidez en simples términos numéricos, se desarrolló una notación matemática y se le nombró la "escala de pH"<sup>19</sup>. Esta escala va del 0 al 14. El punto neutral al cual una sustancia no es ácida ni básica es a pH 7.0. Los valores más pequeños de pH denotan grandes intensidades de acidez y los números mayores denotan las intensidades menos ácidas o las intensidades básicas.

El pH de los alimentos depende, como ya se expuso, de muchos factores, algunos de los cuales son la madurez del producto, la variedad, y condiciones de crecimiento. Por estas razones, el pH del alimento usualmente está dentro de la clasificación de valores.

### 4. INFLUENCIA DEL pH EN LA MICROBIOLOGIA Y DETERIORO DE ALIMENTOS.

Diferentes especies de microorganismos se caracterizan por un valor específico de pH para su crecimiento óptimo. Otras características físicas y químicas del alimento son también factores que afectan al crecimiento de bacterias, levaduras y mohos.

Un efecto importante del pH es su influencia en la termorresis

tencia bacteriana. Mientras menor sea el valor del pH (o sea, a mayor intensidad de acidez), menor será la termorresistencia de bacterias y de esporas bacterianas a una temperatura dada. Cuando hay diversas especies de bacterias, levaduras y mohos en un alimento, el valor del pH de este alimento es uno de los factores más importantes que determina cuáles de esos tipos de microorganismos se multiplicarán más rápidamente; y dentro de los tipos, las esporas -- que prevalecerán. Esta característica del pH es importante para las fermentaciones industriales y para las consideraciones de alimentos contaminados.

##### 5. CLASIFICACION DE LOS ALIMENTOS CON RESPECTO A SU ACIDEZ.

Existen tres clases de alimentos según su pH:

1. alimentos de baja acidez: pH arriba de 4.5
2. alimentos ácidos: pH de 4.0 a 4.5
3. alimentos de alta acidez: pH abajo de 4.0

La línea divisoria entre los alimentos de baja acidez y los alimentos ácidos se ha tomado como 4.5 porque algunas clases de Clostridium botulinum pueden crecer y producir toxina a valores de pH tan bajos como 4.6<sup>20</sup>. Algunos de los anaerobios sacarolíticos más termorresistentes (Clostridium -- thermosaccharolyticum) crecen y causan deterioro en alimentos en este rango -- semi-ácido. Por esto, hasta que se haya sabido más acerca de la termorresistencia bacteriana y del crecimiento bacteriano en alimentos semi-ácidos, éstos quizás deberían permanecer en el grupo de baja acidez<sup>21</sup>.

Ver tabla anexa de valores de pH de algunos alimentos.

T A B L A 1.

VALORES DE pH DE ALGUNOS ALIMENTOS<sup>22,23</sup>

<u>pH</u>	<u>Alimento</u>	<u>pH</u>	<u>Alimento</u>
2.2-2.4	Limón, Jugo de Lima	4.4	Cebolla
2.2-2.6	Jugo de Limón	4.7-4.8	Queso Roquefort, Pi mientos
2.4-3.4	Vinagre	4.6	Ravioles
2.5-3.0	Pepinillos dulces	4.8-5.5	Frijoles, Espinacas
2.8-3.0	Ciuelas	4.9-5.0	Higos
2.9-3.3	Ruibarbo, Sidra	5.0-6.0	Pan blanco
2.9-3.4	Jugo de Toronja	5.0-5.3	Calabazas
2.9-3.7	Frambuesas	5.2-5.3	Queso Parmesano
3.0-3.5	Toronja en trozos	5.2-6.0	Brócoli
3.2-4.0	Piña en trozos	5.2-5.8	Jugo de Zanahoria
3.3-3.5	Jugo de Manzana	5.3-5.6	Zanahorias
3.4	Cerezas, Manzanas	5.6-6.5	Chfcharos
3.5	Col Agria	5.9-6.3	Leche Evaporada
3.5-4.5	Uvas	6.0-6.1	Pato
3.6-4.0	Cocktail de Frutas	6.0-6.5	Champiñones
3.7	Duraznos, Jugo de Naranja	6.1-6.8	Elotes
3.8	Chabacanos	6.2-6.4	Pollo, Dátiles
3.9-4.4	Jugo de Tomate	6.3-6.7	Ostiones
4.2	Peras	6.4-6.8	Leche de Vaca
4.3	Tomates	7.0	Maíz machacado

La acidez específica de un alimento (en términos de su pH) es extremadamente importante. Muchos de los microorganismos productores de deterio ro y contaminación pueden crecer en el rango de acidez entre pH 4.6 y 7.0, incluyendo al productor de toxina Clostridium botulinum<sup>24</sup>. Los alimentos que --

tengan un pH en este rango deben ser procesados en un enlatador a presión a -- temperaturas significativamente arriba del punto de ebullición del agua.

Los alimentos enlatados de mayor acidez (pH menor a 4.6) son lo - suficientemente ácidos para inhibir el crecimiento de Clostridium botulinum y la mayoría de las demás bacterias formadoras de esporas. Por esto, estos alimentos (llamados de "alta acidez") pueden preservarse utilizando un menor tratamiento térmico que el utilizado para los alimentos de baja acidez. Esto es, que no requieren enlatado a presión.

Un incremento concurrente en contaminación de alimentos se ha observado y asociado con la tendencia al aumento en el pH<sup>25,26</sup>.

## 6. CLASIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS DE ACUERDO CON LA TEMPERATURA.

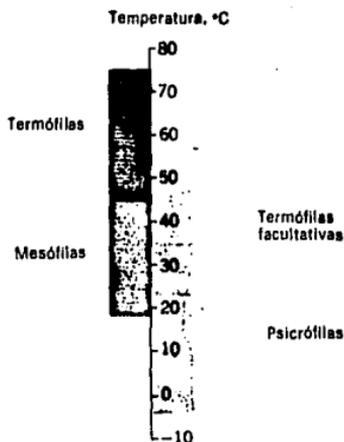
Los microorganismos están ampliamente clasificados de acuerdo a - su habilidad de crecer a diferentes temperaturas. Aquellos que crecen en la - más alta o en la más baja escala de temperatura son importantes en el procesa- do de alimentos, desde que el calor y la refrigeración son aplicados para la - preservación de los alimentos.

Puesto que todos los procesos del crecimiento dependen de reaccio- nes químicas, y la intensidad de estas reacciones está condicionada por la tem- peratura, es natural que la pauta del crecimiento bacteriano esté profundamen- te influida por esta variable. La temperatura determina, en gran parte, el fn dice y la magnitud total del crecimiento, así como el metabolismo y la morfolo gía del organismo.

Cada especie bacteriana crece a temperaturas determinadas dentro de cierto intervalo (Ver Figura 1). Según este criterio, las bacterias pueden dividirse en los grupos siguientes:

- 1) Psicrófilas: crecen a 0°C o menos, aunque pueden crecer a tem- peraturas más elevadas. Su crecimiento óptimo es entre 20 y 30°C, aproximadamente.

**FIGURA 1**



INTERVALOS APROXIMADOS DE TEMPERATURAS de crecimiento de diversas bacterias.

Cita: Pelczar, Michael L. Jr. Microbiología. Ed. McGraw-Hill, México, 1978. pág. 93.

## 7. CLASIFICACION DE BACTERIAS FORMADORAS DE ESPORAS CON REFERENCIA AL REQUERIMIENTO DE OXIGENO.

En los alimentos de baja acidez y también en los ácidos, las bacterias formadoras de esporas son de gran importancia desde el punto de vista de esterilización. Con respecto al requerimiento de oxígeno, pueden clasificarse como sigue:

- A) Aerobios Obligados (Bacillus spp)
- B) Anaerobios Facultativos (Bacillus spp)
- C) Anaerobios Obligados (Clostridium spp)

A) Aerobios Obligados.- Este grupo incluye aquellas especies que requieren del oxígeno molecular para su crecimiento. Desde el punto de vista de esteriliza-

2) Mesófilas: Su crecimiento óptimo es entre los 25 y 40°C aproximadamente.

3) Termófilas: Su crecimiento óptimo es entre los 45 y los 60°C. El intervalo térmico de crecimiento de algunas bacterias termófilas se extiende en la región mesofílica. Estas especies se denominan termófilas facultativas o euritermófilas. Otras termofílicas crecen mejor a temperaturas mayores de 60°C, son las termófilas obligadas o verdaderas, también llamadas estenotermófilas<sup>27</sup>.

ción alimentaria, éste es el grupo de menor importancia, puesto que con los métodos de enlatado de hoy en día, la mayoría de los alimentos contienen muy bajos niveles de oxígeno molecular, insuficiente para permitir un crecimiento apreciable. Las esporas de este grupo de microorganismos son menos termorresistentes que las de los otros dos.

B) Anaerobios Facultativos.-- Este es el grupo de mayor importancia desde el punto de vista de esterilización alimentaria. De particular importancia en alimentos ácidos y de baja acidez, están los bacilos termofílicos formadores de esporas. Algunos de estos producen esporas que son más termorresistentes que las producidas por la mayoría de los anaerobios obligados. Estas que suelen causar es lo que se conoce como acidez plana o como "flat sour"; esto es, que producen ácido pero no gas (o muy poco). No obstante los más problemáticos son clasificados como termófilos, muchos de los cuales tienen la facultad de crecer, aunque más lentamente, a temperatura ambiente (o a temperaturas cercanas a ésta) durante el manejo del alimento.

En alimentos de baja acidez, el microorganismo que tiene mayor importancia es Bacillus stearothermophilus y sus especies del mismo género. Sus esporas tienen valores  $D_{250}$  de más de 4 minutos ( $D_{250}$  es el tiempo, en minutos, a 250°F (121°C) requerido para destruir el 90% de las esporas en una población dada). La temperatura óptima para su desarrollo es de 49 a 55°C (120-131°F), incluso a temperaturas de 38°C (100°F).

En alimentos ácidos, las especies de mayor importancia son Bacillus coagulans (Bacillus thermoacidurans), Bacillus macerans y Bacillus polymyxa.

C) Anaerobios Obligados.-- Algunas especies producen esporas muy termorresistentes. Con referencia a contaminación de alimentos enlatados, pueden clasificarse en dos grupos: mesofílicos y termofílicos. De los termofílicos, los más importantes son los organismos sacarofílicos que no producen sulfuro de hidrógeno (Clostridium thermosaccharolyticum), pero producen grandes cantidades de gas, principalmente dióxido de carbono e hidrógeno, a partir de una gran variedad de carbohidratos. Consecuentemente, causan contaminación del tipo gaseoso (abombamiento). Incluso producen un olor butírico en los alimentos. Este ti-

po de microorganismos generalmente son de mayor importancia en el deterioro de alimentos con un pH de 4.5 a 5.0. Su temperatura óptima de crecimiento es de 55°C (131°F).

Los anaerobios termofílicos productores de esporas que sí producen sulfuro de hidrógeno, son los responsables de la contaminación llamada "apestas a azufre" ("sulfur stinker"), como Clostridium nigrificans. Estos microorganismos, además de no necesitar el oxígeno molecular para desarrollarse, son proteolíticos, y el sulfuro de hidrógeno es el único gas que producen en gran cantidad. Como este gas es soluble en el producto, las latas contaminadas no presentan abombamiento, aunque el alimento se ennegrece por la interacción del gas y el hierro de la lata. La contaminación por este tipo de microorganismos es comparativamente rara por dos razones: la incidencia de sus esporas en la mayoría de los alimentos es generalmente baja, y son relativamente poco termorresistentes comparadas con las esporas de los anaerobios sacarolíticos termofílicos y los anaerobios facultativos termofílicos productores de "flat sour". Ninguno de estos grupos es de importancia en alimentos cuyo pH sea menor a 4.5.

En alimentos de baja acidez, les siguen en importancia a los grupos anteriores, los anaerobios mesofílicos formadores de esporas. El que es considerado de mayor importancia debido a su alto riesgo y su significancia en la salud pública, es el organismo productor de toxina, Clostridium botulinum. De sus diferentes tipos de toxinas, las A, B y E son las de mayor significancia. Las de los tipos A y B son más termorresistentes que las del tipo E. Aún así, las toxinas A y B no son tan termorresistentes como las esporas formadas por un microorganismo no tóxico identificado como P.A.3679 (Anaerobio Putrefactivo). Mientras que las esporas A y B se caracterizan por valores  $D_{250}$  del orden de 0.1 a 0.2, las esporas más termorresistentes de P.A.3679 tienen valores  $D_{250}$  del orden de 0.5 a 1.5<sup>28</sup>.

Afortunadamente la incidencia de P.A.3679 es muy baja en la mayoría de los alimentos. Probablemente la mayor importancia del P.A.3679 es como un organismo de prueba para verificar lo adecuado de un proceso de enlatado. Además de que es ideal para este propósito, no solamente por su termorresistencia, sino también porque es atóxico, es fácil de cultivar y su contaminación en alimentos va acompañada de una gran producción de gas.

Otros organismos proteolíticos o putrefactivos que frecuentemente causan contaminación en alimentos de baja acidez son Clostridium putrificum, - Clostridium histolyticum, Clostridium bifementans, Clostridium sporogenes.

También hay anaerobios sacarolíticos formadores de esporas de menor resistencia térmica, como Clostridium pasteurianum, Clostridium butyricum, y anaerobios butíricos relacionados. Algunos de estos crecen bien en alimentos cuyo pH sea de 4.0 a 4.5.

En resumen, de los mesofílicos anaerobios obligados, en alimentos de baja acidez y semi-ácidos (pH de 4.5 y más alto), los putrefactivos anaerobios, Clostridium sporogenes y las especies relacionadas, son los de mayor importancia. En alimentos ácidos (pH de 4.0 a 4.5), los butíricos anaerobios -- Clostridium pasteurianum y especies relativas son los de mayor importancia. La temperatura óptima para su crecimiento es de 25 a 35°C (77 a 95°F).

## II. RESISTENCIA TERMICA DE LOS MICROORGANISMOS.

### 1. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS.

Existen una gran cantidad de factores que influyen en el crecimiento de los microorganismos: la naturaleza del producto (si le sirve o no como -- fuente de alimento), la presencia de ciertas sustancias en él (sales, azúcares), la cantidad de agua que tenga el alimento, la temperatura, el pH, etc. De los -- más importantes están los siguientes:

Requerimientos alimenticios.-- Cada célula viva ya sea vegetal o animal requiere de ciertos ingredientes alimenticios, siendo los principales azúcares u otros carbohidratos, proteínas u otras sustancias similares, y después pequeñas cantidades de otros materiales como fosfatos, cloratos, calcio y trazas de muchos otros elementos. Algunas bacterias requieren de una fuente de nitrógeno en combinación con materia orgánica. Este requerimiento lo suplen con algunos alimentos como leche, carne y vegetales.

El principio básico para una buena sanidad en una planta de alimen

tos es el remover del equipo todos los residuos de alimento en los que pudieran proliferar bacterias. Logrado ésto, la condición más importante para el crecimiento de microorganismos ha sido removida<sup>29</sup>.

Requerimientos de Humedad.- La concentración de humedad en los alimentos es un factor importante al prevenir o permitir crecimiento bacteriano en el alimento. La importancia de la humedad en el crecimiento de bacterias se ve claramente -- cuando se reconoce que la célula bacteriana no posee partes bucales y que todo el alimento debe estar en forma soluble, para que se difunda a través de la pared celular. Sin humedad suficiente, la entrada de alimento, la salida de residuos alimenticios y de fluidos celulares sería imposible. Para que una bacteria pueda proliferar debe haber un mínimo de 30% de humedad y condiciones favorables<sup>30</sup>.

Sustancias Químicas.- El crecimiento bacteriano también se ve afectado por sustancias químicas, como el agua clorada. Si se mantienen perfectamente limpias las superficies de contacto con el alimento y se aplica constantemente agua -- clorada en ellas, no habrá crecimiento bacteriano.

En presencia de sal (NaCl) en concentraciones del 10% hay inhibición de crecimiento microbiano. Se ha demostrado que el Clostridium botulinum puede crecer a concentraciones de 7% pero no produce toxina, y a concentraciones del 10% se inhibe por completo. Si se tiene una concentración más baja de sal, se puede inhibir el crecimiento de Clostridium botulinum si se combina -- con la adición controlada de ácidos<sup>31</sup>.

Temperatura.- Mientras dura su estado activo de crecimiento, muchos microorganismos son destruidos al exponerlos a temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua. La célula bacteriana no tiene ningún mecanismo para sobrevivir a temperaturas más bajas o más altas a las usuales de su ambiente natural. Un amplio rango de temperatura que va de 32 a 185°F (0 a 85°C) puede permitir el crecimiento de bacterias, pero la rapidez en el crecimiento varía con cada especie de microorganismo. La temperatura óptima de crecimiento es aquella a la cual los organismos crecen más rápidamente en un tiempo relativamente corto: - de 2 a 24 horas. Una temperatura más baja que la óptima para un organismo determinado puede producir una gran cantidad de células después de un largo pe--

ríodo de incubación, mientras que incrementando la temperatura puede causar una rápida multiplicación pero esto también aumenta las reacciones químicas. Estas reacciones pueden resultar en síntesis de protoplasma o en generación de energía o incluso en ambas. Finalmente, pueden llegar a destruir todas las -- proteínas.

Las altas temperaturas tienden a acelerar las actividades metabólicas acompañadas de una muy pequeña destrucción de proteínas enzimáticas.

## 2. CAUSAS DE MUERTE POR CALENTAMIENTO.

Lamanna y Mallette<sup>32</sup> han presentado diversas teorías en un intento para explicar:

1. Los mecanismos físicos y químicos que ocasionan la muerte de una célula bacteriana en presencia de agua cuando es calentada,
2. Por qué hay una gran variación en los cultivos de la misma especie en lo que respecta a tiempo y temperatura requeridos para destruir estos microorganismos.

Las tres teorías más aceptadas son que el calor inactiva enzimas vitales; las células se intoxican con sus propios productos de desecho metabólico; y que ciertos cambios destructivos tienen lugar en el estado físico de los lípidos esenciales.

Aunque los cambios exactos que ocurren no están completamente comprendidos, hay diversos hechos que apoyan cada teoría:

A) Desnaturalización de proteínas por calor.- El calor ocasiona un cambio irreversible en las proteínas, llamado desnaturalización o coagulación. Como las enzimas tienen estructura de proteína, son desnaturalizadas e inactivadas con el calentamiento.

El aislamiento de las enzimas termorresistentes como apirasa, citocromo oxidasa, deshidrogenasa y succinoxidasa de las bacterias termorresistentes apoyan esta teoría<sup>33</sup>.

B) Intoxicación.- Es posible que cuando las células son tratadas con calor, se acelere su metabolismo hasta el punto en que la célula es envenenada por sus propios productos metabólicos<sup>34</sup>.

C) Cambios en lípidos esenciales.- Existe una relación entre los puntos de fu-

sión de las grasas encontradas en un organismo y el rango de temperatura que ocasionará su muerte. Para apoyar esta teoría se tiene el hecho de que las esporas de Clostridium botulinum tienen mayor resistencia térmica cuando hay acumulación de ácidos grasos de mayor peso molecular, en el medio en que se desarrollan las células<sup>35</sup>.

### 3. EFFECTO DEL CALOR EN LAS ESPORAS BACTERIANAS.

Se sabe y se ha observado que un ligero calentamiento puede estimular la actividad metabólica de un organismo. Si las esporas que han sido activadas se calientan a 80°C (176°F), los sistemas enzimáticos son destruidos - dejando a las esporas en un estado parecido al de las células vegetativas.

### 4. FACTORES QUE MODIFICAN LA TERMORRESISTENCIA DE LAS ESPORAS.

1) Naturaleza del producto. Hay productos que por su composición química y riqueza nutritiva constituyen un medio ideal para el desarrollo de - microorganismos y sus esporas. En ellos, la termorresistencia de los microorganismos y sus esporas, es mayor.

2) pH. Los valores de pH cercanos a la neutralidad favorecen, en general, el desarrollo de microorganismos; por tal razón, a medida que el pH - se acerque al valor 7 el tiempo de esterilización requerido es mayor.

3) Presencia de NaCl y otras sales. La presencia de Cloruro de Sodio y otras sales, que actúan como conservadores, disminuyen el tiempo de esterilización. A partir de 2 ó de 2.5% de NaCl la resistencia de los microorganismos a la acción del calor disminuye.

4) Presencia de azúcares. A concentraciones elevadas (del 50-60%), los azúcares ejercen una acción inhibitoria del crecimiento de los microorganismos, pero a concentraciones más bajas predomina el efecto protector contra la acción del calor.

5) Grasas y aceites. Tienen acción protectora sobre los microorganismos por lo que aumentan el tiempo de esterilización.

6) Concentración. La resistencia térmica de una suspensión de esporas bacterianas está relacionada con el número de organismos presentes. Mientras mayor sea el número de esporas por mililitro, mayor será la resistencia de esta suspensión.

7) Factores Externos. La resistencia térmica de las esporas bacterianas no es una propiedad fija, pero sí una que bajo condiciones ordinarias puede tender a ser relativamente constante. La magnitud del cambio en resistencia está determinada por fuerzas físicas y químicas que operan por fuera de la célula de la spora (las características hereditarias de la spora, el medio en que crece, sus nutrientes, el pH, la temperatura, etc.).

#### 5. MECANISMO DE DESTRUCCION TERMICA.

Numerosos investigadores<sup>36</sup> han intentado hallar la explicación -- del mecanismo de destrucción térmica de los microorganismos pero, aún hoy, no se conoce con exactitud. Una opinión muy generalizada es la de que los microorganismos mueren por coagulación de las proteínas celulares. Hay factores -- que afectan a la coagulación proteica --pH, salinidad en la solución, cantidad de agua libre-, y que ejercen influencia en la resistencia térmica de las bacterias.

La coagulación térmica de la albúmina (proteína típica) varía con el contenido de agua, siendo más rápida cuanto mayor es la cantidad de ésta. Dado que el contenido absoluto de agua es idéntico en las esporas y en las formas vegetativas, el distinto comportamiento de ambas frente a los tratamientos térmicos podría explicarse por los diferentes contenidos en agua libre, ya que en las formas esporuladas gran parte del agua es agua de imbibición (imbibir es absorber un cuerpo sólido a otro líquido), incapaz de intervenir en los procesos de coagulación.

#### 6. LEYES EXPONENCIALES DE DESTRUCCION.

Para calcular la resistencia térmica de un microorganismo hay que tener en cuenta que en ella influyen numerosos factores, algunos que dependen

del propio microorganismo y otros, externos y controlables, que dependen de -- las condiciones ambientales y de operación. Entre estos últimos, son los más importantes: concentración inicial de esporas, condiciones del medio en que -- han crecido las bacterias y se han desarrollado las esporas, composición del a limento (humedad, concentración de hidrogeniones, presencia de sales) y rela-- ción entre el tiempo y temperatura del tratamiento que se aplique para destruir los microorganismos.

Si bien es cierto que la aplicación de temperaturas superiores a la máxima de crecimiento resulta letal, la velocidad de destrucción es siempre una función del tiempo y de la temperatura.

Experimentalmente se ha comprobado la existencia de una relación exponencial entre el número de microorganismos que sobreviven y el tiempo de - tratamiento durante un proceso térmico a temperatura constante; si se parte de una concentración de bacterias determinada, existe también una relación expo-- nencial, del mismo tipo que la anterior, entre la temperatura y el tiempo nece-- sarios para la destrucción, total o parcial, de la población. En la práctica, para determinar la resistencia térmica de un microorganismo, se calienta a una cierta temperatura una suspensión de concentración conocida y se mide el tiem-- po necesario para destruir el 90% de la población bacteriana inicial. Este -- tiempo, considerado como unidad fundamental en el cálculo de la resistencia tér-- mica de los microorganismos, se representa por la letra D y se refiere, en ca-- da caso, a la temperatura considerada.

El significado práctico del parámetro D, es el siguiente: cuando se calienta una suspensión de esporas, a una temperatura constante, durante un tiempo D, se destruye el 90% de la población inicial; si se continúa calentando durante otros D minutos, se destruye el 90% de la población residual y así sucesivamente. El ejemplo de la Tabla 2 ilustra claramente el fenómeno.

Si se considera que en ese ejemplo, los 100,000 microorganismos i-- niciales se encontraban en un envase, después de un período de tiempo D, se h a brán reducido a 10,000 y si el tiempo de calentamiento llega a 6D, el número -- teórico de supervivientes es de 0.1.

T A B L A 2<sup>37</sup>

<u>tiempo (min.)</u>	<u>No. de bacterias iniciales</u>	<u>No. de bacterias residuales</u>
0	$10^4 = 100,000$	$10^4 = 100,000$
10	$10^4 = 100,000$	$10^3 = 10,000$
20	$10^3 = 10,000$	$10^2 = 1,000$
30	$10^2 = 1,000$	$10^1 = 100$
40	$10^1 = 100$	$10^0 = 10$
50	$10^0 = 10$	$10^{-1} = 1$
60	$10^{-1} = 1$	$10^{-2} = 0.1$
70	$10^{-2} = 0.1$	$10^{-3} = 0.01$
80	$10^{-3} = 0.01$	$10^{-4} = 0.001$

Sin embargo, no se puede decir que al cabo de este tiempo, se ha conseguido la esterilidad, ya que si se repite 10 veces el experimento, o lo que es lo mismo, si se realiza en 10 envases es posible que un microorganismo sobreviva y dé lugar a la alteración del envase donde se encuentra. Por tanto, el resultado teórico de 0.1 supervivientes debe interpretarse como que hay una posibilidad entre 10 de que un microorganismo sobreviva, se desarrolle y altere la conserva. En la práctica debe considerarse la contaminación total inicial de un lote de envases, si ésta no excede los valores normales de la industria (10,000 microorganismos por envase), se considera como aceptable la esterilidad proporcionada por un tratamiento de 100 minutos, que teóricamente reduciría la contaminación a un microorganismo por cada 100,000 envases, aunque para ampliar el margen de seguridad suele aplicarse un tiempo equivalente a 120.

### III. LA ESTERILIDAD EN ALIMENTOS ENLATADOS.

El éxito de un proceso térmico de alimentos enlatados de baja acidez en envases herméticamente sellados está medido por la reducción de la carga inicial de microorganismos presentes en el alimento. Esta carga inicial -- puede consistir en organismos capaces de causar descomposición en el alimento y otras alteraciones no patogénicas. La resistencia al calor de los diferentes microorganismos varía, según su naturaleza.

En años recientes, el procedimiento térmico de alimentos enlatados de baja acidez debido a la detección de esporas de Clostridium botulinum -- ha tenido gran interés en el producto comercial enlatado<sup>38</sup>.

Desde que esto era atribuido a sub-procesos, los procesamientos -- térmicos para este tipo de alimentos procesados en autoclaves fijas se han incrementado significativamente<sup>39</sup>. Recientemente, la toxina botulínica se ha detectado en latas de tamaño institucional procesadas en autoclaves con agitación<sup>40</sup>.

El estudio del procesamiento térmico en autoclaves ha tenido gran auge y se han formulado modelos para evaluar los diferentes procesos térmicos (Ball y Olson, 1957; Stumbo, 1973)<sup>41,42</sup>. Estos modelos muestran que sabiendo la temperatura del vapor en el autoclave, el tiempo de residencia del bote sanitario (lata) en el autoclave, el tamaño de este, y las características de -- transferencia de calor y temperatura del alimento, puede estimarse el valor le tal de cualquier organismo sabiendo su resistencia térmica. Es por esto que -- la Ley (Food and Drug Administration, 1979)<sup>43</sup> requiere procesos de alimentos -- de baja acidez para controlar estrictamente el proceso térmico y para mantener récords de las condiciones del proceso.

El microorganismo que tiene mayor termorresistencia y que es nocivo para el hombre debido a su habilidad para producir toxinas, es Clostridium botulinum. Otras esporas más termorresistentes como las producidas por Clostridium sporogenes (P.A.3679) pueden también estar presentes<sup>44</sup>.

Los procesos térmicos para alimentos enlatados de baja acidez utilizados en la industria enlatadora deben resultar al menos en una reducción de  $10^{12}$  de la carga inicial de las esporas más resistentes de Clostridium botuli-

num<sup>45</sup>. Un proceso térmico debe además alcanzar esterilidad comercial, que, en adición con la ausencia de formas viables de microorganismos que puedan tener significancia en la salud pública, es esa condición alcanzada por la aplicación de calor, la que vuelve al alimento libre de cualquier microorganismo más termorresistente sin tener significancia para la salud capaz de reproducirse - en el alimento bajo condiciones normales no refrigeradas de almacenamiento y - distribución<sup>46</sup>.

### 1. ESTERILIDAD "COMERCIAL".

La esterilidad "comercial" está definida como la "condición obtenida por la aplicación de calor que vuelve al alimento libre de formas viables de microorganismos que tienen significancia en la salud pública así como de -- cualquier otro microorganismo que no tenga significancia capaz de reproducirse en el alimento bajo condiciones normales no refrigeradas de almacenamiento y - distribución"<sup>47,48</sup>.

En los alimentos de baja acidez, la esterilidad "comercial" se de fine como el "proceso por el cual todas las esporas de Clostridium botulinum y todas las otras bacterias patogénicas han sido destruidas, así como los microorganismos más termorresistentes que, al estar presentes, pudieran producir contaminación bajo condiciones normales de alimentos enlatados no refrigeradas de almacenamiento y distribución"<sup>49</sup>.

Sin embargo, la esterilidad comercial, en general, no implica la completa destrucción de las esporas de los termofílicos formadores de ellas. En años recientes, algunos enlatadores han tenido una experiencia extensiva -- con violentas contaminaciones, en donde los únicos microorganismos contaminantes habfan sido mesofílicos aeróbicos formadores de esporas. En el pasado, es ta contaminación habría sido diagnosticada como insuficiencia del tratamiento térmico; recientemente algunos investigadores han concluido que este tipo de - contaminación se debe a una re-contaminación post-proceso (pudiendo ser por ejemplo al escurrirse las latas).

Los alimentos esterilizados comercialmente, sin embargo, no necesariamente están por completo estériles en el sentido clásico. En ocasiones,

alimentos de baja acidez enlatados pueden contener bajos números de ciertas esporas termofílicas que no causarían contaminación, a menos que el alimento sea almacenado a temperaturas arriba de 43°C. Para esterilizar completamente un producto enlatado, indudablemente se degradará su calidad<sup>50</sup>. El enlatado depende, para su efectividad, del efecto combinado de tiempo y el aumento de temperatura sobre los microorganismos. A medida que la temperatura se acerca a la temperatura letal, los microorganismos mueren. Si el alimento se mantiene a esa temperatura letal por un tiempo suficientemente largo, se vuelve estéril, aunque contenga muy pocos patógenos o microorganismos contaminantes.

El tratamiento térmico ideal esterilizaría al alimento matando a todos los microorganismos presentes. Para lograr esta esterilización, cada partícula del alimento en el envase tendría que exceder la temperatura letal y mantenerse ahí por un largo tiempo para destruir a todos los microorganismos. El problema de esto es que le afectará a la calidad del producto desnaturalizando proteínas y tejidos.

Para lograr una esterilidad aceptable en alimentos de baja acidez enlatados, el punto de más lento calentamiento del envase (conocido como "punto frío"), debe ser calentado por un periodo equivalente a 120 minutos para las esporas más termorresistentes que pudieran estar asociadas con algún alimento en particular.

El proceso usual o tratamiento térmico dado a los alimentos poco ácidos ( $\text{pH} \geq 4.6$ ) es equivalente a cuando menos 3 minutos a 250°F (121°C). Este tratamiento térmico es más que suficiente para destruir cualquier bacteria contaminante del alimento. También es equivalente a más de 6 horas a 212°F (102°F) y con frecuencia produce mucha mayor letalidad.

Los alimentos ácidos no están sujetos a tanto calor como los de baja acidez; sin embargo, son calentados lo suficiente para destruir todas las células vegetativas de bacterias, levaduras y mohos que, si no son destruidas, podrían causar contaminación.

Debe considerarse que cuando un alimento es sellado herméticamente en un contenedor, habrá incluidos microorganismos que, si no son destruidos, se desarrollarán bajo las condiciones ambientales y causarán contaminación en el alimento. La destrucción por calor de los organismos presentes en el conte

nedor sellado es la operación fundamental de la preservación de alimentos por medio del enlatado. La operación es conocida como esterilidad comercial. La combinación de tiempo y temperatura a la cual el producto es sometido se le conoce como proceso.

El proceso se determina por un estudio del rango de penetración de calor del producto y de un estudio de la termorresistencia de esporas significativas. Después se calcula un proceso teórico y se prueba por la inoculación del producto con una carga de esporas conocida.

Existe un proceso de esterilización conocido como HTST (Hot Temperature-Short Time). Esto es, Alta Temperatura por Corto Tiempo, en el cual como su nombre lo indica, se eleva más la temperatura por menos tiempo de proceso obteniendo la misma esterilidad en el producto. Uno de sus inconvenientes es que si se deja más tiempo del necesario, puede afectar a la calidad nutricional y organoléptica del producto. Sin embargo en los últimos años se ha usado mucho este sistema sobre todo con el fin de reducir tiempos de proceso.

Así como las temperaturas del medio de calentamiento son incrementadas y los tiempos necesarios de calentamiento son acortados para conseguir la mejoría en la calidad e incrementar la retención vitamínica que provee el procesamiento HTST, el tiempo requerido para la penetración de calor en el punto de más lento calentamiento en las latas se convierte en el factor que controla el proceso térmico<sup>51,52</sup>.

## 2. MICROORGANISMOS DE INTERES EN LA ESTERILIZACION.

Para establecer correctamente los datos de esterilización de un producto deben conocerse los microorganismos que inicialmente lo contaminan y determinar la resistencia del más termorresistente de todos ellos. En los alimentos poco ácidos ( $pH > 4.5$ ), ésto resulta muy difícil y por ello se recurre a elegir especies representativas y se calculan los baremos (datos) de acuerdo con la resistencia térmica de las mismas. Durante mucho tiempo estos cálculos se han basado en la destrucción de las esporas del Clostridium botulinum, uno de los anaerobios esporulados más termorresistentes y productor de una toxina de efectos mortales; pero la incomodidad de su manejo, por el peligro inheren-

te a su toxicidad, se ha determinado la elección de otro germen, el P.A.3679 (Putrefactis Anaerobium) que tiene una resistencia térmica ligeramente superior y es totalmente inocuo.

En los productos ácidos ( $\text{pH} \leq 4.5$ ) se eligen, para calcular los baremos (datos) de esterilización, los datos de resistencia térmica de los microorganismos que normalmente los alteran, ya que los anaerobios esporulados más resistentes, incluido el Clostridium botulinum, no se desarrollan en presencia de elevadas concentraciones de hidrogeniones. Normalmente se eligen los anaerobios butíricos (Clostridium butyricum, Clostridium pasteurianum, etc.), o el Bacillus coagulans, dependiendo la elección de la naturaleza y características del producto que se considere.

Para estudiar la resistencia térmica se inocular el producto con una cantidad conocida de esporas -generalmente 10,000- y se somete a distintos tratamientos térmicos, variando el tiempo y la temperatura. Posteriormente, se observa el comportamiento del microorganismo inoculado.

### 3. FACTORES QUE MODIFICAN LA PENETRACION DE CALOR.

Son diversos, y entre los más importantes están:

1) Naturaleza del envase. La transmisión de calor a través de la pared de los envases metálicos es más rápida que en el caso de los envases de vidrio. Este aspecto tiene especial importancia si la penetración del calor dentro del producto se produce por convección.

2) Tamaño y forma del envase. El tiempo de esterilización para un mismo producto será mayor en los envases de mayor tamaño o capacidad. Sin embargo, la forma también influye: para dos envases de la misma capacidad, la penetración del calor hasta el centro depende del diámetro.

3) Consistencia del producto sólido. La textura tiene también importancia en la penetración del calor. Por ejemplo, la pulpa firme de una fruta o verdura verde retardará la penetración del calor y ésta será más lenta -- que si la fruta o verdura se encuentra madura.

4) Concentración de los líquidos de gobierno y características de los mismos. La concentración de azúcar, almidón y otras sustancias influye sobre la penetración de calor. A medida que aumenta la viscosidad se dificultan los movimientos de convección, haciendo más lenta la velocidad de penetración.

5) Agitación del envase. La agitación favorece los movimientos de convección y por tanto, acelera la penetración del calor, acortando el tiempo de esterilización. La aplicación de la agitación es eficaz para los productos de viscosidad media y no para los poco o muy viscosos.

#### 4. DIFERENTES FORMAS DE CONTAMINACION EN ALIMENTOS DE BAJA ACIDEZ ENLATADOS.

Cuando se contamina un alimento enlatado, se manifiesta por la obvia producción de gas (abombamiento del envase), debido a un cambio en consistencia del alimento, a un cambio en el pH del producto y/o a un incremento en el número de microorganismos vistos en el examen microscópico del alimento.

La contaminación microbiana de los alimentos enlatados puede dividirse en 5 categorías: incipiente, por bajo procesamiento, por perforaciones, termofílica y por tratamiento térmico insuficiente.

A) Contaminación Incipiente.- En este tipo de alteración, las latas pueden presentar una falta de vacío directamente del autoclave o en casos extremos, un suave abombamiento. Algunas veces hay reducción en el pH del producto. Si se examinan al microscopio las trazas de producto que se escurren por perforaciones que pueda tener la lata o por un cierre defectuoso, se aprecian numerosas bacterias; pero si se subcultivan e incuban a 30 y 55°C, no presentan crecimiento alguno. La causa más común de contaminación incipiente es la de mantener al producto por mucho tiempo a temperaturas favorables para el crecimiento de microorganismos antes del enlatado y la esterilización. Esta alteración puede ocurrir en algún punto entre la preparación y el enlatado o también entre el enlatado y la esterilización. Incluso otra causa puede ser el utilizar algún ingrediente altamente contaminado.

B) Contaminación por Bajo Procesamiento.- En este caso, la contaminación ocurre porque el producto no ha recibido un proceso de esterilización efectivo. Los productos sólidos a menudo presentan una textura firme o poco o nada cocida. Dependiendo de la temperatura del producto puede haber bacterias formadoras de esporas, pero en la mayoría de los casos una flora de microorganismos - que no forman esporas es encontrada en el escurrido de los envases y en subcultivos a 30°C. La contaminación puede ocurrir en una sola lata, pero más frecuentemente ocurre en una autoclave completa. Para prevenir posibles mezclas de contenedores procesados en autoclaves con los no procesados en ellas, los enlatadores de alimentos de baja acidez han requerido que se marque cada autoclave e incluso cada canastilla con un indicador sensitivo al calor o algún otro medio efectivo que muestre que el producto ha sido procesado<sup>53</sup>.

C) Contaminación por Perforaciones en el Contenedor, o por un Cierre Defectuoso ("Leakage").- A la alteración que involucra a re-contaminación post-proceso de alimentos esterilizados en contenedores herméticamente sellados se le conoce como contaminación por perforaciones en el contenedor o por un cierre defectuoso ("Leakage"). Aunque este tipo de contaminación involucra la penetración de organismos de afuera del contenedor hacia el interior, también puede incluir un cierto orden de entrada de microorganismos. Comúnmente los microorganismos involucrados son bacilos gram-negativos de no significancia para la salud, lactobacilos, micrococos, especies de Leuconostoc y enterococos. En ciertas ocasiones algunas levaduras y mohos se subcultivan a 30°C.

Las causas de este tipo de alteración pueden ser: 1) factores relacionados con los materiales de las latas o con el trabajo de los hombres y - 2) por factores relacionados con las operaciones de proceso o con los procedimientos mismos.

D) Contaminación Termofílica.- La contaminación causada por microorganismos - termofílicos (temperatura de crecimiento: 40-75°C; óptima: 55°C), se clasifica en: Acidez Plana ("Flat Sour"), Termofílicos Anaerobios y Con Pestilencia a Azufre.

1. Acidez Plana ("Flat Sour"): Se caracteriza por el crecimiento de Bacillus stearothermophilus. El contenedor permanece plano (sin abombamiento) y el producto muestra una reducción en el pH (pero no más abajo de pH 5.3) y tiene un olor ácido. Usualmente las preparaciones examinadas al microscopio muestran una especie de gránulos, sin esporas.

2. Termofílicos Anaerobios: Esta contaminación la causa Clostridium thermosaccharolyticum, produciendo cantidades copiosas de gas (hidrógeno) ocasionando abultamiento de los contenedores. Invariablemente tienen olor ácido y muestran una marcada reducción en el pH (se debe tomar en cuenta que los termofílicos anaerobios pueden crecer en un rango considerable de pH). En el examen microscópico se aprecian gránulos.

3. Con Pestilencia a Azufre: La ocasiona Desulfotomaculum nigrificans (Clostridium nigrificans). La lata no se abomba pero el alimento se ennegrece y adquiere un fuerte olor a sulfuro de hidrógeno. En los últimos años este tipo de contaminación ha atacado a los alimentos de baja acidez con pH arriba de 5.2. El examen microscópico muestra gránulos y usualmente no presenta esporas. El riesgo de esta clase de contaminación puede reducirse grandemente utilizando ingredientes con baja cuenta de esporas termofílicas; o evitando temperaturas del rango termofílico durante la preparación del producto y las operaciones de empaqueo; y por un enfriamiento apropiado de los productos esterilizados después del procesamiento.

E) Contaminación por Tratamiento Térmico Insuficiente.- Este tipo de alteración usualmente involucra la presencia de anaerobios putrefactivos, como el Clostridium sporogenes, aunque también varias especies de mesofílicos aeróbicos formadores de esporas pueden estar presentes. En los casos severos de tratamiento térmico insuficiente, se encuentran anaerobios butíricos como Clostridium butyricum o Clostridium pasteurianum. Del Clostridium botulinum, los tipos A y B son los que se encuentran con mayor frecuencia, porque sus esporas son las más termorresistentes de los demás tipos. Basándose en la apariencia del producto, su olor, y exámenes microscópicos, es imposible diferenciar desde la examinación inicial, entre una contaminación causada por el tipo A o el B y la causada por Clostridium sporogenes, siendo todos anaerobios putrefactivos.

La contaminación causada por anaerobios putrefactivos se caracteriza por el contenedor hinchado y un olor definido a podrido. El pH del producto no disminuye abajo de 4.8. Usualmente presentan esporas si se examinan escurridas de las latas. Los subcultivos incubados muestran crecimiento y producción de gas a 30°C pero no a 55°C. Cualquier producto de subcultivo que -- tenga típico olor putrefacto debe analizarse para ver si crea toxina, con el fin de determinar la presencia de toxina botulínica.

Se puede dar el caso de contaminación por mesofílicos aeróbicos - formadores de esporas caracterizándose por contenedores planos, ocasionada por Bacillus subtilis y Bacillus coagulans; o caracterizándose por contenedores abombados, ocasionada por Bacillus polymyxa-macerans. Los productos así contaminados generalmente presentan apariencia normal y muy poco o nada de olor, pero a veces se nota un olor ácido o medicinal. El producto muestra una gran reducción en el pH pero depende de la especie involucrada y del pH original del alimento. Algunos filtrados de Bacillus polymyxa y de Bacillus macerans son capaces de crecer aún en alimentos ácidos<sup>54</sup>.

## 5. BOTULISMO.

Botulismo es un término utilizado para describir un tipo particular de envenenamiento por alimentos. El botulismo difiere de los otros tipos de envenenamiento causados por bacterias -como stafilococos, salmonela, perfringens-, en que causa disturbios al sistema nervioso humano más que al tracto digestivo<sup>55</sup>.

El botulismo es una intoxicación causada por una toxina producida por el microorganismo llamado Clostridium botulinum. Este organismo es un bacilo poseedor de gránulos en su periferia formador de esporas. Originalmente vive en la tierra de todas partes del mundo, siendo bacteria anaeróbica (no crece en pequeñas cantidades de oxígeno libre), ni en superficies que soportan el crecimiento de muchas otras clases de bacterias. Es una bacteria gram-positiva, productora de una exotoxina que es la neuroparalítica más mortal conocida. Sus células bacterianas incluso son capaces de crecer justo a unos milímetros bajo la superficie de los alimentos expuestos al aire.

Se han descrito seis tipos de Clostridium botulinum: tipos A, B, C, D, E y F. Cada tipo produce una exotoxina diferente y específica pero cada toxina produce síntomas similares. Las A, B y E son las más peligrosas para el humano. Se han desarrollado sueros antitoxinas específicos para cada tipo, y un antisuero pentavalente<sup>56</sup>: 30% A + 30% B + 5% C + 5% D + 30% E. Este antisuero se obtiene aislando microorganismos de las diferentes toxinas, para que proliferen y produzcan toxina, la cual por precipitación se separa y se coloca en formaldehído para que pierda su toxicidad; se inyecta a caballos que se sangran y se separa el suero de la sangre. La antitoxina se encuentra en el suero. Si se llegara a saber qué tipo de toxina es la que se ingirió, se hace el suero con mayor cantidad de ese tipo de toxina.

La intoxicación es causada por la ingestión de la exotoxina producida por Cl. botulinum, no por el microorganismo en sí. Al ingerir un alimento que contenga la neurotoxina de botulismo, permite que la toxina penetre al sistema circulatorio por vía intestinal. Las toxinas pueden ser inactivadas calentándolas por 10 minutos a 212°F (100°C). Los tipos A, C y D son proteolíticos; es decir, que producen un olor putrefacto.

El Clostridium botulinum es un organismo productor de gas pero no muy prolfífico: las latas contaminadas con este microorganismo normalmente producen un ligero abombamiento, no muy grande; incluso en ciertos casos puede no abombarse<sup>57</sup>. La temperatura óptima de crecimiento para el desarrollo de la toxina es de 65 a 85°F (18.3 a 29.4°C). De un 5-10% de sal que contenga el pro-- ducto, previene el desarrollo de Cl. botulinum.

Los síntomas del botulismo aparecen de 8 a 72 horas después de haber ingerido la toxina y son: dificultad al hablar y al tragar, dolor de cabeza, disturbios estomacales, doble visión, pérdida de firmeza en los músculos del -- cuello, dificultad al respirar y parálisis de las extremidades. Esto ocurre -- porque la toxina causa parálisis muscular bloqueando los nervios terminales. -- Usualmente sobreviene la muerte por parálisis de los músculos respiratorios y - asfixia. Algunas veces también presenta náusea, vómito y constipación.

Es difícil diagnosticar esta enfermedad puesto que sus síntomas son similares a los de otras enfermedades. La única terapia conocida es la pronta - aplicación del antisuero pentavalente.

Afortunadamente han sido demasiado pocas las muertes causadas por botulismo (desde 1925 se han reportado sólo 4 en Estados Unidos)<sup>58</sup> gracias a las técnicas de enlatado de hoy en día. Los casos que pudieran haber de botulismo, se deberán a un proceso inadecuado, como es el caso de un incidente reciente con champiñones enlatados que tuvieron una atención inadecuada en las mediciones de penetración de calor: se llenaron demasiado las latas ocasionando una mayor densidad la cual hizo que disminuyera la capacidad de penetración de calor, y provocó que el proceso fuera inadecuado, sobre todo en las latas de mayor capacidad<sup>59</sup>.

#### IV. TECNICAS DE OPERACION PARA DETERMINAR LA RESISTENCIA TERMICA DE MICROORGANISMOS.

El tiempo requerido para que el calor penetre hasta el centro del alimento en el contenedor (el punto de más lento calentamiento) es extremadamente importante, y varía con el alimento y el tamaño y la forma del contenedor. El calor se transmite del exterior de los contenedores hacia el alimento por movimientos de conducción o convección, dependiendo de la consistencia del alimento y la cantidad de líquido presente. Los datos de penetración de calor se afectan por ciertos factores:

- \* El tamaño y forma del contenedor (a mayor tamaño y/o diámetro, - disminuye la penetración del calor)
- \* El tipo y tamaño de las piezas enlatadas (maíz y chícharos se calentarán más rápidamente que carne o pollo)
- \* La cantidad de grasa (la grasa es un aislante térmico)
- \* El tipo del medio de calentamiento utilizado (el vapor calienta más rápido a las latas que el aire seco)

#### 1. TECNICAS OPERATIVAS.

A) Técnica de Tubos TDT ("Tiempo de Muerte Térmica").- Este método fué descrito en 1920 por Bigelow y Esty y modificado posteriormente por Esty y Williams en 1924, para determinar la resistencia térmica de Clostridium botuli-

num y otros organismos contaminantes<sup>60,61,62</sup>, y ha sido utilizado extensivamente<sup>63,64,65,66,67,68,69</sup>.

Esencialmente consiste en someter al producto o el medio inoculado a tratamientos térmicos a distintas temperaturas, durante tiempos diferentes y observar si hay crecimiento después de la incubación. Los tubos TDT son tubos de vidrio resistente de 9 mm de diámetro externo y de 1 mm de espesor de pared. El vidrio no debe ser alcalino para evitar que durante el calentamiento pueda resultar afectado el pH del mismo, con lo que se modificaría la termorresistencia del microorganismo.

En el interior de los tubos se coloca el medio de cultivo que puede ser el propio alimento o un producto artificial de características similares. Se siembran los microorganismos, se cierran los tubos a la llama y se someten a distintos tratamientos térmicos. Cuando las temperaturas que se necesitan no exceden de los 100°C, se puede utilizar un baño maría y si se desea alcanzar -- temperaturas superiores se recurre a un baño de aceite o a pequeñas autoclaves especialmente diseñadas (Figura 2).

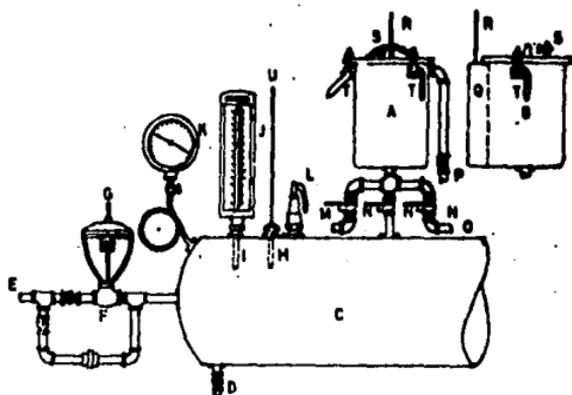
El medio de cultivo debe ocupar unos 2 cm a partir del fondo del tubo y el inóculo suele ser de 10,000 esporas por tubo. El tiempo y temperatura de trabajo deben medirse y controlarse con la mayor precisión posible. Cuando la temperatura es de 100°C y se utiliza el baño maría no es necesario el control termostático, pero sí lo es cuando se utilizan baños de aceite o baños de agua a temperaturas distintas de la de ebullición. Por ejemplo, pueden emplearse temperaturas de 100°C y 105°C con los siguientes tiempos:

Temp. (°C)	Tiempo (minutos)			
100	2	3	5	10
105	0.5	1	2	3

Para cada par tiempo-temperatura conviene tomar, por lo menos, seis tubos. Una vez tratados, se enfrían rápidamente y se someten a un período de incubación, que oscila, según el tipo de microorganismo entre dos y diez semanas. Finalmente, se observa si hay desarrollo de microorganismos (producción de gas, enturbiamiento del medio, cambios de pH, etc.). Otra posibilidad es --

FIGURA 2<sup>o</sup>

ESQUEMA DE UN AUTOCLAVE PARA LA MEDIDA DEL TIEMPO  
DE DESTRUCCION TERMICA



Esquema de un autoclave para la medida del tiempo de destrucción térmica  
(cortesía de National Canners Association)

- |  |  |
|--|--|
| A - Autoclave (vista de frente)                              | J - Termómetro de mercurio                     |
| B - Autoclave (vista de perfil)                              | K - Manómetro                                  |
| C - Cámara de vapor  | L - Válvula de seguridad                       |
| D - Fuga de la cámara de vapor                               | M - Fuga del autoclave                         |
| E - Entrada del vapor  | N - Válvula de acción rápida                   |
| F - Válvula automática de control de la<br>entrada del vapor | U - Entrada de agua al autoclave               |
| G - Conducción de aire del regulador de<br>temperatura       | P - Reboilero                                  |
| H - Bulbo o elemento sensor del regulador<br>de temperatura  | Q - Aislamiento del termómetro del autoclave   |
| I - Bulbo de termómetro de mercurio                          | R - Termómetro de mercurio                     |
|  | S - Válvula alambra                            |
|  | T - Palaneta de cierre                         |
|  | U - Línea de vapor al regulador de temperatura |

sembrar el contenido de los tubos en placas Petri con medios de cultivo enriquecidos; este sistema tiene la ventaja de poder efectuar después un recuento de colonias.

B) Técnica de Latas TDT.- La American Can Company (1943) describió esta técnica, que consiste en utilizar unos envases especialmente diseñados de 3.5 cm. de diámetro y 0.95 cm. de altura. El sistema de operación es similar al de los tubos TDT y su aplicación resulta idónea para productos sólidos o muy viscosos -carne, pescado- que difícilmente podrían introducirse en los tubos. La poca altura de los botes tiene por objeto facilitar la rápida penetración del calor y el posterior enfriamiento.

El sistema de introducción del producto en los envases -previamente esterilizados- depende de la naturaleza del mismo: los viscosos se introducen con una pipeta; si se trata de piezas sólidas con jarabe o salmuera, se colocan las primeras y se adiciona la fracción líquida con una pipeta, procurando que la relación sólido-líquido sea similar a la de los envases comerciales. El inóculo puede introducirse en el envase antes o después del llenado, aunque este último sistema es más eficaz. Los envases se cierran a vacío, se someten a los tratamientos térmicos elegidos -similares a los de los tubos TDT- se enfrían rápidamente y se incuban. La incubación dura hasta 6 meses, pero ya a los 7 ó 10 días pueden observarse algunos cambios.

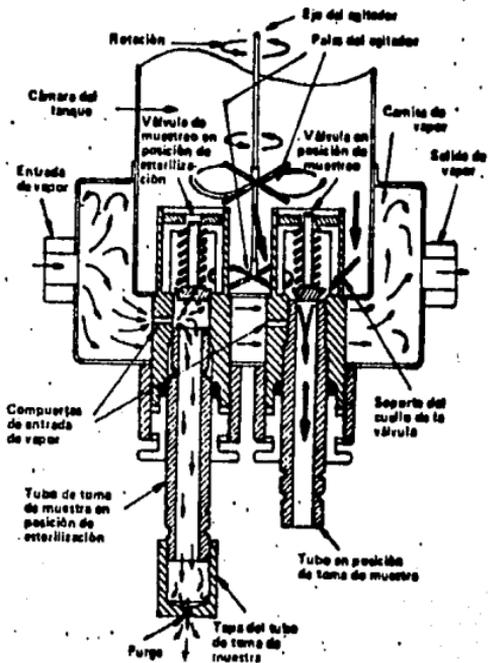
Con este sistema es difícil realizar cultivos posteriores, pero en caso de interés pueden hacerse abriendo el envase asépticamente y trasladando su contenido a un tubo o frasco con un medio de cultivo adecuado.

C) Técnica de la Cámara (Tank).- En 1937, Williams, Merrill y Cameron describieron otro método de medida utilizando una cámara termostataada especial (Figura 3). Consiste en inocular el producto en frío e introducirlo en la cámara, que está constituida por un depósito rodeado por una amplia camisa de vapor. El producto se agita continuamente con unas paletas para favorecer la penetración del calor. El depósito tiene cuatro salidas para extraer las muestras al cabo de los períodos de tiempo previamente establecidos.

D) Termorresistómetro.- Para estudiar la resistencia de las esporas a altas temperaturas, C. R. Stumbo (1948) diseñó un aparato llamado Termo--

FIGURA 3<sup>71</sup>

ESQUEMA DEL TANQUE UTILIZADO PARA MEDIR EL  
TIEMPO DE DESTRUCCION TERMICA  
(cortesía de National Canners Ass.)



resistómetro. Consta de tres cámaras conectadas en línea, cada una de ellas provista de una entrada y de una salida de vapor individuales. Después de pre-esterilizar las tres cámaras, se cierra la entrada de vapor de la primera y de la tercera y se mantiene abierta la de la segunda, hasta conseguir en ésta la temperatura deseada. El producto entra en la primera cámara colocado en unas pequeñas cubetas de 0.1 ml. de capacidad, las cuales se han depositado en unas bandejas especiales; mediante una cadena transportadora, pasa a la segunda cámara, donde se mantiene el tiempo prefijado en el ensayo. Después, pasa a la tercera cámara, donde las cubetas lo dejan caer sobre unos tubos que contienen el medio de cultivo elegido y se procede a la incubación de los mismos. Tanto la entrada como la salida del aparato y el paso de una cámara a otra, están diseñados de forma que se eviten las pérdidas de vapor y de presión. Los cambios térmicos a que se somete el producto -calentamiento y enfriamiento- son muy rápidos por el pequeño volumen de la muestra, lo que permite conseguir una gran precisión en la magnitud de los tratamientos térmicos programados.

## 2. TRAZADO DE LA GRAFICA DE DESTRUCCION TERMICA.

Con las técnicas antes descritas se obtiene información sobre el comportamiento de los microorganismos ante los diferentes tratamientos térmicos. Los datos recopilados permiten trazar la gráfica de destrucción térmica. Para ello se toman los tiempos máximos de supervivencia y los tiempos mínimos letales a cada temperatura. En papel semilogarítmico se colocan en el eje de las ordenadas los tiempos y en el de las abscisas las temperaturas. Como la temperatura es una función logarítmica del tiempo se obtiene una recta (Figura 4). A partir de esta recta o de su prolongación pueden deducirse los tiempos de destrucción térmica a cualquier temperatura. La recta debe trazarse de forma que todos los puntos de supervivencia térmica estén por debajo de la misma. De la gráfica obtenida se puede deducir el valor de  $z$ , que corresponde al intervalo de temperaturas necesario para que la recta atraviese un ciclo logarítmico. Es decir,  $z$  representa el intervalo de temperatura correspondiente a un aumento o disminución de diez veces el tiempo de destrucción térmica. El número de minutos necesario para destruir un número conocido de microorganismos, a una temperatura determinada, se representa por la letra  $F$ .



Los dos valores,  $z$  y  $F$ , son suficientes para definir el comportamiento de los microorganismos frente al tratamiento para las conservas. Generalmente este tiempo se expresa de la siguiente forma:  $F_{T^{\circ}C}^z$ . Por ejemplo,  $F_{100}^{12}$  representa el número de minutos necesario para destruir un número determinado de microorganismos a una temperatura de  $100^{\circ}C$  cuando  $z$  es igual a  $12^{\circ}C$ . Cuando la temperatura es  $121^{\circ}C$  ( $250^{\circ}F$ ) y  $z=10^{\circ}C$  ( $18^{\circ}F$ ), el valor de  $F$  se denomina  $F_0$  ( $F_{250}^{18}$  en la literatura inglesa), por ser un valor muy común en los procesos de esterilización. Siempre que se conozca  $F_0$  se puede, con este solo dato, trazar la gráfica de destrucción térmica.

### 3. CALCULO DEL TIEMPO DE DESTRUCCION TERMICA.

El tiempo de destrucción térmica a una temperatura determinada, se puede obtener directamente de la gráfica de destrucción (Figura 4) o bien calcularse matemáticamente.

En este último caso se construye una figura similar a la Figura 5. En ella se observa que por semejanza de triángulos:

$$\frac{\log t - \log F_{121}}{\log 10} = \frac{121 - T}{z}$$

Como  $\log 10=1$ ,

$$\log \frac{t}{F_{121}} = \frac{121 - T}{z}$$

$$\frac{t}{F_{121}} = 10^{\frac{121 - T}{z}}$$

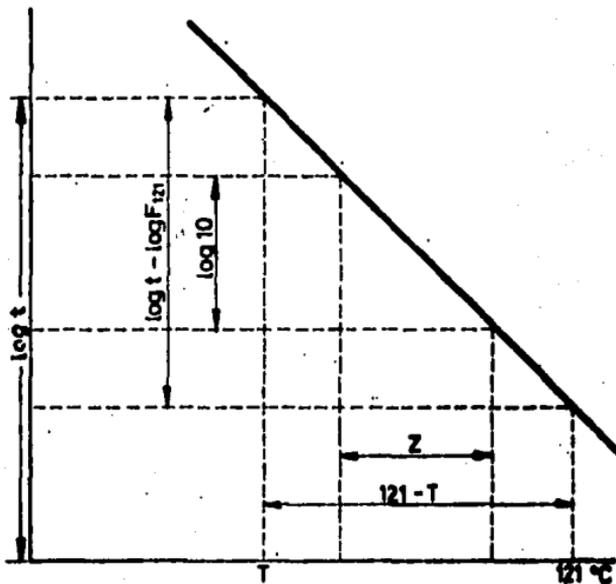
$$t = F_{121} \cdot 10^{\frac{121 - T}{z}}$$

Conociendo el valor de  $F_{121}$  y de  $z$ , se puede obtener fácilmente  $t$ ; si  $F_{121} = F_0$ , la expresión de  $t$  es:

$$t = F_0 \cdot 10^{\frac{121-T}{z}}$$

FIGURA 5<sup>73</sup>

CALCULO MATEMATICO DE t

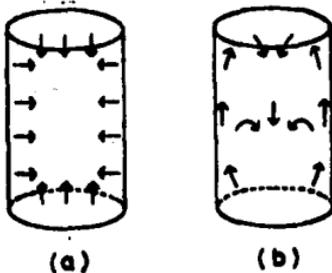


#### 4. PENETRACION DE CALOR EN EL ENVASE.

A) MECANISMOS DE PENETRACION DE CALOR.- La penetración de calor en el envase depende de numerosos factores; de todos ellos, uno de los más importantes es la naturaleza del producto envasado, que condiciona por sí misma el mecanismo y la velocidad de propagación del calor en su seno.

En los alimentos sólidos el calor se propaga por conducción (Figura 6-a). Este mecanismo es el más lento y obliga a un sobrecalentamiento del producto que está en contacto directo con las paredes del envase más cercanas a la fuente calefactora. En los alimentos líquidos el calentamiento se lleva

FIGURA 6<sup>74</sup>



Transmisión de calor: a) por conducción; b) por convección

a cabo por convección (Figura 6-b), formándose corrientes - dentro de la masa líquida originadas por la disminución de densidad del producto al calentarse. Las diferencias térmicas dentro del envase son mínimas en cualquier momento del proceso. Toda sustancia que dificulte las corrientes de convección -almidón, azúcar, etc.- disminuye la termopetración.

Cuando se enlatan productos - sólidos en el seno de líquidos, la penetración depende tanto de

la proporción sólido-líquido como de la colocación de los sólidos en el interior de los líquidos. La presencia de huecos permite la formación de las corrientes de convección y facilita la transmisión de calor.

Algunos alimentos cambian de estructura durante el calentamiento y se observa, al estudiar la penetración de calor en los mismos, dos períodos bien diferenciados. En el primero, con el producto en estado de sol, el calor se transmite rápidamente por convección, para después disminuir bruscamente la velocidad de transmisión y entrar en un segundo período en el que el calor se propaga por conducción a través del producto en estado de gel.

En cualquier caso, la penetración del calor depende del gradiente de temperatura entre el envase y el autoclave. La velocidad de penetración disminuye al hacerlo este gradiente; por ello, la penetración es más rápida cuanto mayor es la temperatura del autoclave.

En los productos que son demasiado viscosos para permitir la formación de corrientes de convección, pero suficientemente líquidos para mezclarse por agitación, y en los productos constituidos por sólidos en el seno de líquidos, la agitación de los botes durante el tratamiento térmico favorece la penetración del calor.

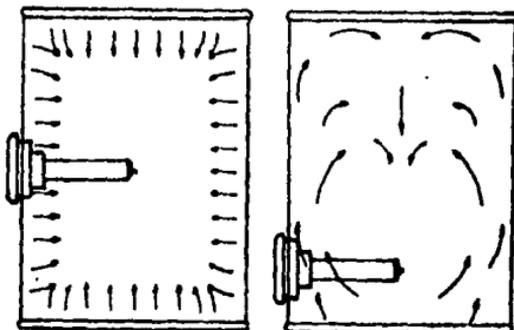
**B) MEDIDA DE LA PENETRACION DE CALOR.**- Para medir la penetración de calor suelen utilizarse los pirómetros, constituidos por un par termoelectrico, - al que se le ha adicionado un potenciómetro, y unas agujas terminales que son - las que se introducen en el envase. Los pares termoelectricos (o termopares), están formados por dos varillas de metales distintos -generalmente cobre y constantano, aunque pueden emplearse otros metales o aleaciones- que se ponen en - contacto por sus extremos, formando un circuito cerrado. Si se mantienen las - soldaduras a temperaturas diferentes, se origina, entre ambas, una corriente eléctrica, cuya medida indica las diferencias de temperatura entre los dos extremos del termopar. En la práctica, una de las uniones se coloca en el interior del envase y la otra se mantiene a una temperatura constante. La medida se obtiene en milivoltios o directamente en grados de temperaturas. En los modelos actuales no se necesitan mantener a una temperatura constante pues ya vienen - compensados para la temperatura ambiente. El extremo de la aguja debe colocarse en el punto de menor calentamiento del envase (en los envases de vidrio, se coloca en los laterales del envase o en la tapa), y la situación de éste depende de las características del producto enlatado. (Figura 7). En los productos sólidos o muy viscosos se toma como punto de menor calentamiento el centro geométrico del bote. En los alimentos líquidos, el punto de menor calentamiento - está situado entre el centro geométrico del envase y fondo del mismo, aunque se considera que coincide con el centro para facilitar la realización de la medida.

Para estudiar la penetración de calor en un producto, deben realizarse medidas simultáneas en varios envases colocados en distintos lugares del autoclave. Para pasar los cables del interior al exterior del autoclave puede

hacerse un orificio en el cuerpo del mismo y cubrirlo con un tapón perforado, de forma que la parte de menor diámetro del mismo quede hacia afuera de manera que al aumentar la presión se ajuste cada vez más. Con este método las pérdidas de vapor son insignificantes y carecen de importancia. Otra forma de sacar los cables es directamente por el cierre de la tapa, ya que

la junta o guarnición de goma lo permite. Estas técnicas son para cuando la esterilización se realiza en autoclaves estáticos discontinuos. En los procesos continuos o con agitación, la medida de la transmisión de calor es mucho más compleja.<sup>76,77</sup>

F I G U R A 7<sup>75</sup>



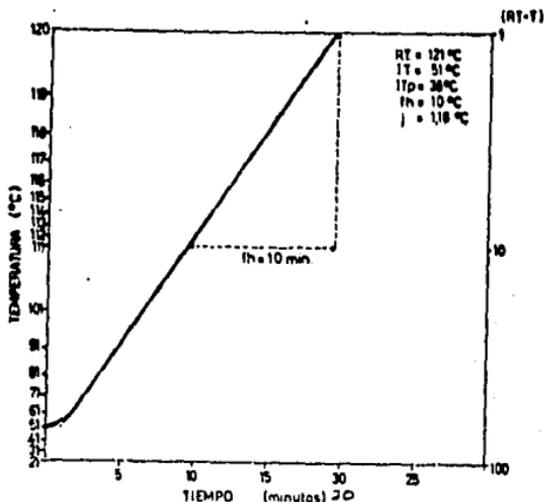
Colocación del pirómetro para la medida de penetración del calor, según la naturaleza del producto

**C) TRAZADO DE LA GRAFICA DE PENETRACION DE CALOR.**- Utilizando un sistema de coordenadas normal, se colocan en las abscisas el tiempo en minutos y en las ordenadas, la temperatura. Esta representación se utiliza para calcular los datos de esterilización por el método gráfico.

Otra forma de trazado consiste en utilizar papel semilogarítmico y representar en la escala decimal (abscisas) el tiempo y en la logarítmica (ordenadas), la diferencia entre la temperatura del autoclave y la del envase (RT-T). En vez de efectuar esta sustracción para cada punto es más sencillo invertir el papel y representar las temperaturas del centro del envase directamente; así se obtiene una gráfica similar a la de la Figura 8. La gráfica es una recta con un pequeño tramo curvo al principio, el cual se debe a un período inicial en el que la temperatura del autoclave se eleva hasta alcanzar la elegida para el proceso.

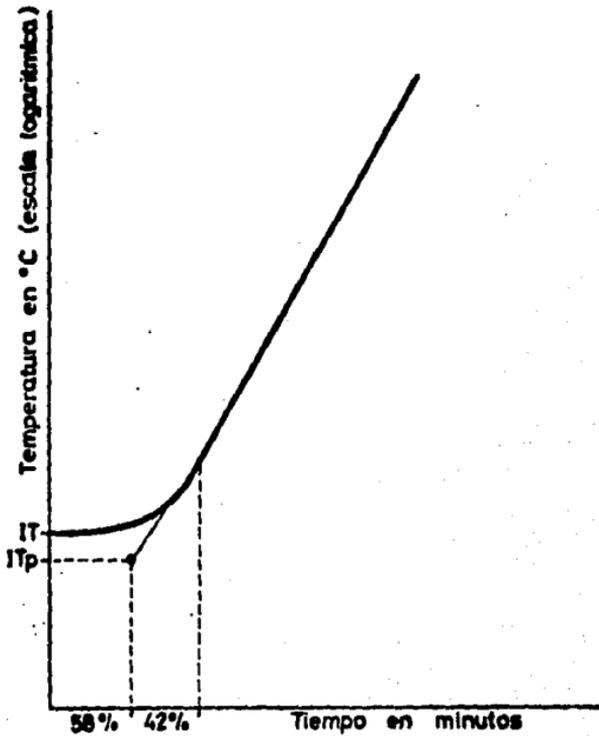
FIGURA 8<sup>78</sup>

GRAFICA DE PENETRACION DE CALOR



El tiempo que tarda en hacerlo se denomina período de inercia ("coming up time"). Ball (1928) estableció experimentalmente el efecto de este período sobre el proceso térmico y llegó a la conclusión de que era equivalente a considerar que el producto estaba sometido a la temperatura final durante un 42% del tiempo que comprende dicho período. Para tener en cuenta este efecto en los cálculos matemáticos, se define la temperatura inicial teórica o pseudoinicial, gráficamente, (Figura 9): en la curva de calentamiento se prolongan la parte recta hasta su intersección con una línea vertical, que representa el principio del tratamiento, trazada de forma que incluya el valor letal del período de inercia (tiempo durante el cual el autoclave se calienta hasta alcanzar la temperatura final). En la práctica, esta vertical se traza por el punto del eje de abscisas que corresponde al 58% del período de inercia. La temperatura correspondiente al punto de intersección con la recta de calentamiento es la temperatura inicial teórica

FIGURA 9<sup>79</sup>  
CALCULO DE LA TEMPERATURA PSEUDOINICIAL



o pseudo inicial.

La gráfica de penetración de calor (Fig. 8) se define por los valores  $j$  y  $f_h$ . El valor de  $j$  (factor de inercia o retardo) se obtiene dividiendo la diferencia entre la temperatura del autoclave y la pseudo inicial, por la diferencia entre aquella y la inicial real. Matemáticamente:

$$\begin{aligned} RT-IT &= I \\ RT-IT_p &= jI \end{aligned} \quad (1)$$

de donde:

$$j = \frac{jI}{I}$$

sustituyendo en esta expresión los valores de  $jI$  y de  $I$ , definidos en (1), se obtiene:

$$j = \frac{RT-IT_p}{RT-IT}$$

Cuando el factor de inercia ( $j$ ) es igual a la unidad, las temperaturas iniciales, real y teórica, son iguales.

El factor  $f_h$  es el número de minutos correspondiente a un ciclo logarítmico de la escala térmica. Por ser la inversa de la pendiente de la recta, es una medida, también inversa, de la velocidad de penetración de calor.

Si al representar la curva de penetración de calor en un papel semilogarítmico, no se obtiene una recta, indica que la penetración de calor en el proceso que se estudia, no es uniforme y, por lo tanto, no puede calcularse matemáticamente.

## 5. MÉTODOS DE CÁLCULO DEL TIEMPO DE ESTERILIZACIÓN.

Una vez obtenidos los datos de tiempo y temperatura para un producto determinado, por medio de estudios de penetración de calor, esa información puede analizarse por uno de los dos métodos siguientes:

- 1) Método General o Gráfico de Bigelow et. al.
- 2) Método de Fórmulas de Ball.

Ambos métodos se basan en idénticos principios, pero el procedimiento que se usa es diferente. El método gráfico se usa cuando se desea medir el valor de esterilización exacto de un proceso, en caso de que condiciones tales como el tiempo de alcance de la temperatura en el autoclave, la temperatura del agua - de enfriamiento o el tiempo de mantenimiento de temperatura después del proceso - pero antes de enfriar con agua, sean diferentes de los procedimientos normales de operación del autoclave. Este método se adapta también a las condiciones en que la curva de penetración de calor no pueda representarse mediante una o dos líneas rectas, dentro del rango de temperatura letal, sobre papel semi-logarítmico. No se adapta fácilmente al cálculo de procesos cuando la temperatura del autoclave - y/o la temperatura inicial son diferentes de aquellas que sirvieron para obtener los factores térmicos originales del proceso. Para usar el método gráfico hay - que registrar los datos de tiempo y temperatura durante el ciclo de enfriamiento.

El método de las fórmulas se usa cuando la curva de penetración de calor puede representarse por no más de dos líneas rectas sobre papel semi-logarítmico. La fórmula permite la evaluación de los procesos para condiciones de - temperatura inicial y de autoclave diferentes de aquellos que se usaron para obtener los factores térmicos. En el caso de curvas de calentamiento representadas por una línea, únicamente, en papel semi-logarítmico, los factores de penetración de calor pueden convertirse a diferentes tamaños de envases.

Es necesario establecer una norma para el valor de esterilización. El interés dominante en los procesos de alimentos enlatados concierne a los productos de baja acidez. Con estos alimentos, se ha establecido la temperatura de 250°F (121.1°C) como la temperatura de referencia, y el calor letal, o cantidad - de calor necesaria para destruir los microorganismos, se expresa en términos de - minutos a 250°F (121.1°C). Esta es la temperatura de referencia.

1) Método General o Gráfico. - Como ya se mencionó, el calor letal de un proceso se expresa en minutos a 250°F (121.1°C) y, por definición, un valor de esterilización de 1 equivale a un minuto a 250°F (121.1°C), o a la cantidad de calor equivalente. El símbolo para el valor de esterilización es  $F_0$ . Un minuto a 250°F (121.1°C) equivale a 10 minutos a 232°F (111.1°C) ó a 100 minutos a 214°F (101.1°C). En otras palabras, por cada 18°F de caída de temperatura, el tiempo

necesario para obtener una destrucción bacteriana equivalente, aumenta 10 veces<sup>80</sup>.

La tasa de letalidad ( $F_0$ ) o el valor de esterilización efectivo en un minuto a otras temperaturas puede expresarse en esta forma:

$$F_0 = \frac{1}{\log^1 \frac{(250-T)}{18}}$$

En la Tabla 3 aparecen los valores de la tasa de letalidad en el rango de temperatura de 200 a 260°F (93 a 127°C). Las cifras de Tasa de Letalidad pueden trazarse contra las de los tiempos en sistema de coordenadas, en papel milimétrico, para obtener una curva de rapidez letal (Ver Figura 10).

FIGURA 10<sup>81</sup>

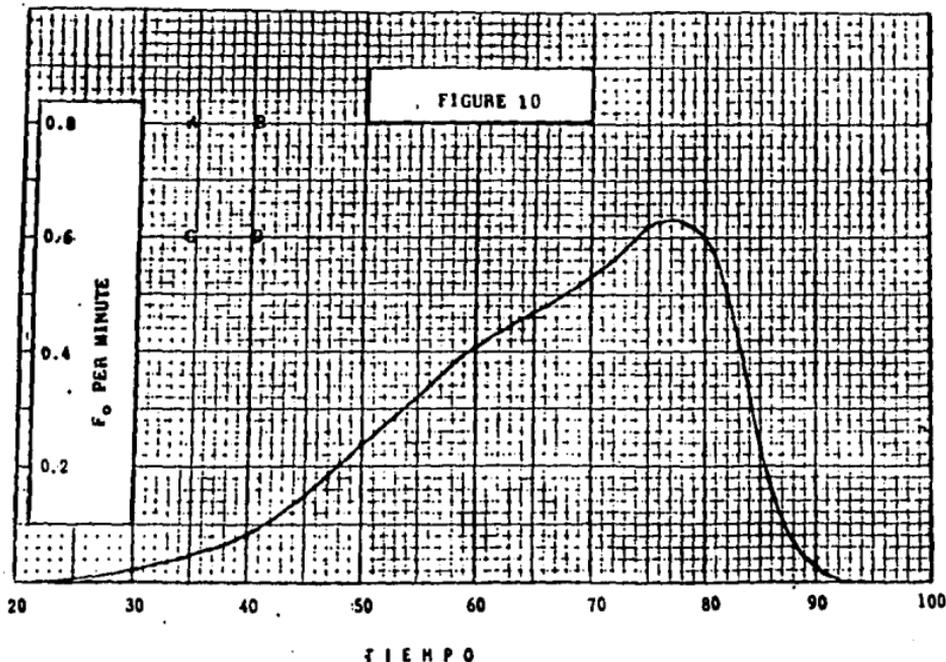


Tabla 3<sup>82</sup>  
TASA DE LETALIDAD

TEMP. °F.	(Tasa de decesos)									
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
190	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001
191	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
192	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
193	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
194	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
195	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
196	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
197	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
198	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
199	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
200	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
201	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
202	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
203	0.002	0.002	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
204	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
205	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.004	0.004
206	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
207	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	0.005
208	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
209	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006
210	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.006	0.007	0.007	0.007
211	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.007	0.008	0.008
212	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.009	0.009
213	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.010	0.010	0.010	0.010
214	0.010	0.010	0.010	0.010	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011
215	0.011	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.013	0.013
216	0.013	0.013	0.013	0.013	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
217	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016
218	0.017	0.017	0.017	0.017	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	0.019
219	0.019	0.019	0.019	0.020	0.020	0.020	0.020	0.021	0.021	0.021
220	0.022	0.022	0.022	0.022	0.023	0.023	0.023	0.024	0.024	0.024
221	0.024	0.025	0.025	0.025	0.026	0.026	0.026	0.027	0.027	0.027
222	0.028	0.028	0.029	0.029	0.029	0.030	0.030	0.030	0.031	0.031
223	0.032	0.032	0.032	0.033	0.033	0.034	0.034	0.035	0.035	0.035
224	0.036	0.036	0.037	0.037	0.038	0.038	0.039	0.039	0.040	0.040
225	0.041	0.041	0.042	0.042	0.043	0.044	0.044	0.045	0.045	0.046
226	0.046	0.047	0.048	0.048	0.049	0.049	0.050	0.051	0.051	0.052
227	0.053	0.053	0.054	0.055	0.056	0.056	0.057	0.058	0.058	0.059
228	0.060	0.061	0.062	0.062	0.063	0.064	0.065	0.066	0.066	0.067
229	0.068	0.069	0.070	0.071	0.072	0.073	0.074	0.075	0.075	0.076

Tabla 3  
TASA DE LETALIDAD  
 (Continuación.)

TEMP. °F.	(Temps. of degrees)									
	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
230	0.077	0.078	0.079	0.080	0.081	0.083	0.084	0.085	0.086	0.087
231	0.088	0.089	0.090	0.091	0.093	0.094	0.095	0.096	0.097	0.099
232	0.100	0.101	0.103	0.104	0.105	0.107	0.108	0.109	0.111	0.112
233	0.114	0.115	0.117	0.118	0.120	0.121	0.123	0.124	0.126	0.128
234	0.129	0.131	0.133	0.134	0.136	0.138	0.139	0.141	0.143	0.145
235	0.147	0.149	0.151	0.153	0.154	0.156	0.158	0.161	0.163	0.165
236	0.167	0.169	0.171	0.173	0.176	0.178	0.180	0.182	0.185	0.187
237	0.190	0.192	0.194	0.197	0.200	0.202	0.205	0.207	0.210	0.213
238	0.215	0.218	0.221	0.224	0.227	0.230	0.233	0.236	0.239	0.242
239	0.245	0.248	0.251	0.254	0.258	0.261	0.264	0.268	0.271	0.275
240	0.278	0.282	0.285	0.289	0.293	0.297	0.300	0.304	0.308	0.312
241	0.316	0.320	0.324	0.329	0.333	0.337	0.341	0.346	0.350	0.355
242	0.359	0.364	0.369	0.373	0.378	0.383	0.388	0.393	0.398	0.403
243	0.408	0.414	0.419	0.424	0.430	0.435	0.441	0.447	0.452	0.458
244	0.464	0.470	0.476	0.482	0.489	0.495	0.501	0.508	0.514	0.521
245	0.527	0.534	0.541	0.548	0.555	0.562	0.570	0.577	0.584	0.592
246	0.599	0.607	0.615	0.623	0.631	0.639	0.647	0.656	0.664	0.673
247	0.681	0.690	0.699	0.708	0.717	0.726	0.736	0.745	0.755	0.764
248	0.774	0.784	0.794	0.805	0.815	0.825	0.836	0.847	0.858	0.869
249	0.880	0.891	0.903	0.914	0.926	0.938	0.950	0.962	0.975	0.987
250	1.000	1.013	1.026	1.039	1.053	1.066	1.080	1.094	1.108	1.122
251	1.136	1.151	1.166	1.181	1.196	1.212	1.227	1.243	1.259	1.275
252	1.292	1.308	1.325	1.342	1.359	1.377	1.395	1.413	1.431	1.449
253	1.468	1.487	1.506	1.525	1.545	1.565	1.585	1.605	1.626	1.647
254	1.658	1.690	1.711	1.733	1.756	1.778	1.801	1.824	1.848	1.872
255	1.896	1.920	1.945	1.970	1.995	2.021	2.047	2.073	2.100	2.127
256	2.154	2.182	2.210	2.239	2.268	2.297	2.328	2.356	2.387	2.417
257	2.448	2.480	2.512	2.544	2.577	2.610	2.644	2.678	2.712	2.747
258	2.783	2.818	2.855	2.891	2.929	2.966	3.005	3.043	3.082	3.122
259	3.162	3.203	3.244	3.286	3.328	3.371	3.415	3.459	3.503	3.548
260	3.594	3.640	3.687	3.734	3.782	3.831	3.881	3.930	3.981	4.032
261	4.084	4.137	4.190	4.244	4.299	4.354	4.410	4.467	4.524	4.583
262	4.642	4.701	4.762	4.823	4.885	4.948	5.012	5.076	5.142	5.208
263	5.275	5.343	5.412	5.481	5.552	5.623	5.696	5.769	5.843	5.919
264	5.995	6.072	6.150	6.229	6.310	6.391	6.473	6.556	6.641	6.726
265	6.813	6.901	6.989	7.079	7.171	7.263	7.356	7.451	7.547	7.644
266	7.743	7.842	7.943	8.046	8.149	8.254	8.360	8.468	8.577	8.687
267	8.799	8.913	9.027	9.143	9.261	9.380	9.501	9.624	9.747	9.873
268	10.000	10.129	10.259	10.391	10.525	10.661	10.798	10.937	11.078	11.220
269	11.365	11.511	11.659	11.809	11.961	12.115	12.271	12.429	12.589	12.751
270	12.915	13.082	13.250	13.421	13.594	13.769	13.946	14.125	14.307	14.491

T A B L A 4<sup>83</sup>VALORES DE  $F_1$  PARA DIVERSAS TEMPERATURAS DE RETORTA ( °F. )

RT	$F_1$	RT	$F_1$	RT	$F_1$
214	100.00	233	8.799	252	0.7743
215	87.99	234	7.743	253	0.6813
216	77.43	235	6.813	254	0.5995
217	68.13	236	5.995	255	0.5275
218	59.92	237	5.275	256	0.4642
219	52.75	238	4.642	257	0.4085
220	46.42	239	4.085	258	0.3594
221	40.85	240	3.594	259	0.3163
222	35.94	241	3.163	260	0.2783
223	31.63	242	2.783	261	0.2449
224	27.83	243	2.449	262	0.2154
225	24.48	244	2.154	263	0.1896
226	21.54	245	1.896	264	0.1668
227	18.96	246	1.668	265	0.1468
228	16.68	247	1.468	266	0.1292
229	14.68	248	1.292	267	0.1136
230	12.92	249	1.136	268	0.1000
231	11.36	250	1.000	269	0.0880
232	10.000	251	0.8799	270	0.0774

Puesto que la distancia vertical en esta curva para cada minuto - representa el  $F_0$  efectivo en ese minuto, se deduce que el valor total de esterilización es igual a la suma de todas las distancias verticales para cada minuto del proceso. Es decir, que el valor de esterilización es proporcional al área que haya debajo de la curva.

Es necesario medir el área bajo la curva para determinar el valor de esterilización. Esto puede hacerse contando los cuadros pequeños o con un instrumento llamado planímetro. El área en pulgadas cuadradas tiene que multiplicarse por un factor para convertirla en medidas  $F_0$ . Este factor se encuentra determinando el área de una unidad de esterilización, tal como la superficie ABCD en la Figura 10. El producto de la altura por el ancho de esta área, en términos de  $F_0$  por minuto y tiempo, es la unidad. El factor buscado para multiplicar por el área en pulgadas cuadradas, bajo la curva de tasa de letalidad, es la recíproca del área en pulgadas cuadradas, del rectángulo de la unidad de esterilización.

2) Método de las Fórmulas. - Cuando la curva de penetración de calor se representa por una o dos líneas rectas en papel semi-logarítmico, es -- posible hacer correcciones y/o extrapolaciones para aquellos factores, con la ayuda del Método de las Fórmulas. En este estudio no será necesario utilizarlo ya que no se requiere extrapolar, puesto que se realizarán diferentes experimentos con los que se obtendrán los datos necesarios.

CAPITULO 2. MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

Para las pruebas de Penetración de Calor:

- \* 4 Termopares y Potenciómetro marca ELEKTROLABORATORIET, Copenhagen Z9-CT
- \* Latas de Champiñones enteros ("botón") y rebanados (tamaños 211 x 300; 303 x 406 y 401 x 411, de ambas presentaciones)
- \* Autoclave vertical fija

Para el Paquete Experimental Inoculado:

- 90 latas 211 x 300 de botón, de las que se inoculan 60
- 120 latas 303 x 406 de botón, de las que se inoculan 80
- 150 latas 401 x 411 de botón, de las que se inoculan 100
- 120 latas 211 x 300 de champiñón rebanado, de las que se inoculan 80
- 150 latas 303 x 406 de champiñón rebanado, de las que se inoculan 100
- 180 latas 401 x 411 de champiñón rebanado, de las que se inoculan 120
- 120 latas 211 x 300 de piezas y tallos de champiñón, inoculándose 80
- 120 latas 303 x 406 de piezas y tallos de champiñón, inoculándose 80
- 180 latas 401 x 411 de piezas y tallos de champiñón, inoculándose 120
- 1230 latas de las que se marcan 820 con la clave "INOC" (las inoculadas)
  - \* Inóculo:  $1 \times 10^4$  esporas P.A.3679/mililitro
  - \* Jeringa de pipeteo continuo automático (Becton, Dickinson & Co. No. 3052 de 2 ml. de capacidad, ajustada a 1 ml.)
  - \* Autoclave vertical fija
  - \* Potenciómetro
  - \* Buffer pH 7
  - \* Vacuómetro
  - \* NaOH 0.1 N (para la prueba de acidez)
  - \* Fenolftalefina
  - \* Bureta

- \* Balanza Granataria
- \* Tamiz
- \* Agua Destilada
- \* Abrelatas

Para la Prueba Microbiológica:

- \* Latas inoculadas e incubadas a 37°C
- \* Cajas de Petri de 15 x 150 mm estériles
- \* Pipetas bacteriológicas estériles
- \* Espátula estéril
- \* Vaso de licuadora estéril
- \* Frasco de dilución 135 ml de agua peptonada 0.1%
- \* Tubos de 18 x 150 mm, con 9 ml de agua peptonada 0.1%
- \* Portaobjetos
- \* Equipo para la tinción de Gram
- \* Balanza Granataria con sensibilidad de 0.1 gr
- \* Baño María a 44±1°C
- \* Microscopio
- \* Contador de colonias Quebec
- \* Incubadora a 35°C
- \* Generador de Hidrógeno, Gas Pock
- \* Jarra con cierre hermético para las Cajas
- \* Mechero
- \* Medio de Agar-Sulfito-Cicloserina
- \* Medio de Agar anaeróbico
- \* Tubos de 16 x 150 mm con Caldo Tioglicolato
- \* Tubos de 16 x 150 mm con 10 ml de medio para movilidad-Nitrato
- \* Tubos de 16 x 150 mm con 10 ml de medio gelatina-lactosado
- \* Solución de alfa-nafil-amina: 1.0 gr de ác. sulfanílico y 125 ml de ác. acético (prueba de nitritos)
- \* Solución de ácido sulfanílico: 1.0 gr de alfa-nafilamina y ácido acético 5 N (prueba de nitritos)
- \* Frasco de Tarandas con alcohol
- \* Abrelatas

- \* Solución desinfectante
- \* Tubos de 18 x 150 mm con caldo con carne cocida con capa de nujol estéril
- \* Pipetas Pasteur estériles

## MÉTODOS.

1. Se realiza la prueba de Penetración de Calor (para cada tamaño y presentación de latas), introduciendo los termopares en el punto frío. Se procede a leer las temperaturas del proceso minuto a minuto. Obtenidos estos datos se realizan las gráficas de curvas de penetración de calor, tanto en papel milimétrico como en semilogarítmico, colocando los tiempos (t) en el eje de las abscisas (x) y las Temperaturas (T) sobre el eje de las ordenadas (y).

2. Se calcula el proceso térmico necesario para esterilizar el producto por medio del Método General, cuya fórmula para obtener los valores de Letalidad es:

$$F = \frac{1}{\log_{10} \frac{RT-CT}{z}}$$

donde F es el tiempo en minutos para destruir un número dado de microorganismos a una Temperatura dada; RT es la Temperatura del autoclave (250°F=121°C), siendo la Temperatura de referencia empleada para calcular los valores de esterilización en productos de baja acidez; CT es la Temperatura del punto frío (la que marcan los termopares); y z son los grados Fahrenheit o Centígrados que se requieren para que la curva de Muerte térmica atraviese un ciclo logarítmico (intervalo de temperatura correspondiente a un aumento o disminución de 10 veces el tiempo de destrucción térmica). En este estudio tomamos como referencia z=18°F, por lo que "F" se denominará "F<sub>o</sub>", por ser un valor muy común en procesos de esterilización. Estas curvas se grafican en papel milimétrico colocando el tiempo (t) en el eje de las abscisas y a F<sub>o</sub> en el de las ordenadas, obteniéndose el valor de Letalidad F<sub>o</sub>, que posteriormente se compara con los valores teóricos con el fin de verificar si el proceso fué suficiente para destruir al microorganismo en cuestión.

3. Para el Paquete Experimental Inoculado, se efectúan 7 niveles de proceso - con un rango de 5 minutos entre cada uno: de 15 a 45 minutos. Se marcan las - latas que se inocularán, y se inoculan con  $1 \times 10^4$  esporas de P.A.3679, con - ayuda de la jeringa de pipeteo continuo automático. Se efectúan los procesos- indicados en la siguiente tabla:

T A B L A 5

t(min.)	T(°C)	PRODUCTO	L A T A S		TOTAL
			INOC	S/INOC	
15	121	Botón 211x300	20	10	30
		Botón 303x406	20	10	30
		Rebanado 211x300	20	10	30
		Rebanado 303x406	20	10	30
		Pzas. y Tallos 211x300	20	10	30
		SUB-TOTAL	100	50	150
		20	121	Botón 211x300	20
Botón 303x406	20			10	30
Botón 401x411	20			10	30
Rebanado 211x300	20			10	30
Rebanado 303x406	20			10	30
Rebanado 401x411	20			10	30
Pzas. y Tallos 211x300	20			10	30
Pzas. y Tallos 303x406	20			10	30
Pzas. y Tallos 401x411	20			10	30
SUB-TOTAL	180			90	270
25	121	Botón 211x300	20	10	30
		Botón 303x406	20	10	30
		Botón 401x411	20	10	30
		Rebanado 211x300	20	10	30
		Rebanado 303x406	20	10	30
		Rebanado 401x411	20	10	30
		Pzas. y Tallos 211x300	20	10	30
		Pzas. y Tallos 303x406	20	10	30
		Pzas. y Tallos 401x411	20	10	30
		SUB-TOTAL	180	90	270
30	121	Botón 303x406	20	10	30
		Botón 401x411	20	10	30
		Rebanado 211x300	20	10	30

(continúa...)

T A B L A 5

t(min.)	T(°C)	PRODUCTO	L A T A S		TOTAL
			INOC	S/INOC	
		Rebanado 303x406	20	10	30
		Rebanado 401x411	20	10	30
		P. y Tallos 211x300	20	10	30
		P. y Tallos 303x406	20	10	30
		P. y Tallos 401x411	20	10	30
		SUB-TOTAL	100	50	150
35'	121°	Botón 401x411	20	10	30
		Rebanado 303x406	20	10	30
		Rebanado 401x411	20	10	30
		P. y Tallos 303x406	20	10	30
		P. y Tallos 401x411	20	10	30
		SUB-TOTAL	100	50	150
40'	121°	Botón 401x411	20	10	30
		Rebanado 401x411	20	10	30
		P. y Tallos 401x411	20	10	30
		SUB-TOTAL	60	30	90
45'	121°	Rebanado 401x411	20	10	30
		P. y Tallos 401x411	20	10	30
		SUB-TOTAL	40	20	60
T O T A L = 820 INOC + 410 S/INOC =					1230 ====

Posteriormente, los patrones ("S/INOC") se someten a pruebas de control de calidad (pH, acidez, peso neto, peso drenado, espacio de cabeza y vacío) con el fin de verificar si el proceso fue el adecuado, y si el producto mantuvo sus características organolépticas y de calidad. De las latas inoculadas se llevan 4 de cada lote al laboratorio de microbiología para sus respectivos análisis, para determinar la viabilidad de la spora, y el resto se incuban a 37°C por 6 meses. A estas últimas latas se les hace un análisis visual diario con el fin de determinar alguna hinchazón. Después del tiempo requerido de incubación se abren las latas y se determina la presencia del m.o. por medio de las características que debe presentar (olor, pH del alimento, producción de gas, etc.).

4. El análisis microbiológico consiste en:

Recuento en placa:

1. Las latas se lavan con agua y detergente, frotando con fuerza. -
2. Sumergir un extremo de la lata en la solución desinfectante (alcohol al 70%, sal cuaternaria de amonio, bióxido de cloro a concentración 100 p.p.m.) durante 10 min. Escurrir y secar con torunda de algodón.
3. Utilizar un abrelatas o cualquier otro dispositivo (cortador circular, por ejemplo) estéril al autoclave o flameado al mechero. Si la lata presenta a-bombamiento, colocarla en una charola, en posición invertida, y sobre ella - algodón estéril y un embudo sin tallo invertido. Perforar con un clavo o picahielo introducido en el tallo del embudo, sujetando a éste con firmeza. - Dejar escapar todo el gas, que saldrá arrastrando parte del contenido.
4. Trabajando dentro de la zona estéril del mechero, pesar 15g de muestra del alimento en el interior del vaso de licuadora, lavado. Adicionar 135 ml de - agua peptonada al 0.1% y licuar durante 1 min.
5. Continuar las diluciones decimales en agua peptonada al 0.1%.
6. Introducir 1 ml por dilución en caja de Petri. Adicionar a cada una 12-15 ml del medio Agar-sulfito-cicloserina fundido y enfriado a 44<sup>±</sup>1°C. Incorporar el inóculo al medio por rotación de las cajas y dejar solidificar. Adicionar una sobre-capa de 5-10 ml del mismo medio.
7. Dejar solidificar. Incubar en anaerobiosis a 35°C durante 24 a 48 hrs. - (Sistema Gas Pack).
8. Típicamente Clostridium Sporogenes forma colonias negras de 2-4 mm de diámetro. Seleccionar la placa que contenga entre 50 y 100 colonias o esporas - sospechosas. Contarlas y reportarlas previo cálculo como contenido presunto de Clostridium Sporogenes por gramo de alimento (P.A.3679).
9. Confirmar el estudio de la siguiente forma:
  - a) Transferir por separado 10 colonias bien aisladas de la placa seleccionada - a un tubo con caldo tioglicolato. Incubar a 35% durante 18-24 hrs.

b) Preparar un frotis y teñir con la Técnica de Gram para comprobar la pureza del cultivo y la morfología característica de la bacteria: bacilos Gram positivos, gruesos, de  $3 \text{ a } 8 \times 0.8 \text{ a } 1.2$  micras con extremos muy discretamente redondeado. En caso de encontrarse contaminado, resebrar en una placa de Agar-sulfito-cicloserina-yema para conseguir un cultivo puro del germen.

c) Inocular entonces un tubo con el medio de movilidad-nitrato, uno con caldo para esporulación y un medio con gelatina-lactosa. Incubar a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 24 hrs.; no requiere anaerobiosis.

El primero y el tercer tubo se inocularán por picadura; el caldo esporulación con 1 ml del medio del tioglicolato.

d) El medio de movilidad-nitrato P.A.3679, inmóvil, sólo desarrolla a lo largo de la línea de inoculación; las bacterias móviles enturbian difusamente el medio.

e) Adicionar al medio anterior 0.4 ml la solución de alfa naftilamina y 0.5 ml de ácido sulfanílico.

Una coloración entre rosa y rojo dentro de 15 min. denota la presencia de nitratos.

f) Preparar frotis de los cultivos en caldo para esporulación y teñirlos por la técnica de Gram y observar al microscopio.

g) En el medio de gelatina-lactosa, P.A.3679 no vira el medio (fermentación a la lactosa) y licúa la gelatina. Si este principio no es apreciable, prolongar 24 horas la incubación, colocar el cultivo en refrigeración durante 10 min. y efectuar la lectura.

h) A partir del porcentaje de colonias confirmadas de Clostridium Sporogenes (P.A.3679) y el número de colonias presuntivas contadas en la dilución de la placa seleccionada, calcular el número de gérmenes por gramo de muestra.

Método cualitativo:

1. Se inoculan 5 tubos con 1 gr ó 1 ml de muestra en tubos conteniendo caldo con carne cocida. La muestra debe ser inoculada hasta el fondo por medio de una pipeta Pasteur.
2. Incubar a 35°C durante 24 a 48 hrs.
3. Se realiza la tinción de Gram, para identificar su morfología microscópica.
4. Posteriormente se resiembra en placas de Agar Anaeróbico en condiciones de anaerobiosis.
5. Incubar a 35°C durante 24 a 48 hrs.
6. Proceder a su identificación colonial, como bioquímica, siguiendo el paso-#9 de la técnica anterior (Recuento en Placa).

### CAPITULO 3.      RESULTADOS

#### PARTE EXPERIMENTAL

1. Prueba de Penetración de Calor.- Se tomaron 2 latas de cada producto a las que se les introdujo un termopar de cobre-constantano a cada una, en su punto frío. Estos termopares están conectados por el otro extremo al potenciómetro que da las temperaturas directamente en grados Centígrados. Se colocaron las latas dentro del autoclave, colocándose al mismo tiempo los otros dos termopares dentro del autoclave, con el fin de poder medir la temperatura interior con ellos y compararla con la que marca el termómetro de mercurio (T interna del autoclave). Posteriormente se leyeron las temperaturas internas de las latas (de cada termopar) minuto a minuto durante todo el proceso, para que con los datos obtenidos se lograran graficar las curvas de penetración de calor.

2. Con ayuda de la fórmula del Método General (Cap. 2, p. 54) se obtuvieron los valores  $F_0$  para cada proceso y se graficaron las curvas de letalidad. Ver Tablas 1 a 6 y sus respectivas gráficas.

3. Paquete Experimental Inoculado.- INOCULO: Se mandó pedir a la Universidad de Davis, California, E.U.A., una muestra de  $1 \times 10^7$  bacterias liofilizadas de P.A.3679, la cual se diluyó con agua estéril a un litro (1 en 1000) obteniéndose así  $1 \times 10^4$  bacterias/mililitro. Se marcaron 20 latas de cada producto -- para cada proceso (820 latas) con la clave "INOC", las cuales se inocularon con 1 ml de suspensión ( $1 \times 10^4$  bacterias). Se tomaron también 10 latas de cada producto como testigo, para cada proceso. Se sometieron al proceso de esterilización indicado anteriormente: a  $121^\circ\text{C}$  pero con diferencia de 5 minutos entre cada proceso. Después de marcadas las latas se procedió al llenado de cada producto, inoculando justo después de haber hecho el espacio de cabeza, -- antes de cerrar. La inoculación se llevó a cabo con una jeringa de pipeteo -- continuo automático Becton, Dickinson & Co. No. 3052 de 2 ml de capacidad, -- ajustada a 1 ml y esterilizada previamente (se desarma y se pone a hervir en -- agua por 15 minutos), inoculando 1 ml de suspensión que contiene  $1 \times 10^4$  espo -- ras P.A.3679. Posteriormente se metieron a las autoclaves, en los tiempos --

requeridos a 121°C. La temperatura de cierre fue de 70°C y al inicio del proceso de esterilización, de 30°C. Al final del proceso se sacaron las latas de las autoclaves y se separaron por tiempos y productos inoculados y no inoculados. Las no inoculadas (10 latas de cada producto) fueron sometidas a exámenes de control de calidad haciéndoles las pruebas de pH, acidez, peso neto, peso drenado, espacio de cabeza y vacío, encontrando todos estos valores dentro de los rangos permitidos en los procesos actuales. Ninguna lata presentó alteración físicoquímica. Cuatro latas inoculadas de cada lote se llevaron al laboratorio de microbiología para sus respectivos análisis. El resto (16 latas de cada lote) se incubaron a 37°C por 6 meses, con el fin de detectar las latas que se hincharan, pero al término de ese período no hubo ninguna lata deteriorada ni con signos de hinchazón.

4. Prueba Microbiológica. - Ninguna lata presentó alteración alguna, ni presencia del m.o.

## DISCUSION DE RESULTADOS

El cálculo de la penetración de calor en el alimento dentro de la lata, se efectuó con el fin de poder determinar los procesos de esterilización más confiables y efectivos para lograr un producto comercialmente estéril y con el mínimo de daños.

Los datos de penetración de calor se obtuvieron mediante el registro de la variación de temperatura en el alimento dentro de la lata durante el proceso térmico dentro del autoclave.

Con la ayuda de la fórmula del Método General:

$$F = \frac{1}{\log-1 \frac{RT-CY}{Z}}$$

se obtuvieron los datos reportados en las Tablas 1 a 6. El intervalo de tiempo que se consideró para cada anotación fue de 1 minuto, por lo que no afecta al resultado final de  $F_0$ .

Al comparar los valores de esterilización teóricos para P.A.3679 con los que se calcularon por medio de las gráficas, se puede apreciar que el proceso fue excesivo (los valores teóricos varían de  $F_0=7$  a  $F_0=12$  y los obtenidos en el experimento son de  $F_0=25$ ) por lo que se recomienda se lleve a cabo en menos tiempo de proceso, para que, además de asegurar su esterilidad comercial, no se dañe la calidad organoléptica del alimento.

Las gráficas de penetración de calor tienen 3 periodos: calentamiento - proceso - enfriamiento. La recta de calentamiento presenta un pequeño tramo curvo al principio, el cual se debe a un periodo inicial en el que la temperatura del autoclave se eleva hasta alcanzar la elegida para el proceso (es el "periodo de inercia"). Este tipo de rectas se obtiene cuando el calentamiento se lleva a cabo por movimientos de convección, formándose corrientes dentro de la masa líquida originadas por la disminución de densidad del producto al calentarse. La propagación del calor es muy rápida.

Estas gráficas se trazaron en un sistema de coordenadas normal y en papel semilogarítmico invertido (esto con el fin de evitar la sustracción,

(RT-T) para cada punto y representar las temperaturas del centro de la lata directamente).

Al comparar los resultados obtenidos en las dos presentaciones del producto, se puede observar que no hubo diferencias en lo que se refiere al comportamiento de la penetración de calor, por lo que al hacer un estudio para una de estas presentaciones, es válido para la otra.

Los resultados obtenidos con el Paquete Experimental inoculado fueron grandemente satisfactorios, ya que se logró eliminar completamente al microorganismo sin dañar la calidad o las características organolépticas del alimento, obteniendo así su esterilidad comercial.

## T A B L A 1

## CHAMPINON REBANADO

DATOS DE PENETRACION DE CALOR. CONDUCCION DE CALOR EN LATA 211 x 300.  $T_{ref} = 121^{\circ}C$ 

t de calen- tamiento (min.)	Tempera- tura (°C)	Valor Letal (F <sub>o</sub> )	εF <sub>o</sub> /min.	t de calen- tamiento (min.)	Tempera- tura (°C)	Valor Letal (F <sub>o</sub> )	εF <sub>o</sub> /min.
Ab. Vapor							
0	53	0.0000002	0.0000002	31	120	0.774	13.43
1	55	0.0000002	0.0000004	32	120	0.774	14.20
2	59	0.0000006	0.000001	33	120	0.774	14.98
3	61	0.000001	0.000002	34	120	0.774	15.75
4	75	0.00002	0.000022	35	119	0.615	16.37
5	81	0.00001	0.00012	36	120	0.774	17.14
6	87	0.0004	0.0005	37	120	0.774	17.92
7	91	0.001	0.0015	38	120	0.774	18.69
8	95	0.0024	0.004	39	120	0.774	19.47
9	95	0.0024	0.0064	40	120	0.774	20.24
10 Cierre de	97	0.004	0.010	41	120	0.774	21.01
11 Venteo	103	0.0154	0.026	42	120	0.774	21.79
12	109	0.061	0.087	43	120	0.774	22.56
13	115	0.245	0.332	44	120	0.774	23.33
14	117	0.388	0.720	45	120	0.774	24.11
15	118	0.488	1.208	46 Ab.aire	120	0.774	24.88
16	120	0.774	1.983	47 y vent.	111	0.0975	24.977
17	120	0.774	2.757	48 Cierre	95	0.0025	24.979
18	120	0.774	3.531	49 Vapor	91	0.00097	24.980
19	120	0.774	4.305	50 Enfria-	83	0.00015	24.981
20	120	0.774	5.08	51 miento	79	0.000062	24.981
21	120	0.774	5.85	52	73	0.000015	24.981
22	120	0.774	6.627	53 Fin del	73	0.000015	24.981
23	120	0.774	7.400	Proceso			
24	120	0.774	8.175				
25	120	0.774	8.95				
26	119	0.615	9.56				
27	120	0.774	10.34				
28	120	0.774	11.11				
29	120	0.774	11.88				
30	120	0.774	12.66				

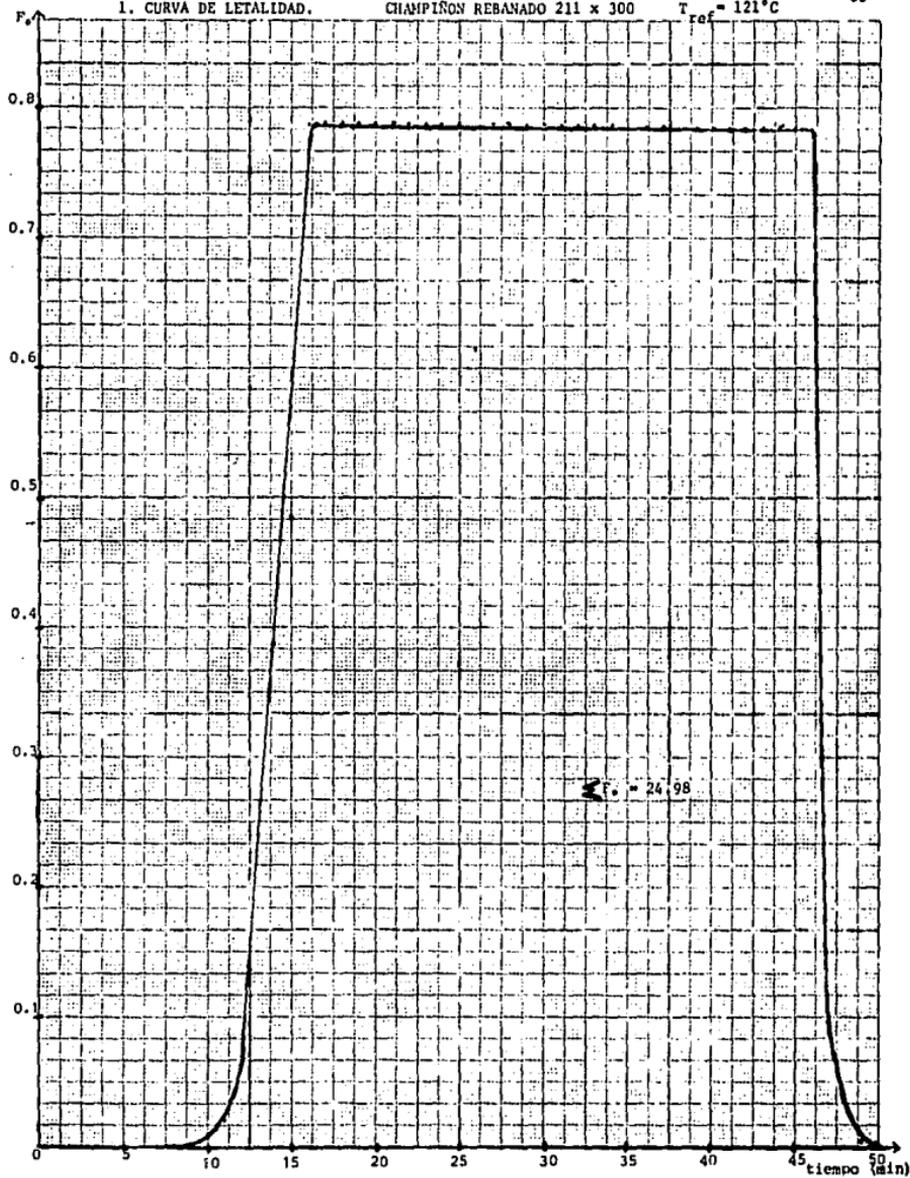
εF<sub>o</sub> = 24.981

1. CURVA DE LETALIDAD.

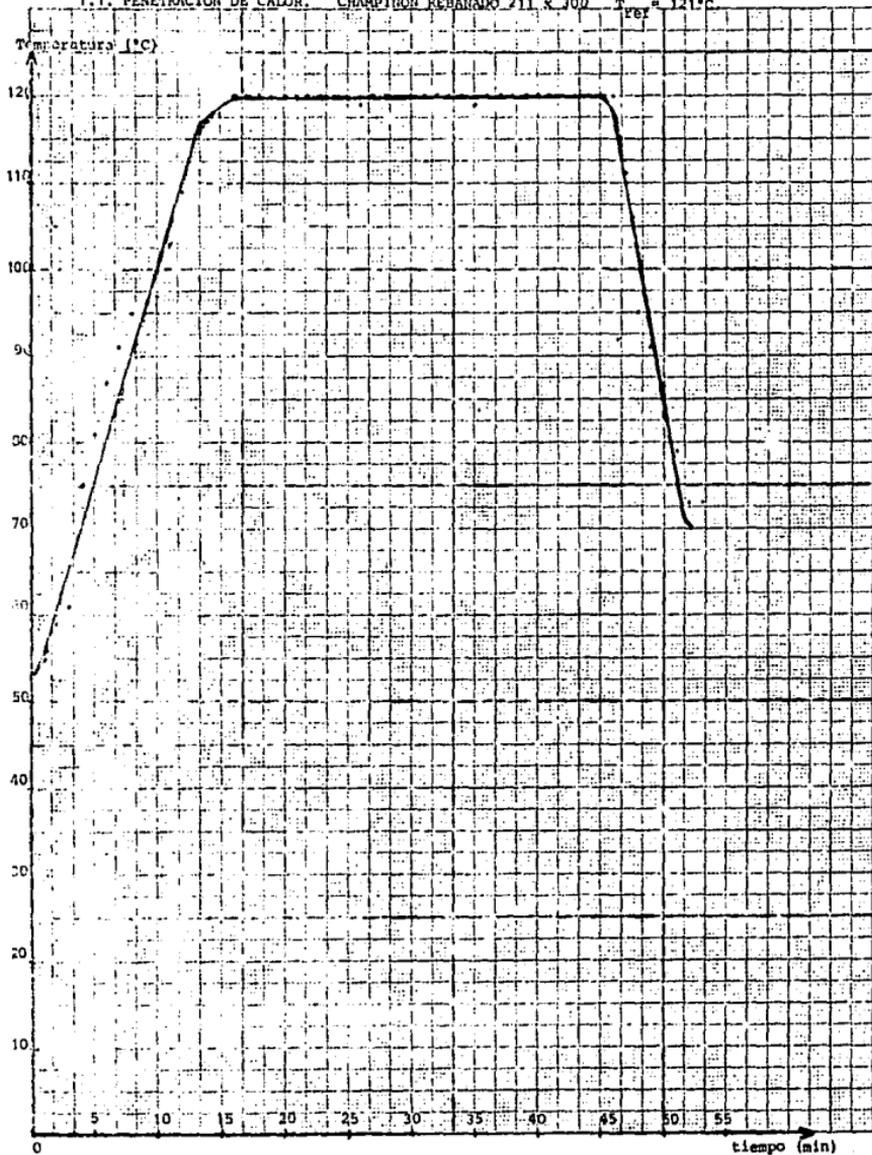
CHAMPIÑÓN REBANADO 211 x 300

$T_{ref} = 121^{\circ}C$

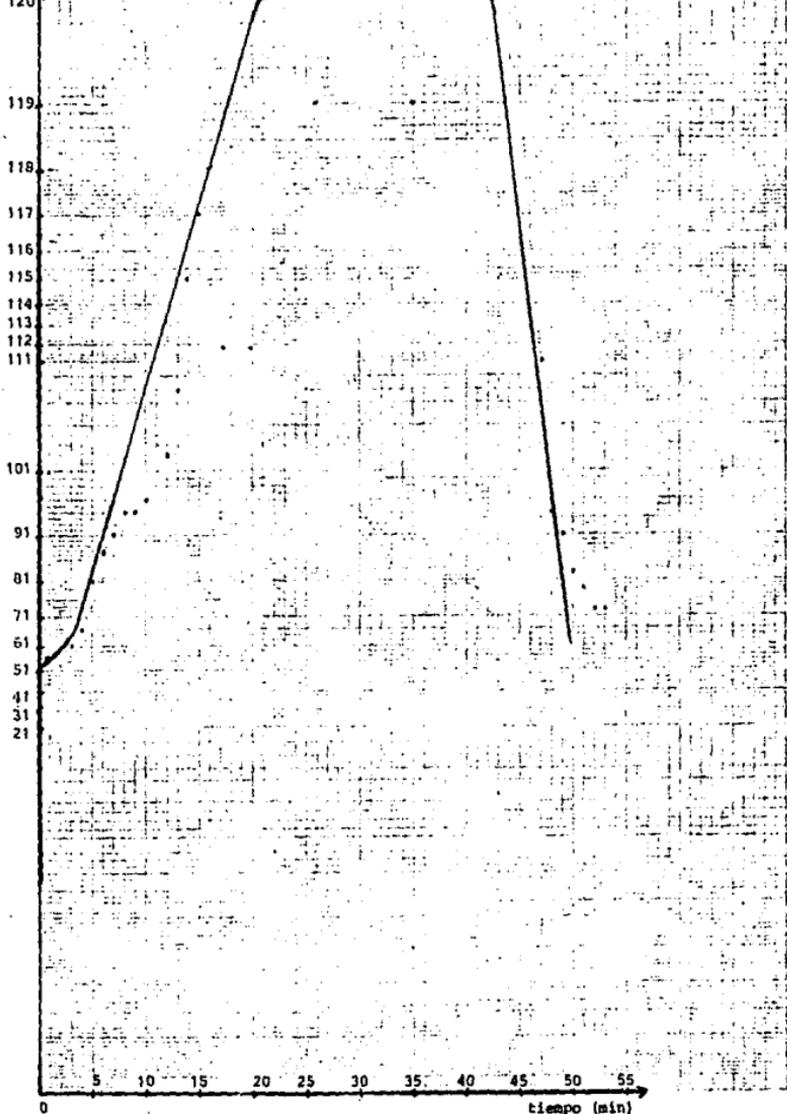
- 65 -



1.1. PENETRACION DE CALOR. CHAMPIÑON REBANADO 211 x 300 -  $T_{ref} = 121^{\circ}C$



1.2. PENETRACION DE CALOR. CHAMPIÓN REBAJADO 211 x 300.  $T_{ref} = 121^{\circ}C$ .



T A B L A 2

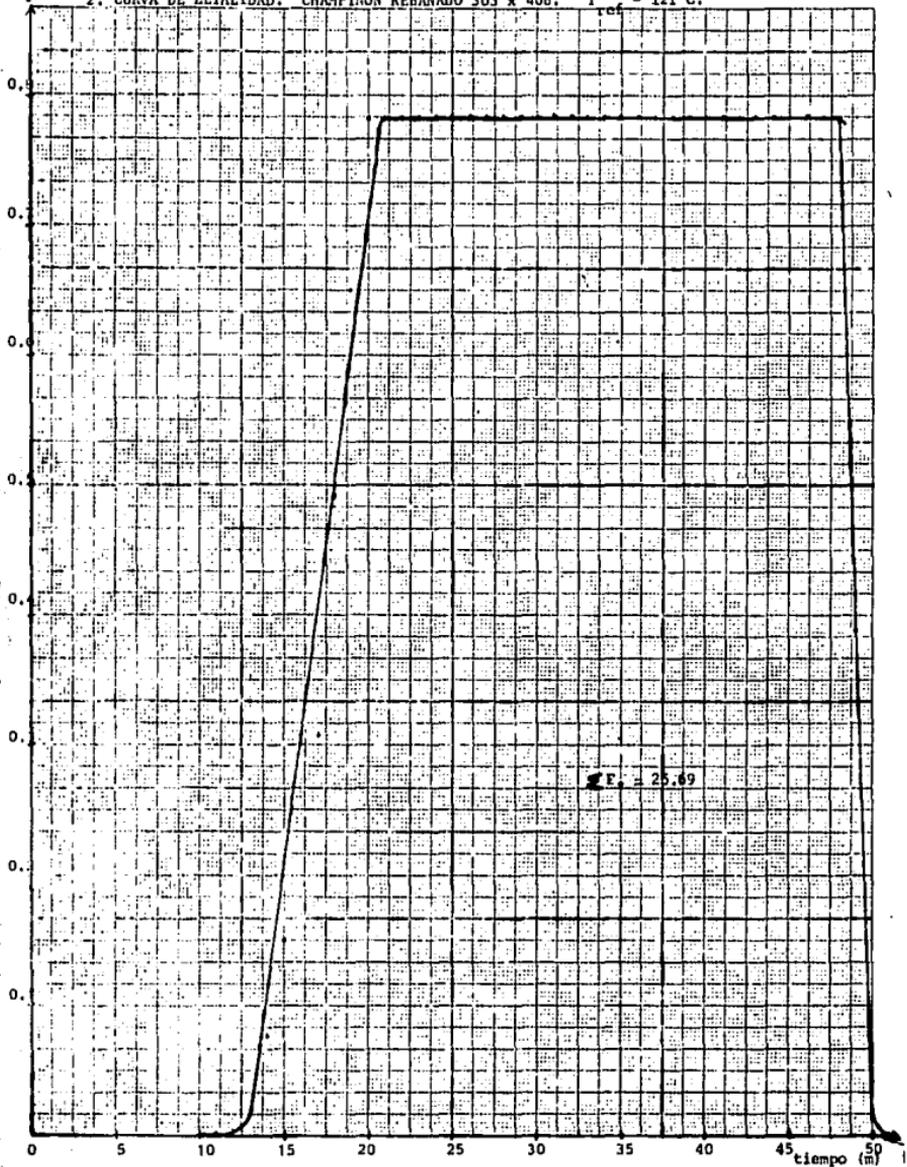
CHAMPIÑON REBANADO

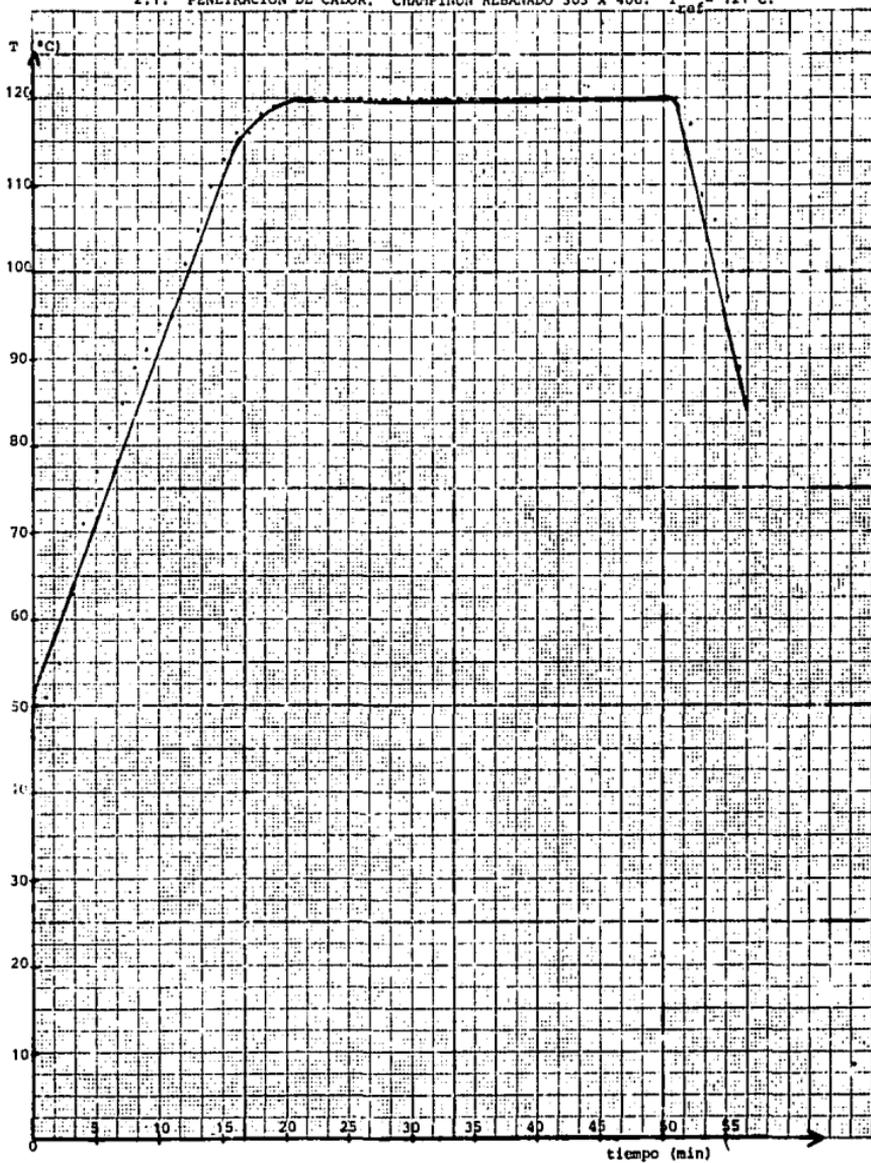
DATOS DE PENETRACION DE CALOR. CONDUCCION DE CALOR EN LATA 303 x 406.  $T_{ref} = 121^{\circ}C$

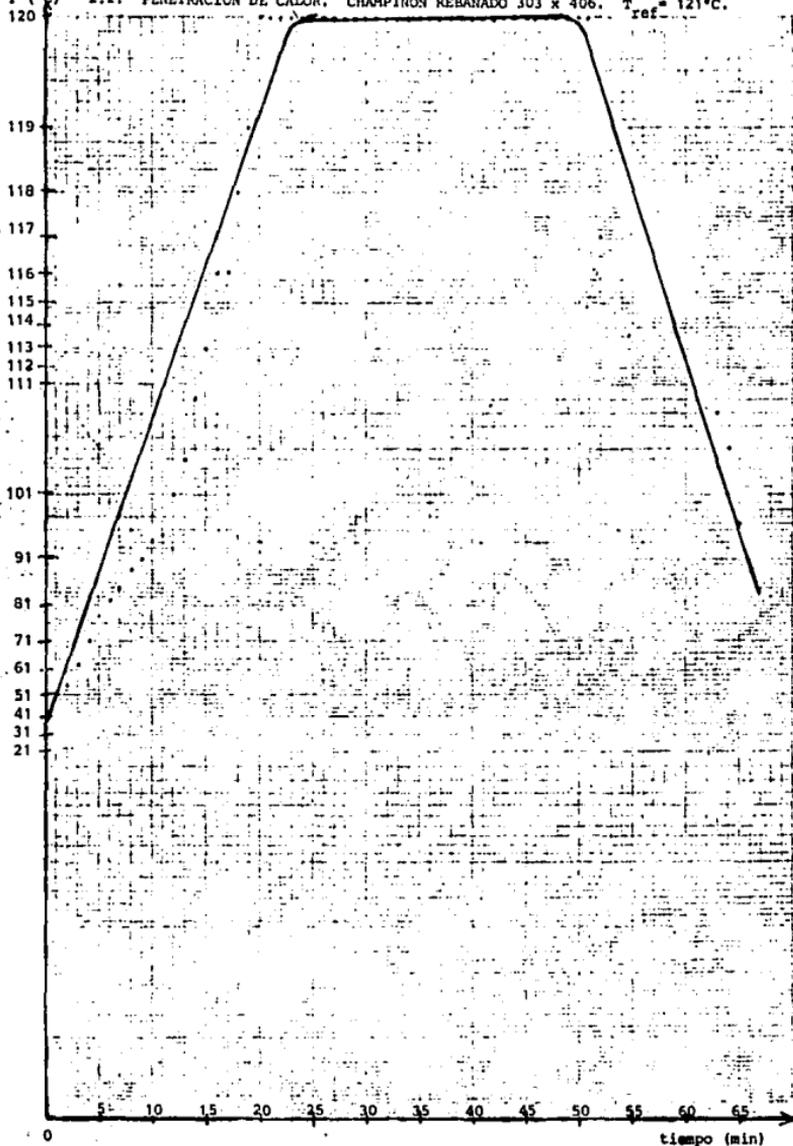
<u>t de calen-</u> <u>tamiento</u> <u>(min.)</u>	<u>Tempera-</u> <u>tura</u> <u>(°C)</u>	<u>Valor</u> <u>Letal</u> <u>(F<sub>o</sub>)</u>	<u>ΣF<sub>o</sub>/min.</u>	<u>t de calen-</u> <u>tamiento</u> <u>(min.)</u>	<u>Tempera-</u> <u>tura</u> <u>(°C)</u>	<u>Valor</u> <u>Letal</u> <u>(F<sub>o</sub>)</u>	<u>ΣF<sub>o</sub>/min.</u>		
Abertura									
Vapor									
0	51	0.0000009	0.0000009	31	120	0.774	11.28		
1	51	0.0000009	0.0000002	32	120	0.774	12.05		
2	55	0.000002	0.0000004	33	120	0.774	12.83		
3	63	0.0000015	0.0000002	34	120	0.774	13.60		
4	71	0.0000097	0.000011	35	120	0.774	14.37		
5	77	0.0000388	0.0000505	36	120	0.774	15.15		
6	82	0.000122	0.0001725	37	120	0.774	15.92		
7	85	0.00025	0.00042	38	120	0.774	16.70		
8	Cierre	89	0.00062	0.00103	39	120	0.774	17.47	
9	Venteo	91	0.0001	0.002	40	120	0.774	18.24	
10		94	0.0019	0.004	41	120	0.774	19.02	
11		95	0.0025	0.006	42	120	0.774	19.79	
12		101	0.001	0.016	43	120	9.774	20.57	
13		105	0.024	0.04	44	120	0.774	21.34	
14		110	0.077	0.12	45	120	0.774	22.11	
15		113	0.154	0.272	46	120	0.774	22.89	
16		116	0.308	0.580	47	120	0.774	23.66	
17		116	0.308	0.889	48	120	0.774	24.44	
18		118	0.488	1.377	49	Ab. aire	120	0.774	25.21
19		119	0.615	1.993	50	Cierre del	117	0.388	25.59
20		120	0.774	2.77	51	Vapor	109	0.062	25.66
21		120	0.774	3.54	52	Enfria-	106	0.0308	25.69
22		120	0.774	4.32	53	miento	97	0.00388	25.69
23		120	0.774	5.09	54	Fin de	89	0.00062	25.69
24		120	0.774	5.86	Proceso				
25		120	0.774	6.64					
26		120	0.774	7.41					
27		120	0.774	8.18					
28		120	0.774	8.96					
29		120	0.774	9.73					
30		120	0.774	10.50					

ΣF<sub>o</sub> = 25.69

2. CURVA DE LETALIDAD. CHAMPIÑON REBANADO 303 x 406.  $T_{ref} = 121^{\circ}C$ .







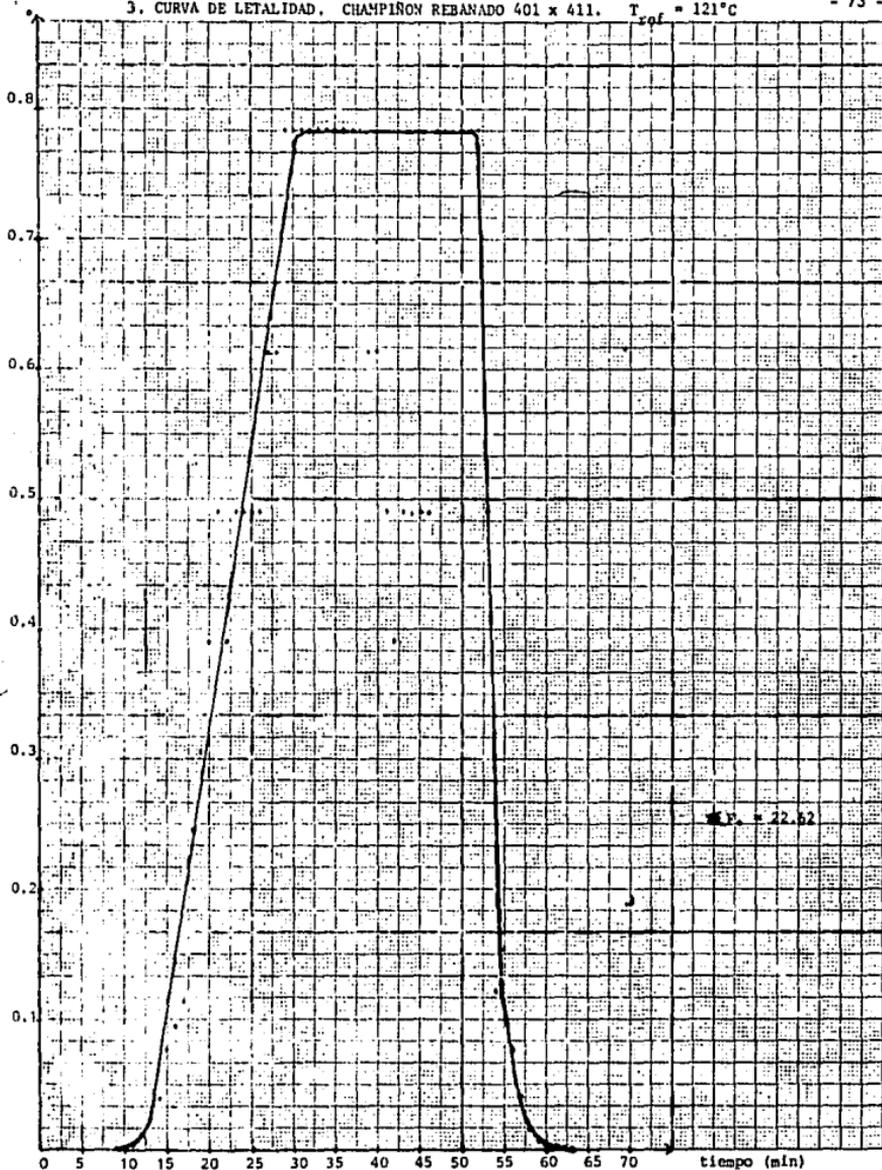
BIBLIOTECA DE LA UNIVERSIDAD DE VALLE

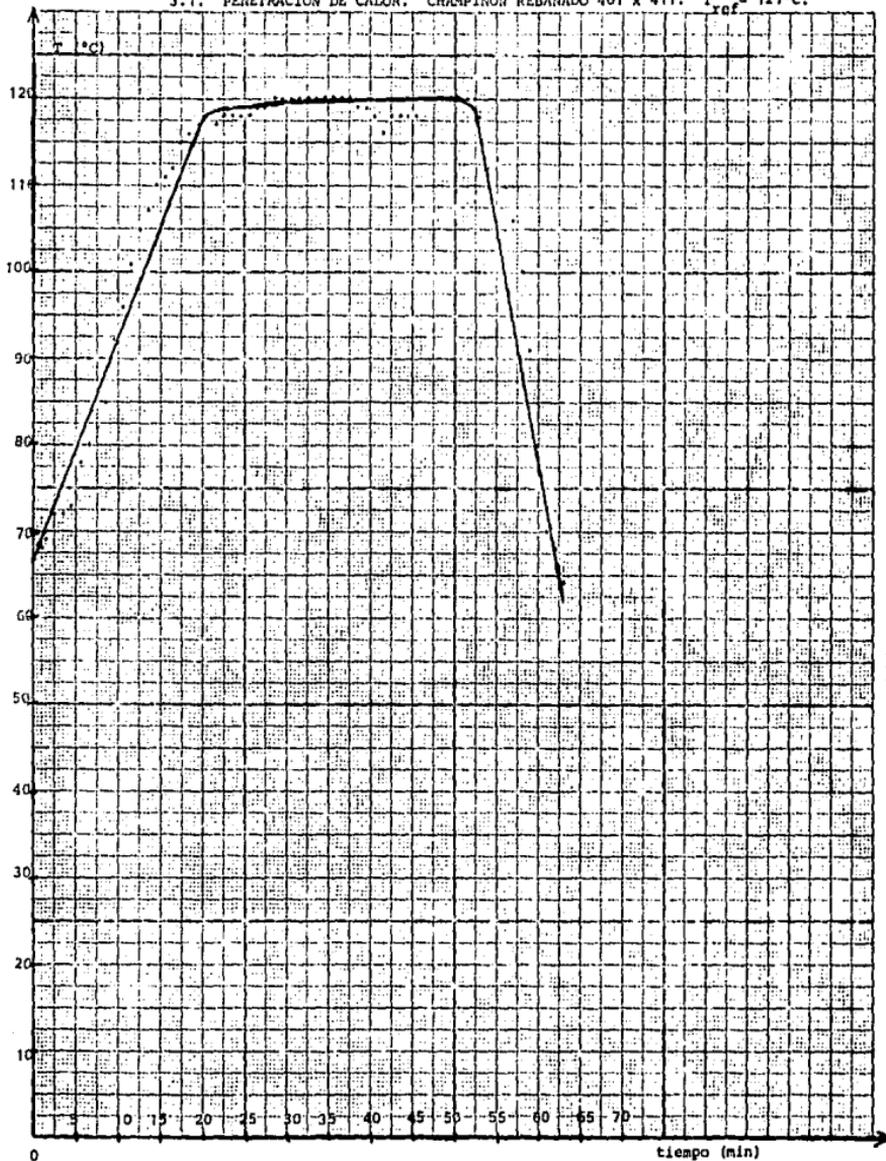
T A B L A 3  
CHAMPINÓN REBANADO

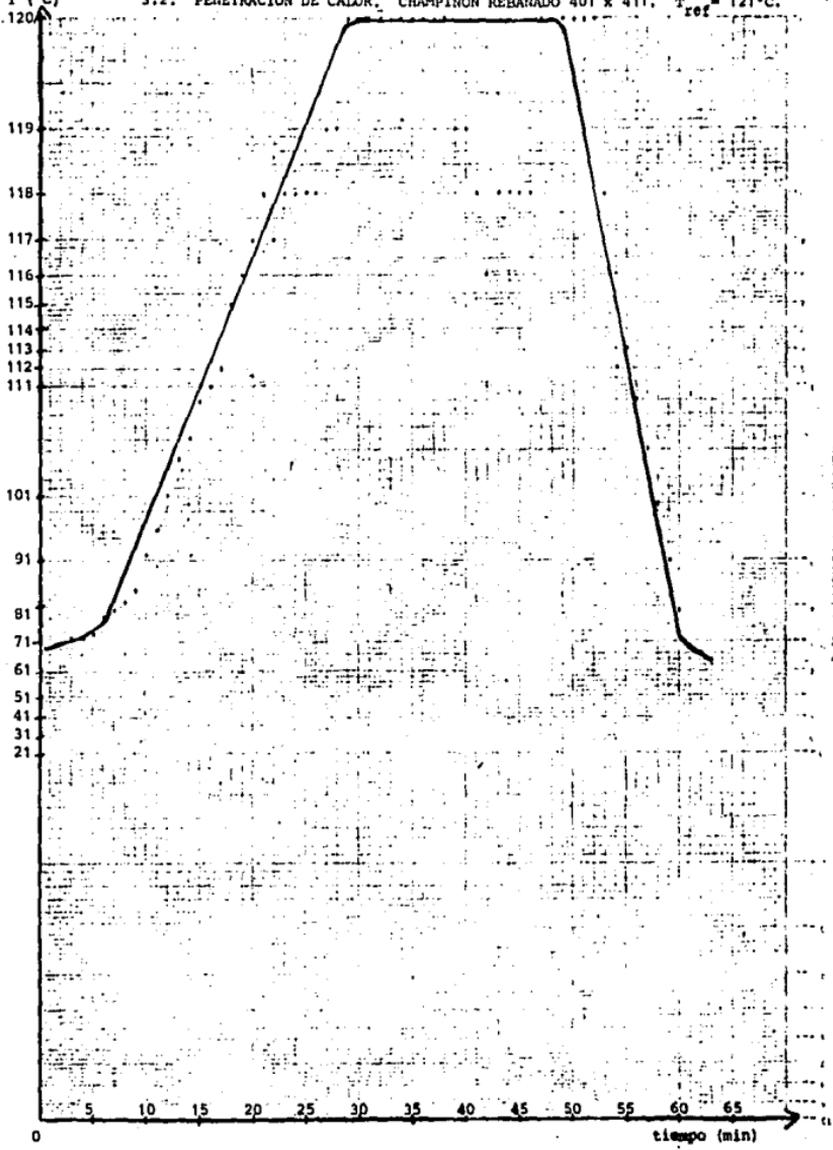
DATOS DE PENETRACION DE CALOR. CONDUCCION DE CALOR EN LATA 401 x 411.  $T_{ref} = 121^{\circ}C$

t de calen- tamiento (min.)	Tempera- tura (°C)	Valor Letal (F <sub>o</sub> )	F <sub>o</sub> /min	t de calen- tamiento (min.)	Tempera- tura (°C)	Valor Letal (F <sub>o</sub> )	F <sub>o</sub> /min
Ab Vapor							
0	40	0.00000007	0.00000007	36	120	0.774	11.57
1	68	0.000005	0.000005	37	120	0.774	12.34
2	69	0.000006	0.000011	38	120	0.774	13.11
3	72	0.0000123	0.0000233	39	119	0.615	13.73
4	72	0.0000123	0.0000356	40	119	0.615	14.35
5	73	0.0000154	0.0000511	41	118	0.488	14.83
6	78	0.000049	0.0000999	42	116	0.308	15.14
7	80	0.0000774	0.0001773	43	118	0.488	15.63
8	82	0.0001227	0.0003	44	118	0.488	16.12
9 Cierre	85	0.000245	0.000545	45	118	0.488	16.60
10 Venteo	92	0.00123	0.00177	46	118	0.488	17.09
11	96	0.003	0.00485	47	120	0.774	17.87
12	101	0.0097	0.0146	48	120	0.774	18.64
13	105	0.0245	0.039	49	120	0.774	19.42
14	107	0.0388	0.078	50	Ab.aire 120	0.774	20.19
15	110	0.0774	0.155	51	y vent. 120	0.774	20.96
16	111	0.0975	0.253	52	Cierre 120	0.774	21.74
17	112	0.123	0.376	53	Vapor 118	0.488	22.23
18	115	0.245	0.620	54	Enfria-112	0.123	22.35
19	116	0.308	0.929	55	miento 113	0.154	22.50
20	117	0.388	1.32	56	110	0.077	22.58
21	118	0.488	1.805	57	106	0.0308	22.61
22	117	0.388	2.193	58	100	0.0077	22.62
23	118	0.488	2.682	59	91	0.00097	22.62
24	118	0.488	3.17	60	80	0.000077	22.62
25	118	0.488	3.66	61	70	0.000007	22.62
26	118	0.488	4.15	62	68	0.000005	22.62
27	119	0.615	4.76	63	Fin de 64	0.000002	22.62
28	119	0.615	5.38		proceso		
29	120	0.774	6.15				
30	120	0.774	6.92				
31	120	0.774	7.70				
32	120	0.774	8.47				
33	120	0.774	9.24				
34	120	0.774	10.02				
35	120	0.774	10.79				

F<sub>o</sub> = 22.62







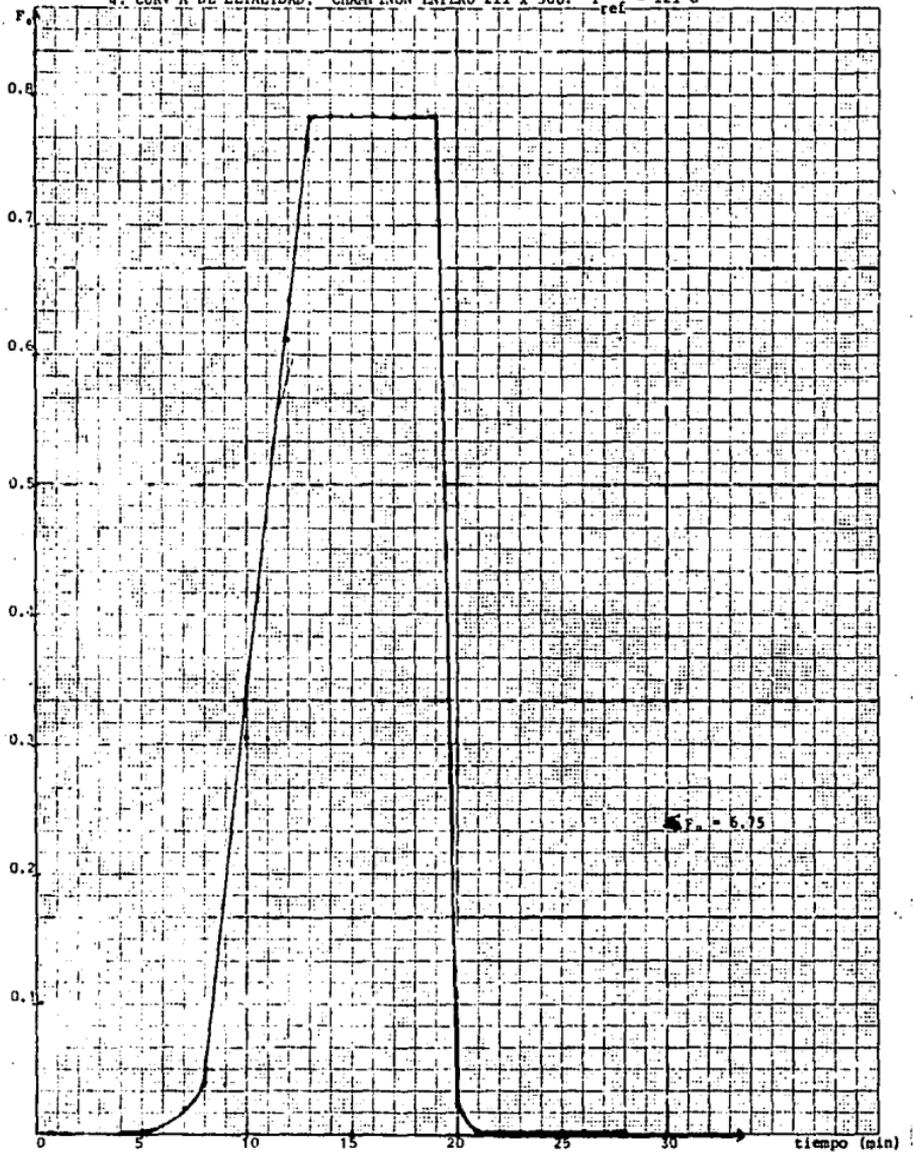
T A B L A 4  
CHAMPIRON ENTERO

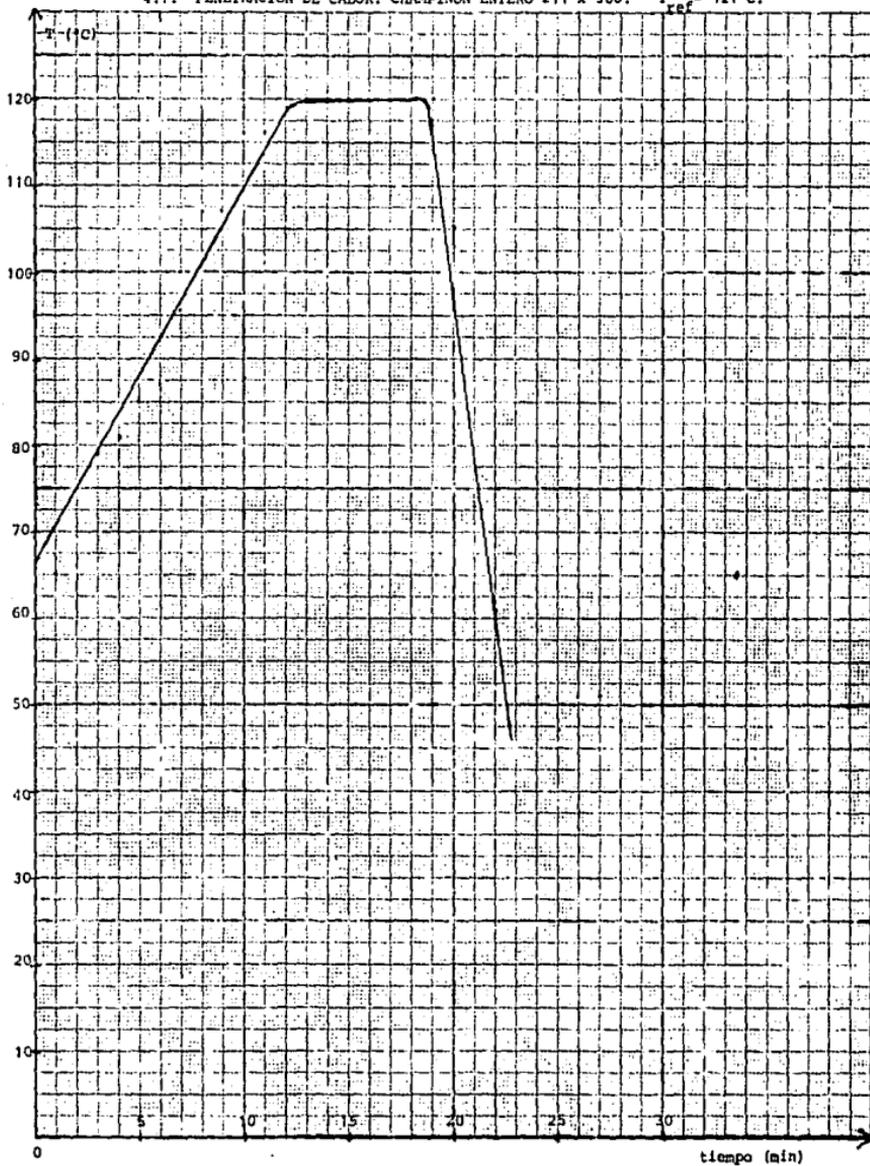
DATOS DE PENETRACION DE CALOR. CONDUCCION DE CALOR EN LATA 211 x 300.  $T_{ref} = 121^{\circ}C$

<u>tiempo de calentamiento (minutos)</u>	<u>Temperatura (<math>^{\circ}C</math>)</u>	<u>Valor Letal (<math>F_o</math>)</u>	<u><math>\leq F_o/min.</math></u>
Abertura Vapor			
0	41	0.000000009	0.000000009
1	65	0.0000024	0.0000025
2	75	0.0000245	0.0000269
3	79	0.0000615	0.0000884
4	81	0.0000975	0.000186
5	85	0.000245	0.000431
6 Cierre Venteo	87	0.000388	0.00082
7	96	0.00308	0.004
8	107	0.0388	0.043
9	107	0.0388	0.0815
10	116	0.308	0.389
11	116	0.308	0.6977
12	119	0.615	1.313
13	120	0.774	2.087
14	120	0.774	2.86
15	120	0.774	3.63
16	120	0.774	4.41
17	120	0.774	5.18
18	120	0.774	5.96
19 Abertura aire y	120	0.774	6.73
20 agua. Cierre vap.	105	0.0245	6.75
21 Enfriamiento	73	0.000015	6.75
22	61	0.000001	6.75
23	55	0.0000002	6.75
24	51	0.00000009	6.75
25	47	0.00000003	6.75
26	51	0.00000009	6.75
27	51	0.00000009	6.75
28 Fin de proceso	48	0.00000004	6.75

$\leq F_o = 6.75$

4. CURVA DE LETALIDAD, CHAMPIÑON ENTERO 211 x 300.  $T_{ref} = 121^{\circ}\text{C}$

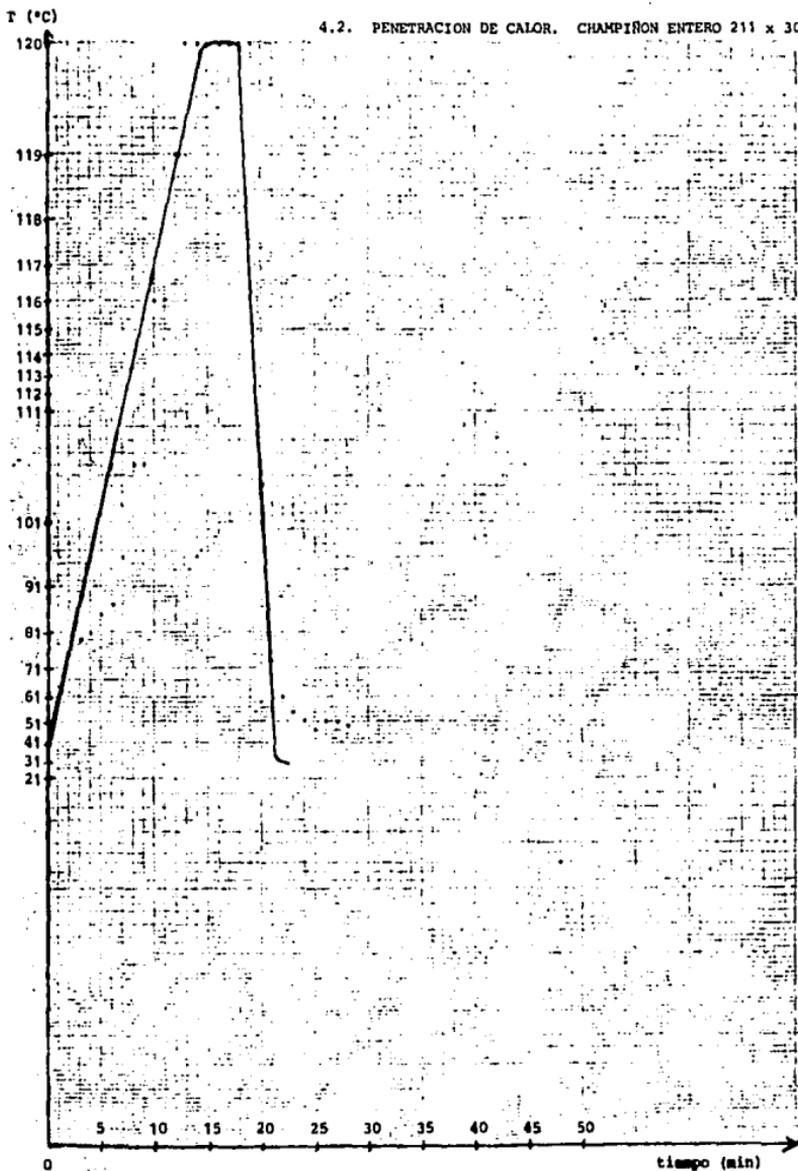




4.2. PENETRACION DE CALOR. CHAMPIÑON ENTERO 211 x 300.

- 79 -

$T_F = 121^\circ\text{C}$



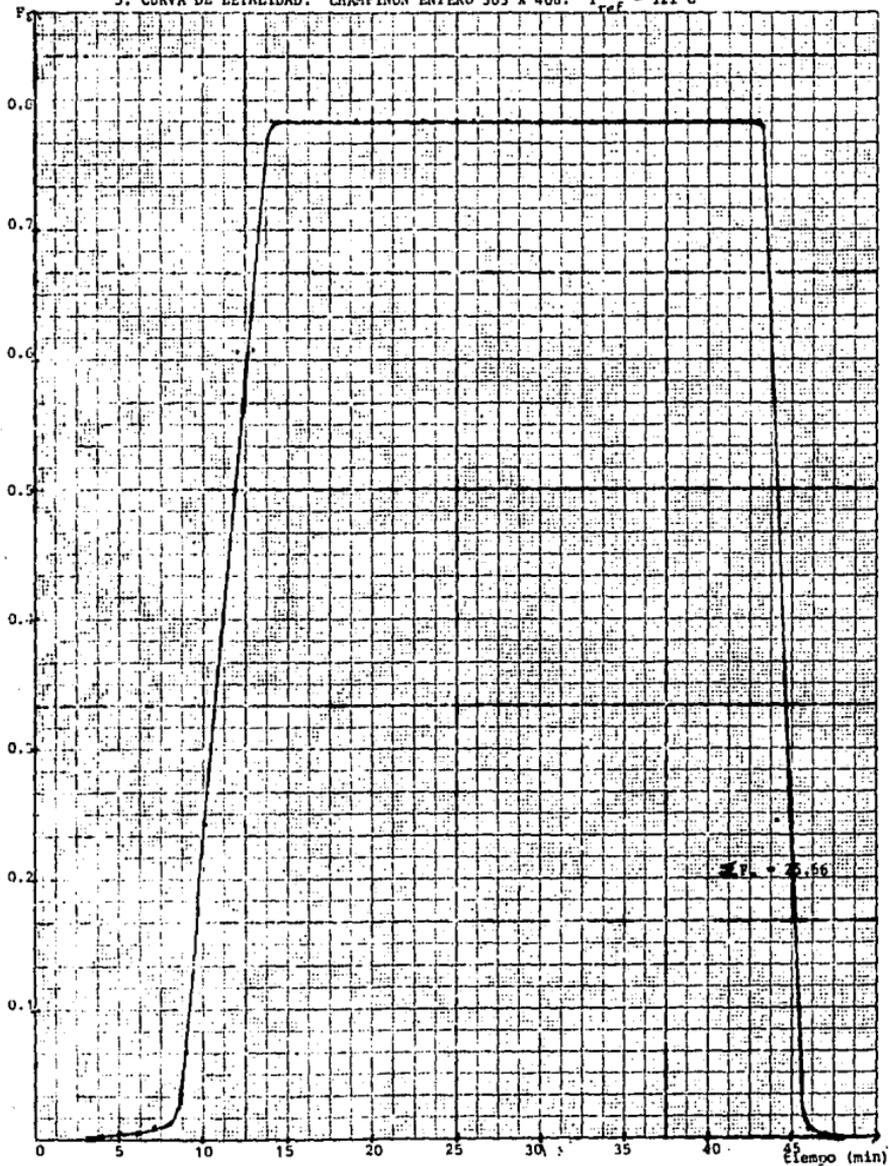
T A B L A 5  
CHAMPIRON ENTERO

DATOS DE PENETRACION DE CALOR. CONDUCCION DE CALOR EN LATA 303 x 406.  $T_{ref} = 121^{\circ}C$

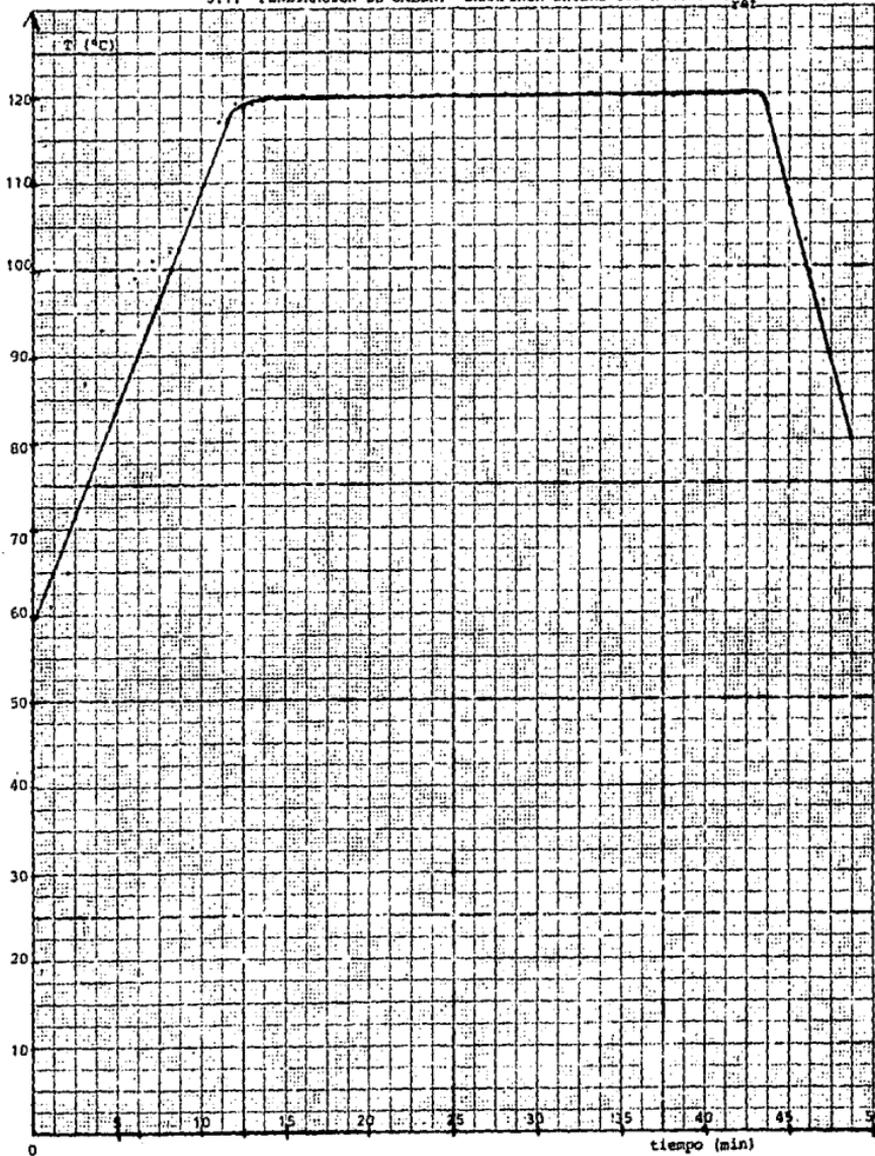
<u>t de calen-</u> <u>tamiento</u> <u>(min)</u>	<u>Tempera-</u> <u>tura</u> <u>(°C)</u>	<u>Valor</u> <u>Letal</u> <u>(F<sub>o</sub>)</u>	<u>← F<sub>o</sub>/min</u>	<u>t de calen-</u> <u>tamiento</u> <u>(min)</u>	<u>Tempera-</u> <u>tura</u> <u>(°C)</u>	<u>Valor</u> <u>Letal</u> <u>(F<sub>o</sub>)</u>	<u>← F<sub>o</sub>/min</u>	
AB vapor								
0	59	0.0000006	0.0000006	28	120	0.774	13.55	
1	61	0.000001	0.0000016	29	120	0.774	14.32	
2	75	0.0000245	0.0000261	30	120	0.774	15.09	
3	87	0.000388	0.000414	31	120	0.774	15.87	
4	93	0.001545	0.00196	32	120	0.774	16.64	
5	98	0.00488	0.00684	33	120	0.774	17.42	
6	99	0.0062	0.013	34	120	0.774	18.19	
7	101	0.00975	0.0227	35	120	0.774	18.96	
.8	102	0.0123	0.035	36	120	0.774	19.74	
9 Cierre	107	0.0388	0.0738	37	120	0.774	20.51	
10 Venteo	115	0.245	0.318	38	120	0.774	21.28	
11	117	0.388	0.706	39	120	0.774	22.06	
12	119	0.615	1.322	40	120	0.774	22.83	
13	119	0.615	1.937	Ab.aire	41 Cierre	120	0.774	23.61
14	120	0.774	2.71	y venteo	42 Vapor	120	0.774	24.38
15	120	0.774	3.485		43 Enfria-	120	0.774	25.16
16	120	0.774	4.259		44 miento	115	0.245	25.40
17	120	0.774	5.03		45	115	0.245	25.64
18	120	0.774	5.80		46	103	0.0154	25.66
19	120	0.774	6.58		47	96	0.003	25.66
20	120	0.774	7.35		48 Fin de	85	0.00024	25.66
21	120	0.774	8.13		proceso			
22	120	0.774	8.90					
23	120	0.774	9.677					
24	120	0.774	10.45					
25	120	0.774	11.22					
26	120	0.774	11.99					
27	120	0.774	12.77					

← F<sub>o</sub> = 25.66

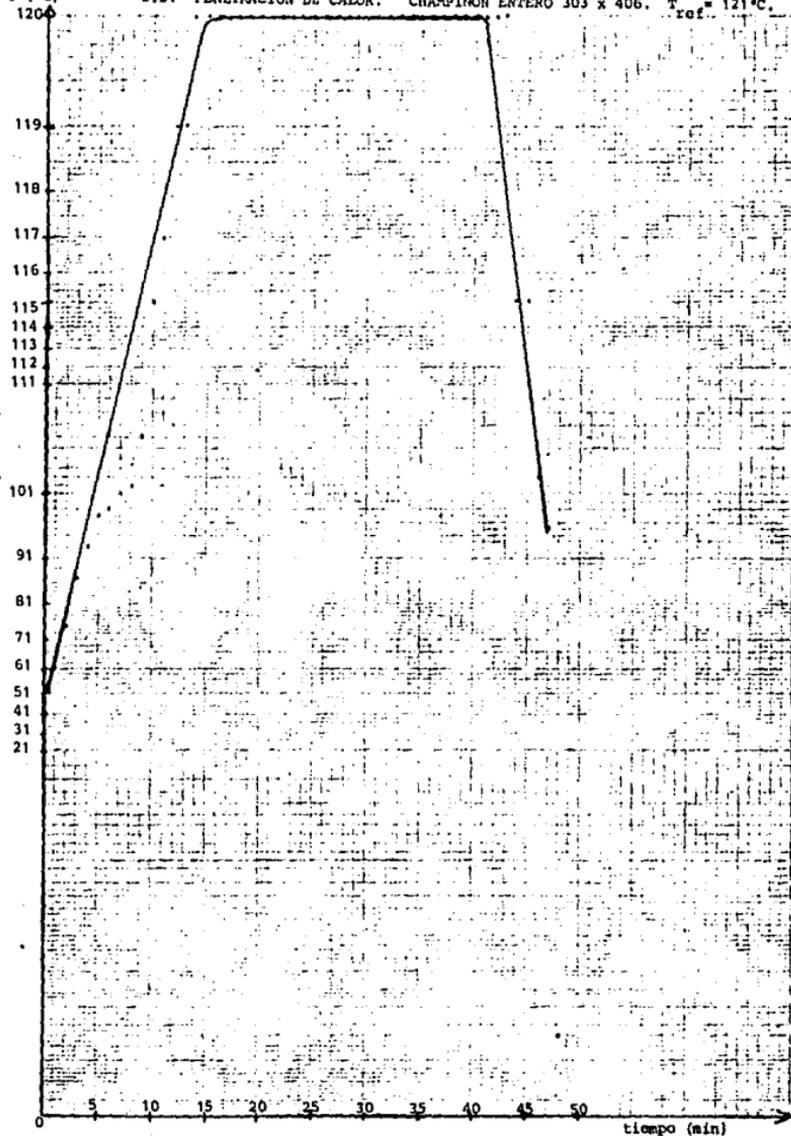
5. CURVA DE LETALIDAD. CHAMPIRON ENTERO 303 x 406.  $T_{ref} = 121^{\circ}C$



5.1. PENETRACION DE CALOR. CHAMPINON ENTERO 303 x 406.  $T_{raf} = 121^{\circ}\text{C}$ .



5.2. PENETRACION DE CALOR. CHAMPIÑON ENTERO 303 x 406.  $T_{ref} = 121^{\circ}C$ .



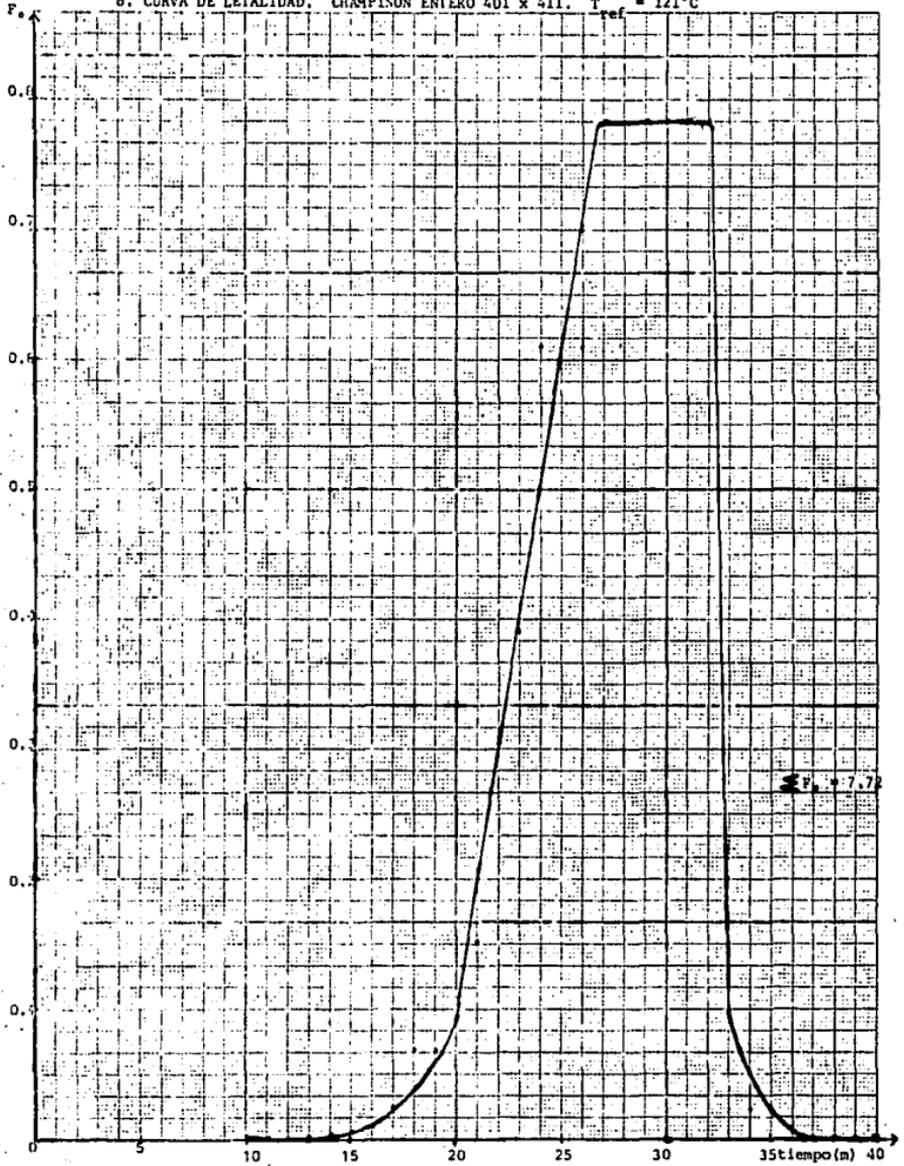
T A B L A 6  
CHAMPIÑON ENTERO

DATOS DE PENETRACION DE CALOR. CONDUCCION DE CALOR EN LATA 401 x 411.  $T_{ref} = 121^{\circ}C$

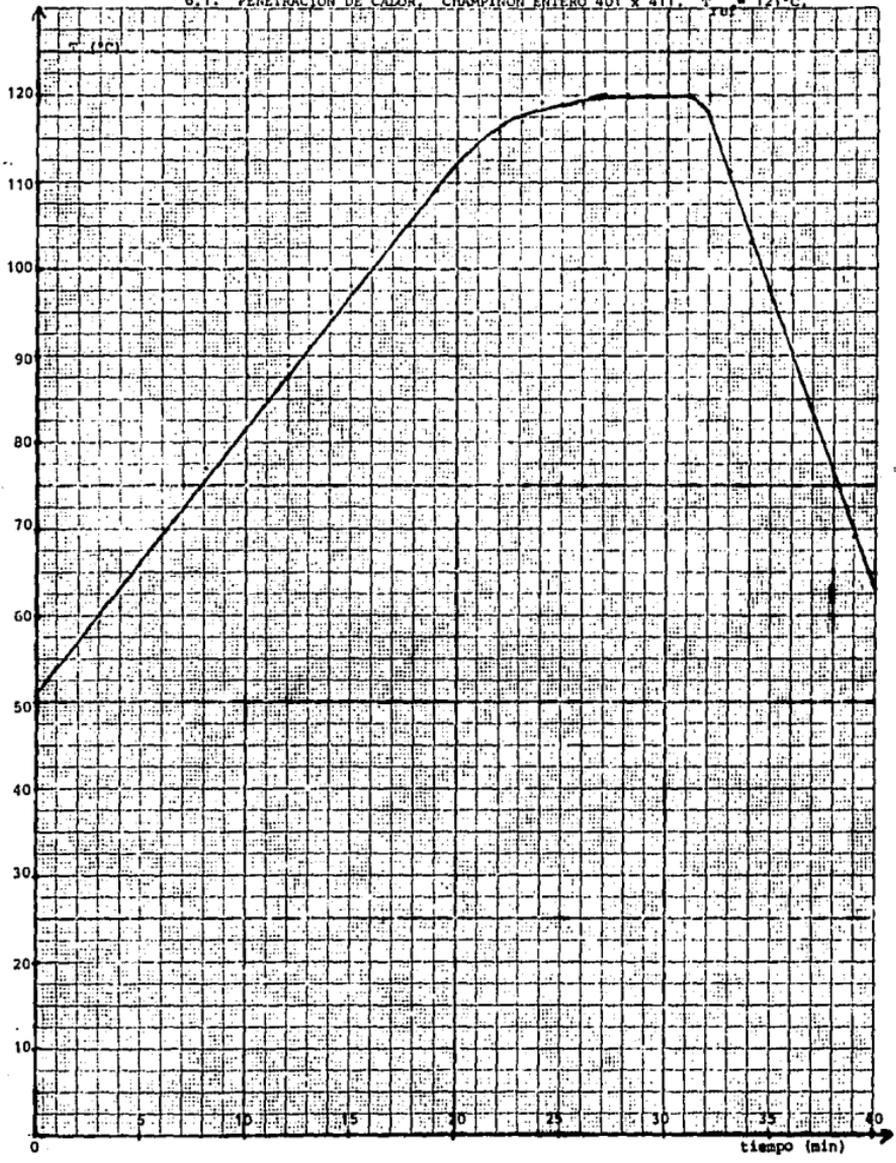
t de calentamiento (min)	Temperatura (°C)	Valor Letal ( $F_o$ )	$\Sigma F_o/min$	t de calentamiento (min)	Temperatura (°C)	Valor Letal ( $F_o$ )	$\Sigma F_o/min$		
Ab. Vapor									
0	49	0.0000006	0.0000006	26	119	0.615	2.943		
1	51	0.0000009	0.0000015	27	120	0.774	3.717		
2	53	0.0000002	0.0000003	28	120	0.774	4.49		
3	59	0.0000006	0.0000009	29	120	0.774	5.26		
4	61	0.0000001	0.0000019	30	C. Vapor	120	0.774	6.04	
5	66	0.0000031	0.000005	31	Ab. aire	120	0.774	6.82	
6	70	0.0000077	0.0000127	32	y venteo	120	0.774	7.59	
7	75	0.0000245	0.0000372	33	Enfria-	111	0.0975	7.68	
8	77	0.0000388	0.000076	34	miento	103	0.0154	7.70	
9	83	0.0001545	0.0002305	35		103	0.0154	7.71	
10	Cierre	83	0.0001545	0.000385	36		97	0.0038	7.72
11	Venteo	85	0.000245	0.00063	37		81	0.00009	7.72
12		89	0.000615	0.001245	38		75	0.00002	7.72
13		91	0.0009747	0.00222	39		69	0.000006	7.72
14		95	0.00245	0.00467	40	Fin de	65	0.000002	7.72
15		98	0.00488	0.00955		proceso			
16		102	0.01227	0.02182					
17		105	0.0245	0.0463					
18		109	0.0615	0.1078					
19		109	0.0615	0.1693					
20		110	0.0774	0.247					
21		113	0.1545	0.401					
22		116	0.308	0.709					
23		117	0.388	1.097					
24		119	0.615	1.712					
25		119	0.615	2.327					

$\Sigma F_o = 7.72$

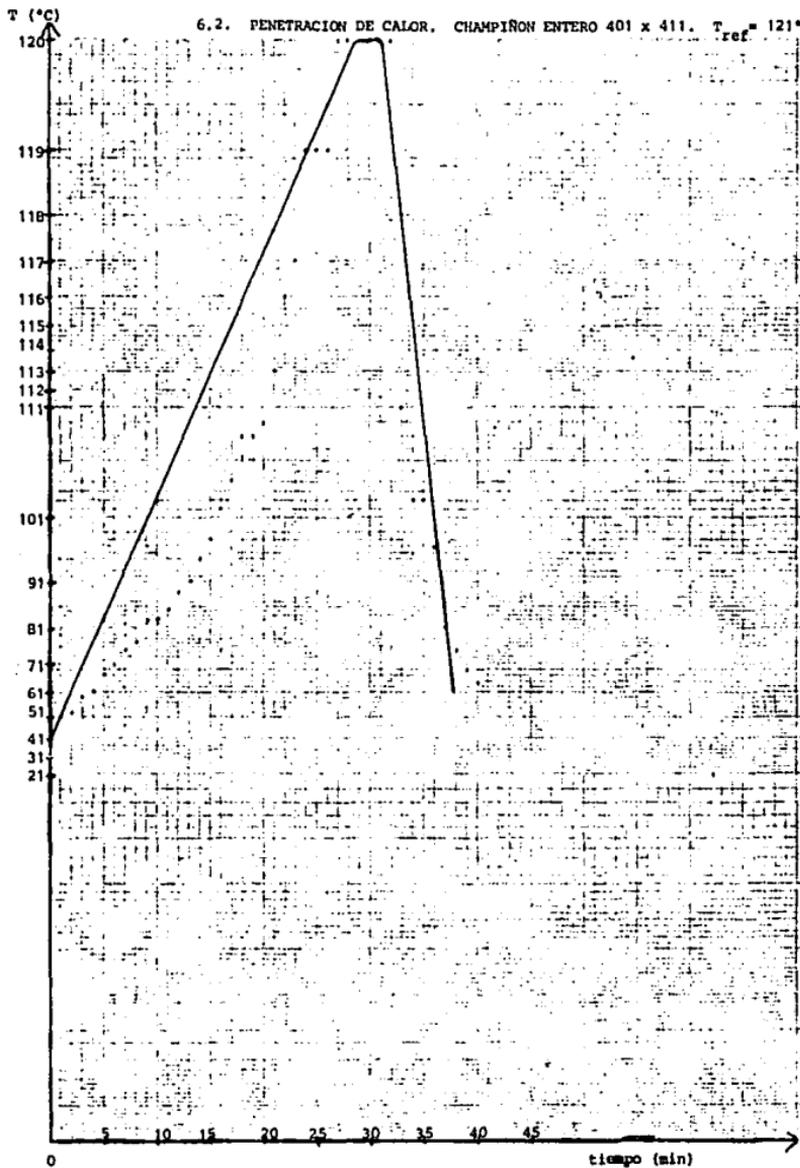
6. CURVA DE LETALIDAD. CHAMPIÑON ENTERO 401 x 411.  $T_{ref} = 121^{\circ}C$



6.1. PENETRACION DE CALOR, CHAMPIÑON ENTERO 401 x 411.  $T_{inf} = 121^{\circ}\text{C}$ .



6.2. PENETRACION DE CALOR. CHAMPIÑON ENTERO 401 x 411.  $T_{ref} = 121^{\circ}C$ .



#### CAPITULO 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Después de realizar la experimentación se llegó a las siguientes conclusiones:

- Se cumplieron con los objetivos del estudio, ya que se determinó el proceso de esterilización y se estableció el factor  $f$  de letalidad, obteniendo un producto comercialmente estéril y con el mínimo de daños, teniendo una mejor calidad en el producto final.
- Los procesos térmicos generalmente influyen en la calidad organoléptica del alimento, según el  $t$  y la  $T$  a los cuales se somete el alimento durante su proceso.

Los valores  $z$  que se obtienen para la inactivación térmica de microorganismos, son considerablemente menores que los que destruyen la calidad organoléptica del alimento, por lo que es posible producir alimentos esterilizados térmicamente con excelente calidad organoléptica si el alimento es procesado a altas temperaturas con un mínimo de tiempo de calentamiento.

- Las partículas en el medio de calentamiento nunca alcanzarán la  $T$  del medio.
- En términos generales, la contaminación por "goteo" (por perforaciones en el contenedor o por un cierre defectuoso) en alimentos enlatados de baja acidez sólo puede ser posible bajo ciertas circunstancias poco usuales, pero eliminando el origen de la contaminación (llevando un buen control de calidad de las latas antes del procesamiento del alimento y teniendo perfectamente limpio el lugar del trabajo, así como los trabajadores) puede eliminarse este tipo de contaminación.
- Con el proceso térmico seguido en el experimento se obtiene la esterilidad comercial del alimento enlatado de baja acidez, ya que se eliminó por completo la presencia del m.o. (P.A.3679) después de someterlo al tratamiento y no se afectó a su calidad organoléptica.

- No se presentaron diferencias en cuanto al comportamiento de la penetración de calor en ambas presentaciones del producto (entero y rebanado), por lo que se puede concluir que al hacer un estudio de alguna de las dos presentaciones, los resultados son válidos para ambas (ya que el comportamiento es el mismo).
- Se logró optimizar el proceso de esterilización, reduciendo los tiempos de autoclave y mejorando la calidad del producto enlatado.

Recomendación:

Serfa mucho más recomendable hacer el proceso exactamente igual, pero por menos tiempo, porque como se puede observar, los tiempos fueron demasiado largos haciendo un proceso excesivo, ya que se obtuvieron valores de  $F_0 = 25$ , cuando con un valor de  $F_0 = 15$  es suficiente para que el producto esté comercialmente estéril.

Tomando menos tiempo de proceso a  $121^\circ\text{C}$  se obtienen valores  $F_0 = 20$ , que aún así son lo suficientemente amplios como para garantizar que el producto está comercialmente estéril y además, con excelente calidad organoléptica. Se tomó el parámetro  $F_0 = 20$  por la diferencia en las temperaturas iniciales de los procesos y, sobre todo, para tener un mayor rango de seguridad sin llegar a ser un proceso excesivo.

Las gráficas anexas a esta recomendación se obtuvieron tomando menos tiempo de proceso a la misma temperatura. De esta manera se redujo el tiempo total en el autoclave, mejorando así el proceso y optimizando la esterilización comercial de alimentos enlatados de baja acidez.

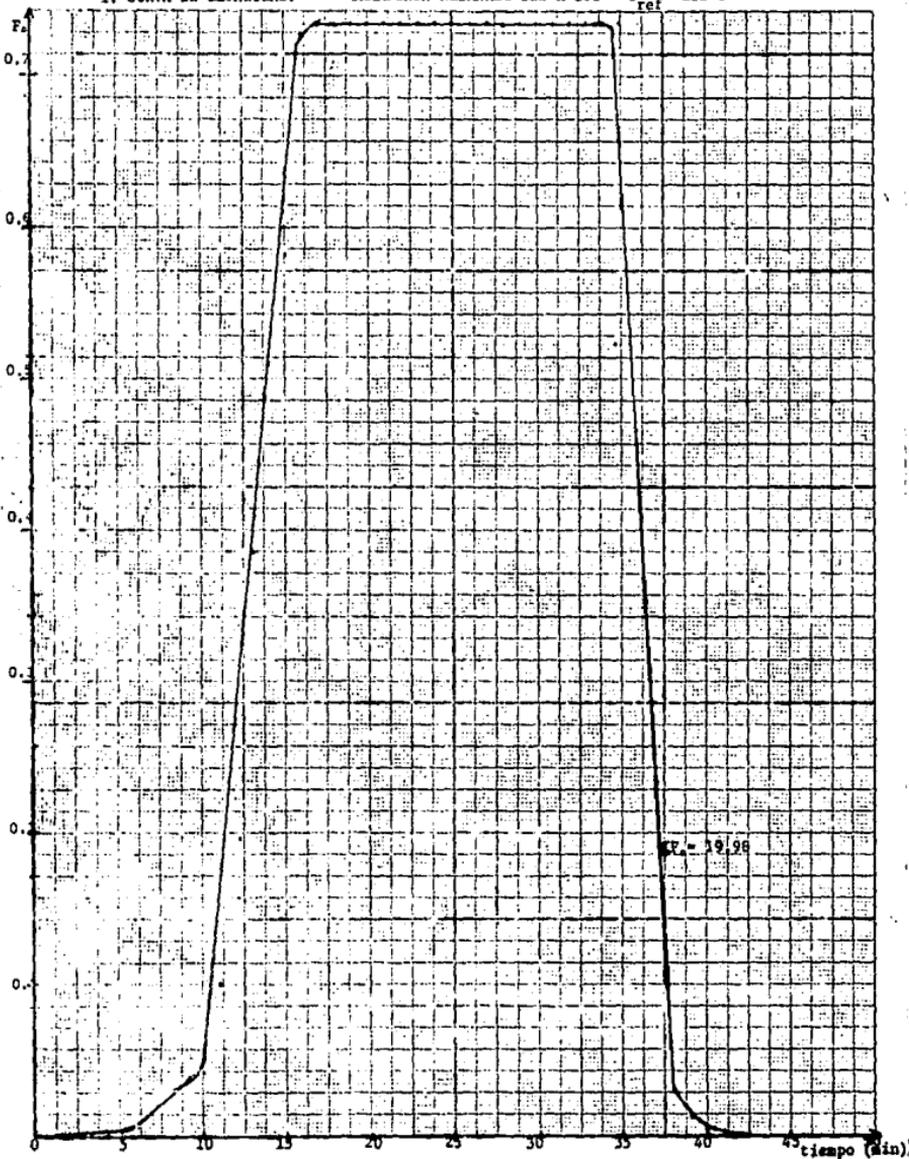
En las Gráficas Nos. 4 y 6 se les aumentó el tiempo de proceso (al contrario de las anteriores), porque los valores  $F_0$  obtenidos fueron menores aunque confiables ( $F_0 = 6.75$  y  $F_0 = 7.72$ , respectivamente) para lograr un mayor rango de seguridad en cuanto a su esterilidad comercial. A pesar de ser valores bajos de  $F_0$ , no hubo crecimiento del microorganismo y se logró incrementar la calidad del producto final considerablemente (mejor sabor y consistencia; más color, mejor olor, etc.), pero para evitar el riesgo que puede haber al tener estos valores, se recomienda que el tiempo de proceso sea ligeramente mayor, optimizando así la esterilización comercial del alimento.

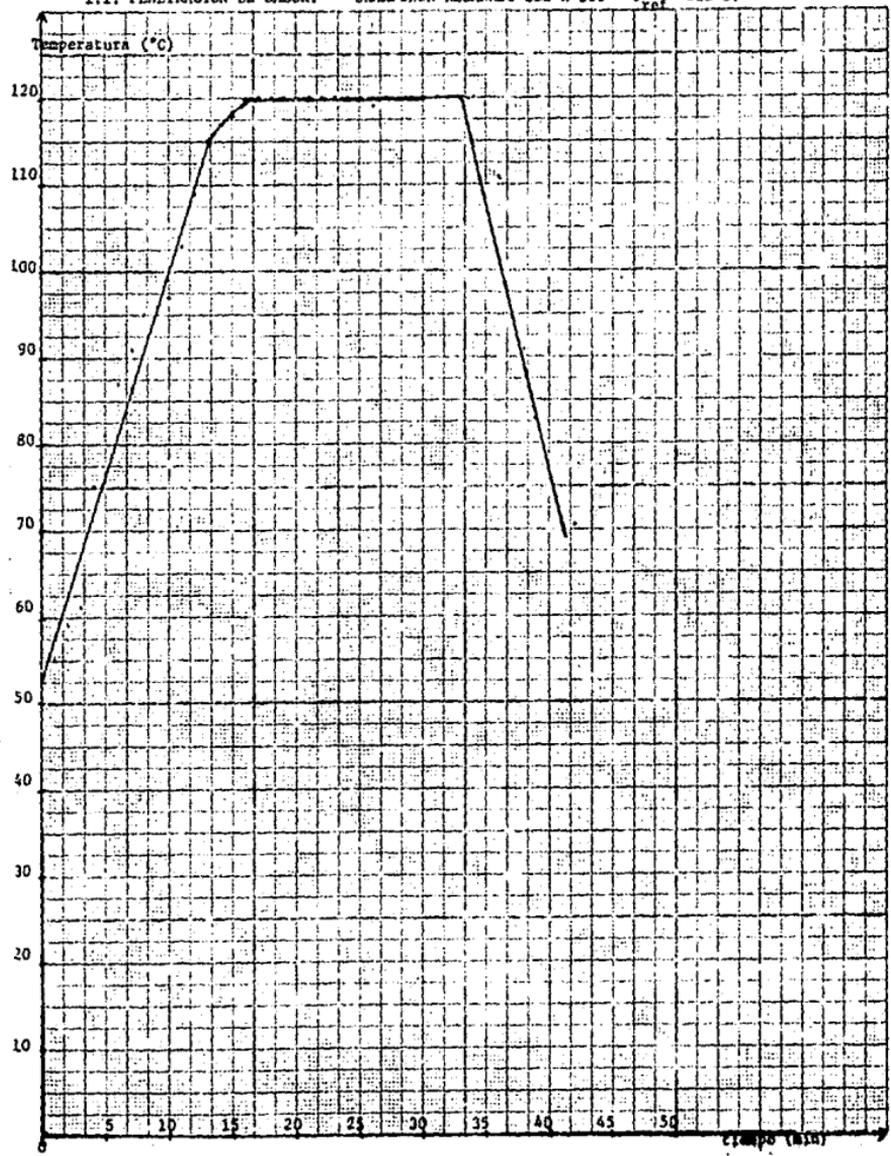
1. CURVA DE LETALIDAD.

CHAMPIÑON REBANADO 211 x 300

$T_{ref} = 121^{\circ}C$

- 91 -

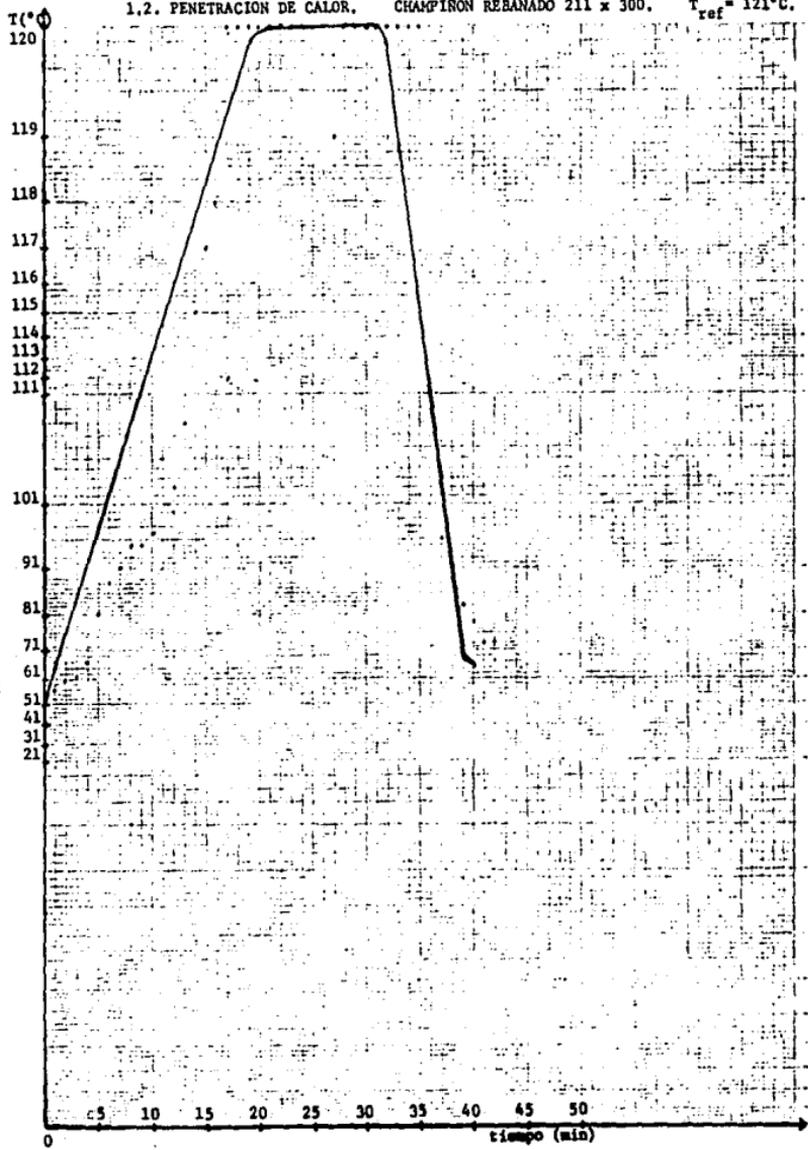




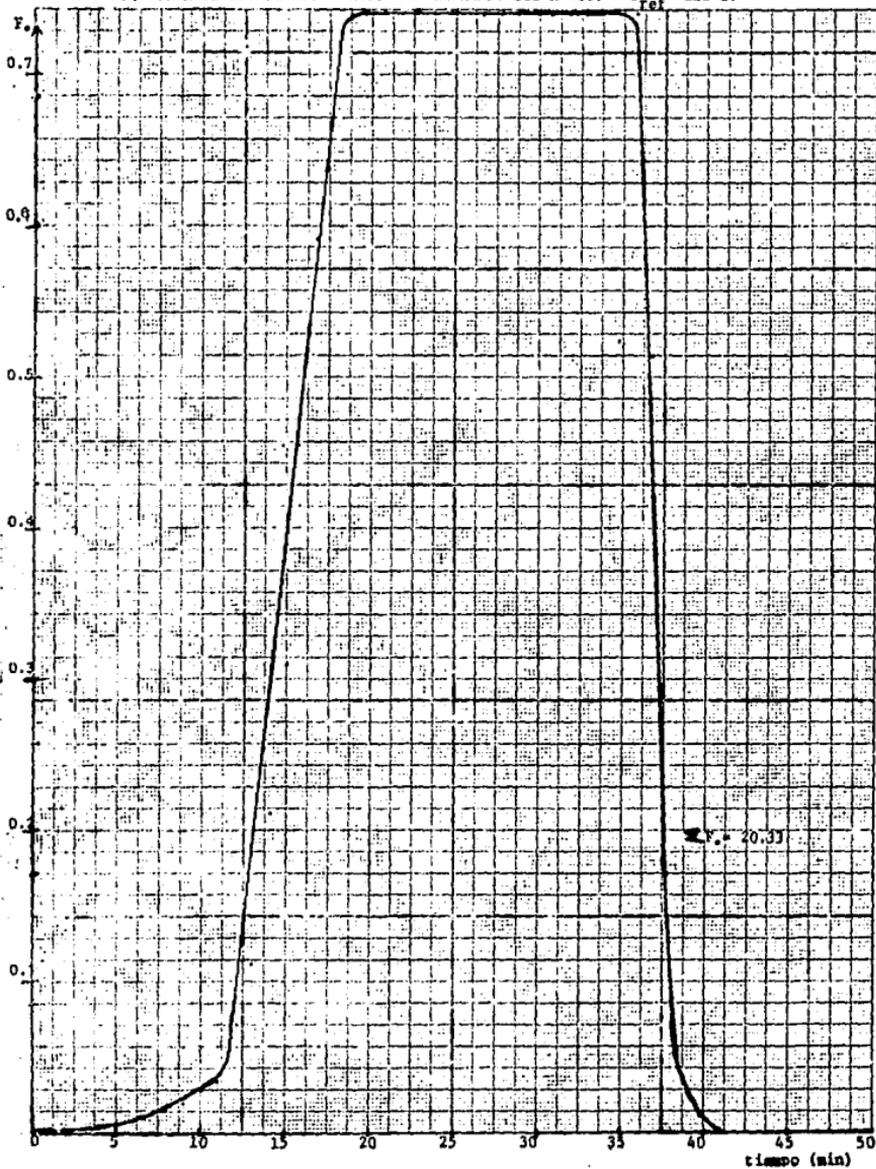
1.2. PENETRACION DE CALOR.

CHAMPIRON REBANADO 211 x 300.

$T_{ref} = 121^{\circ}C.$



LABORATORIO DE INVESTIGACIONES Y DESARROLLO TECNOLÓGICO

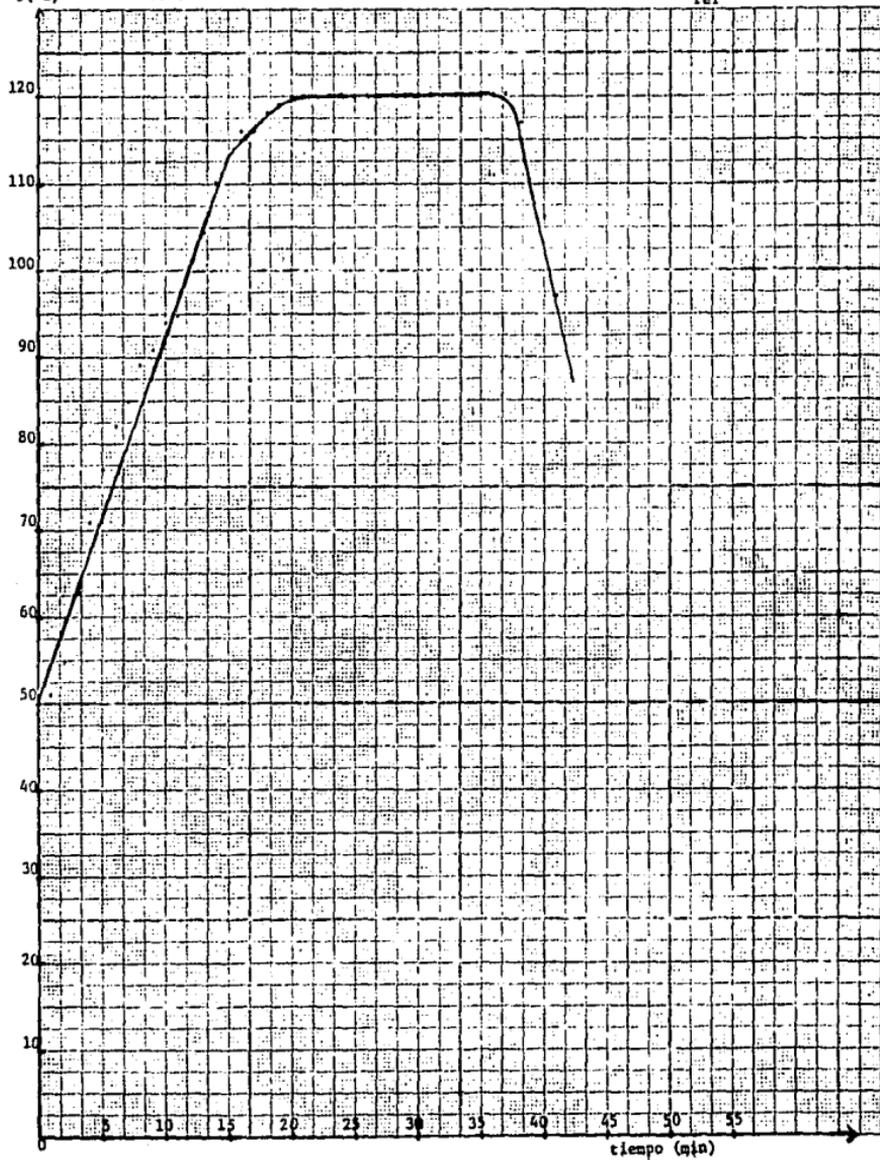


T(°C)

2.1. PENETRACION DE CALOR. CHAMPIÑON REBANADO 303 x 406.

T<sub>ref</sub> = 121°C.

- 95 -

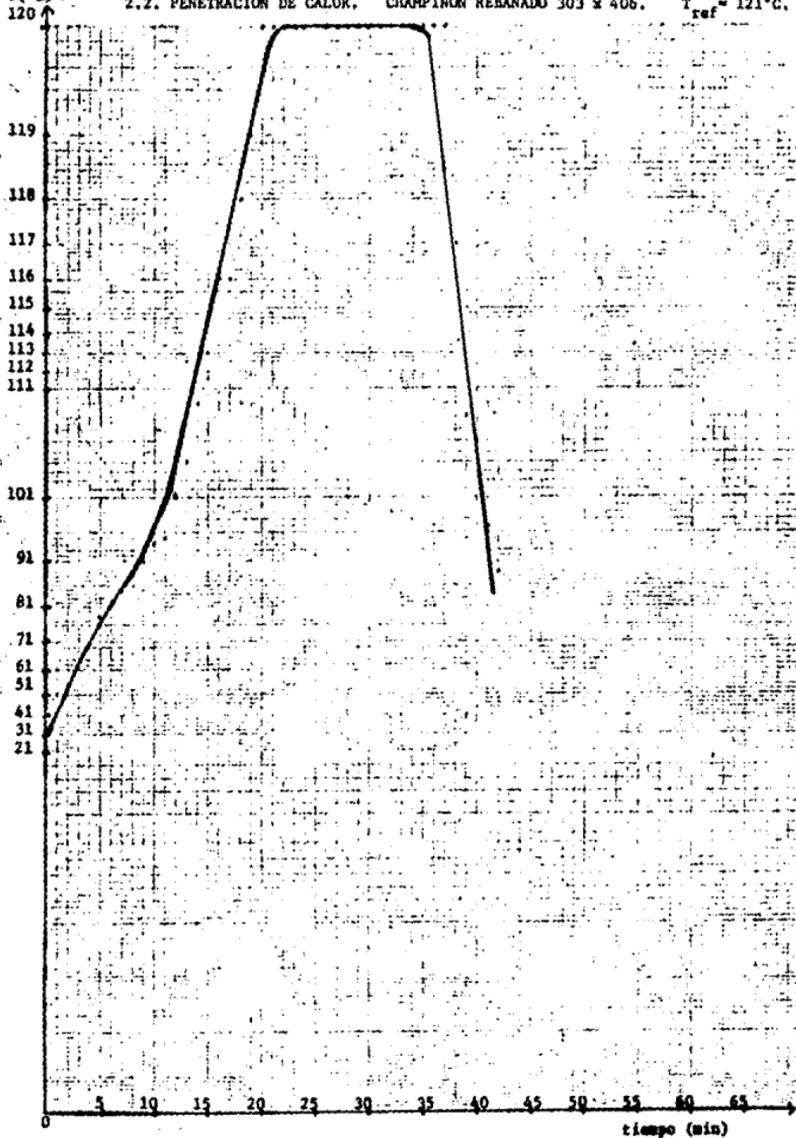


T(°C)

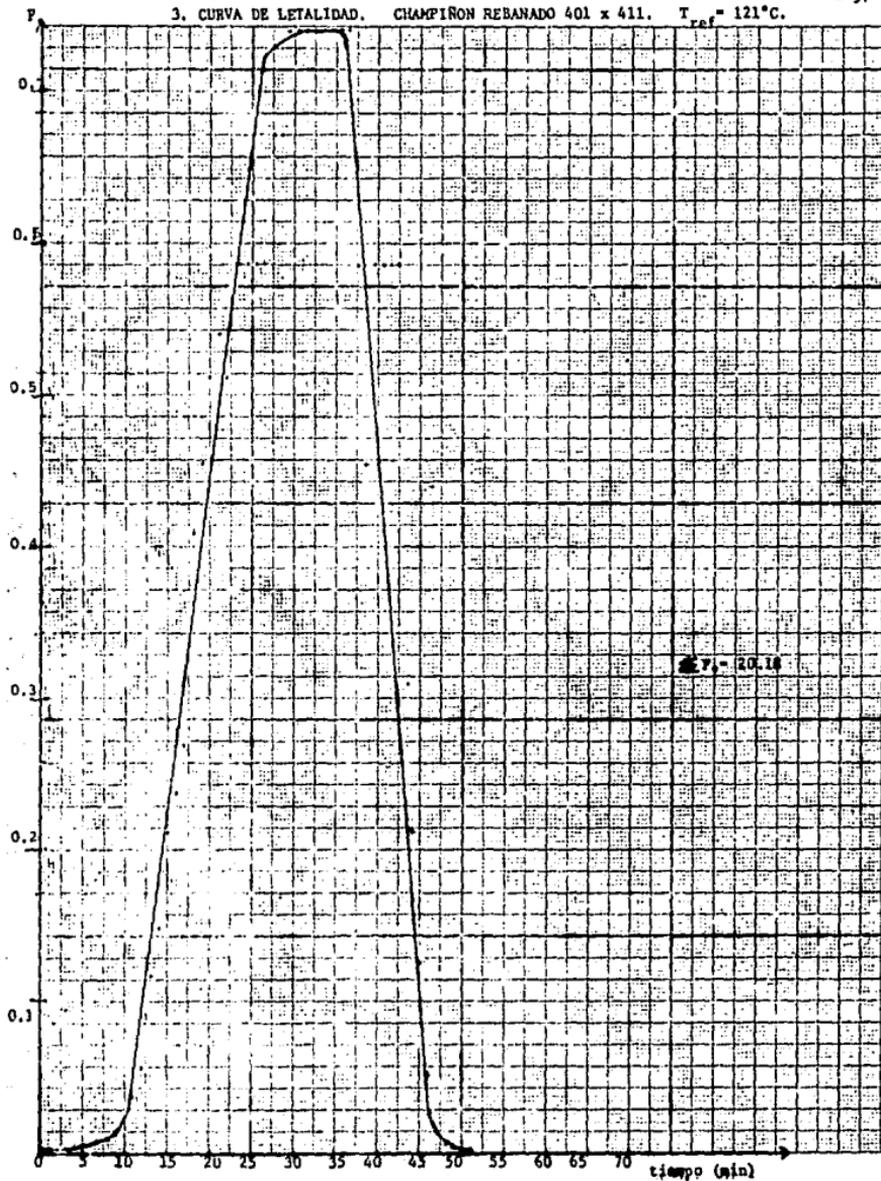
2.2. PENETRACION DE CALOR. CHAMPIÑON REBANADO 303 x 406.

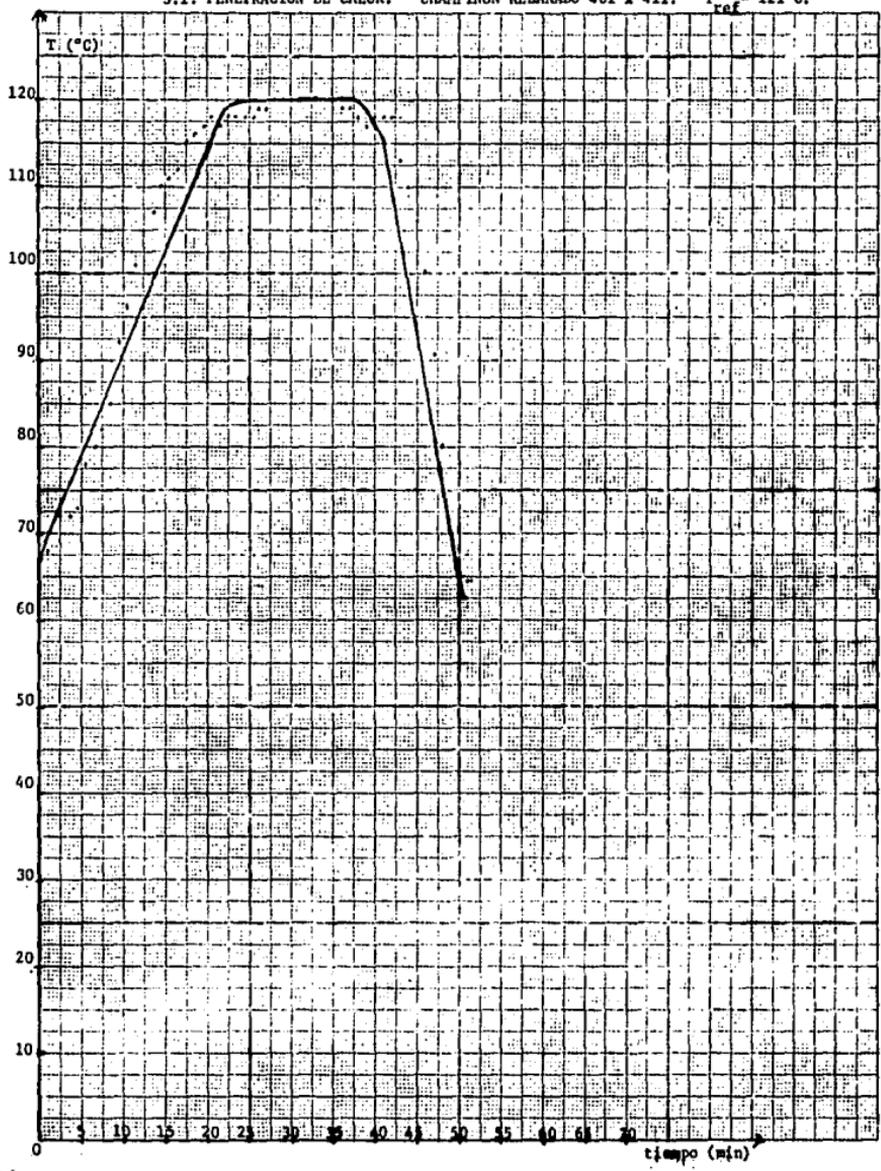
 $T_{ref} = 121^{\circ}\text{C}$ .

- 96 -



3. CURVA DE LETALIDAD. CHAMPIÑON REBANADO 401 x 411.  $T_{ref} = 121^{\circ}C.$



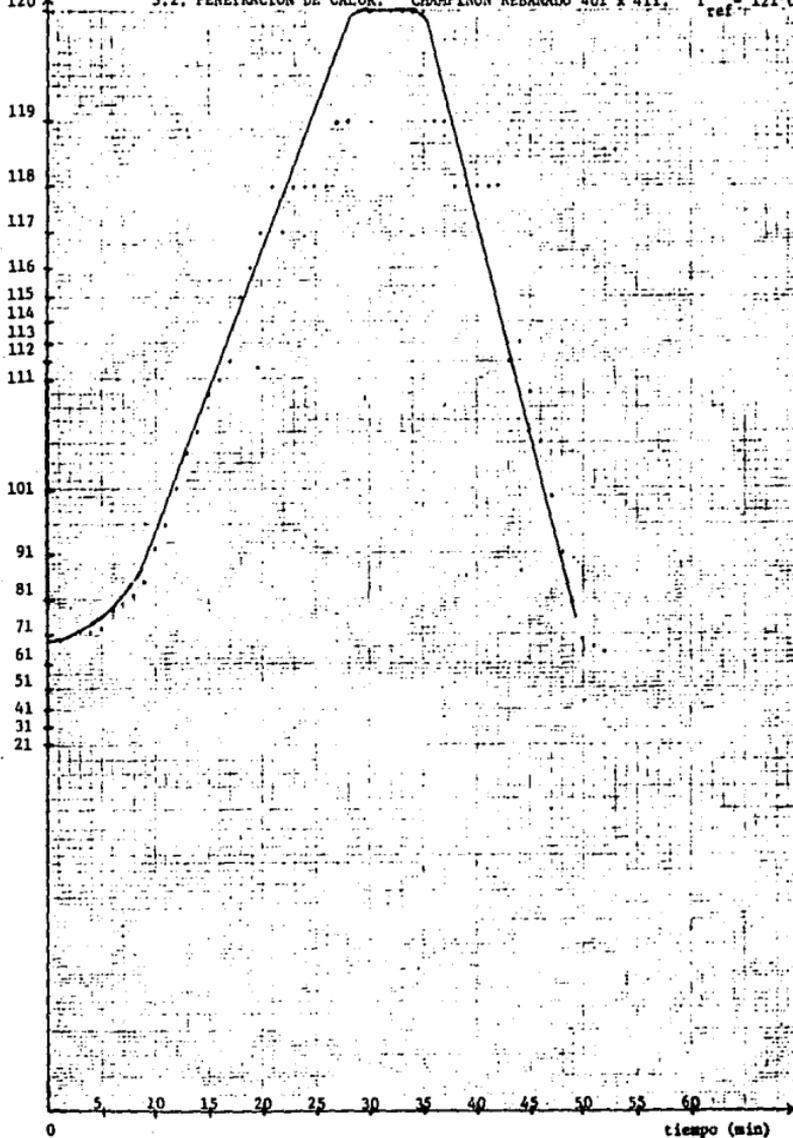


T (°C)

3.2. PENETRACION DE CALOR. CHAMPIÑON REBANADO 401 x 411.

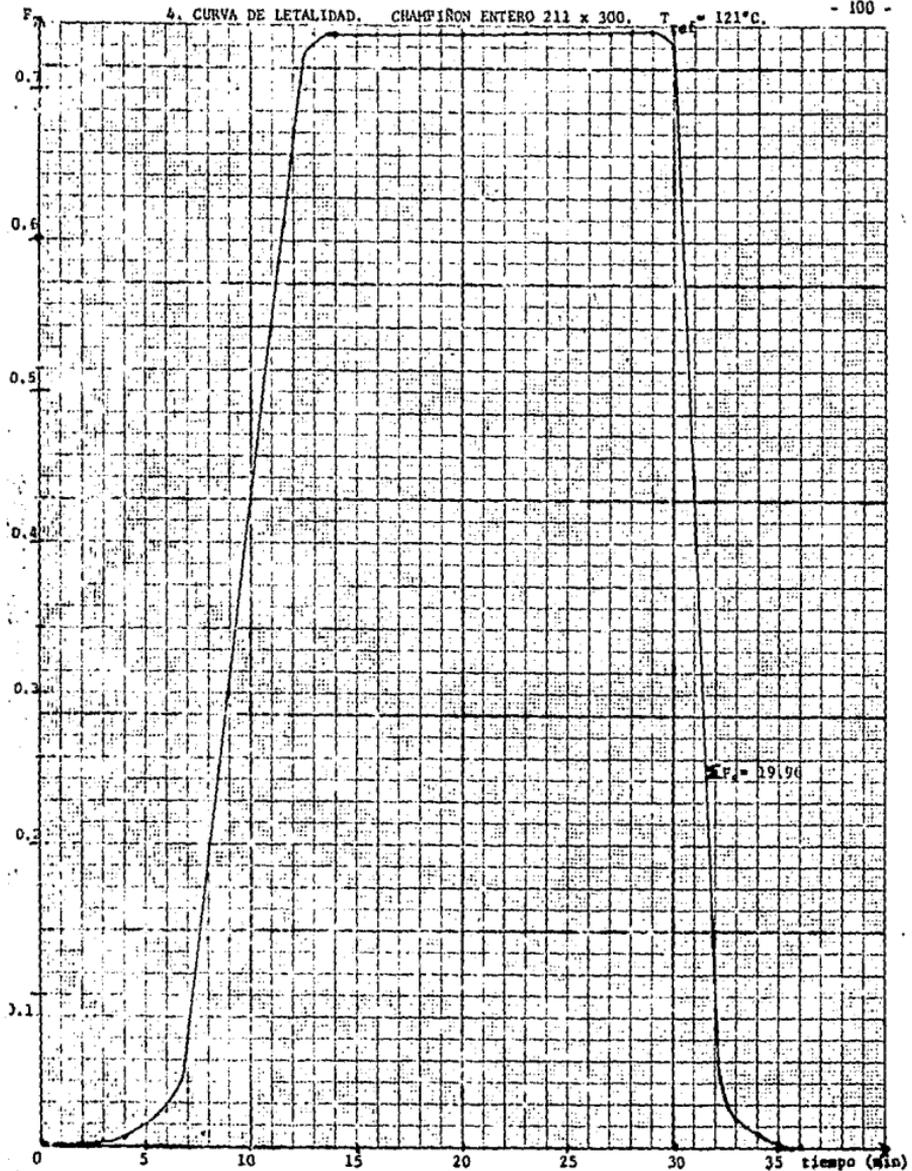
$T_{ref} = 121^{\circ}C$ .

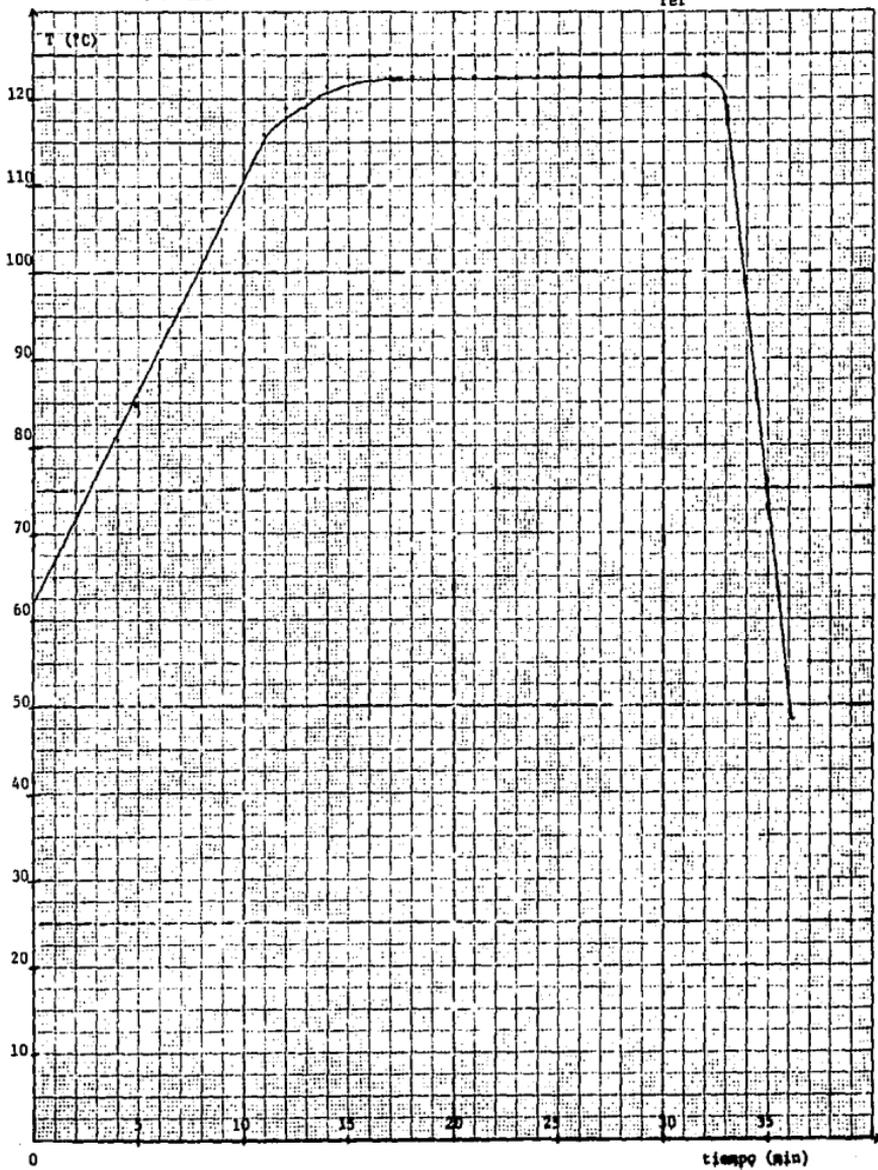
- 99 -



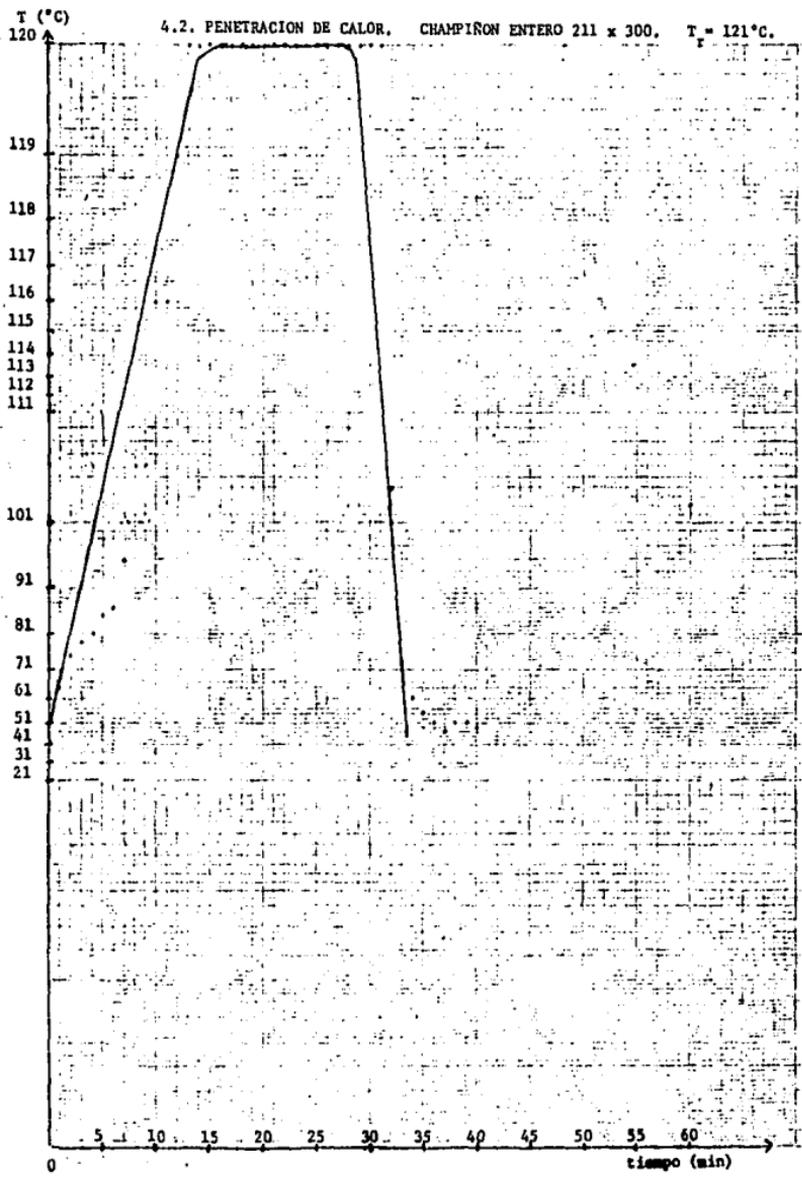
INFORMACION DE LA SERIE EXPERIMENTAL

4. CURVA DE LETALIDAD. CHAMPIÑON ENTERO 211 x 300. T<sub>ref</sub> = 121°C.



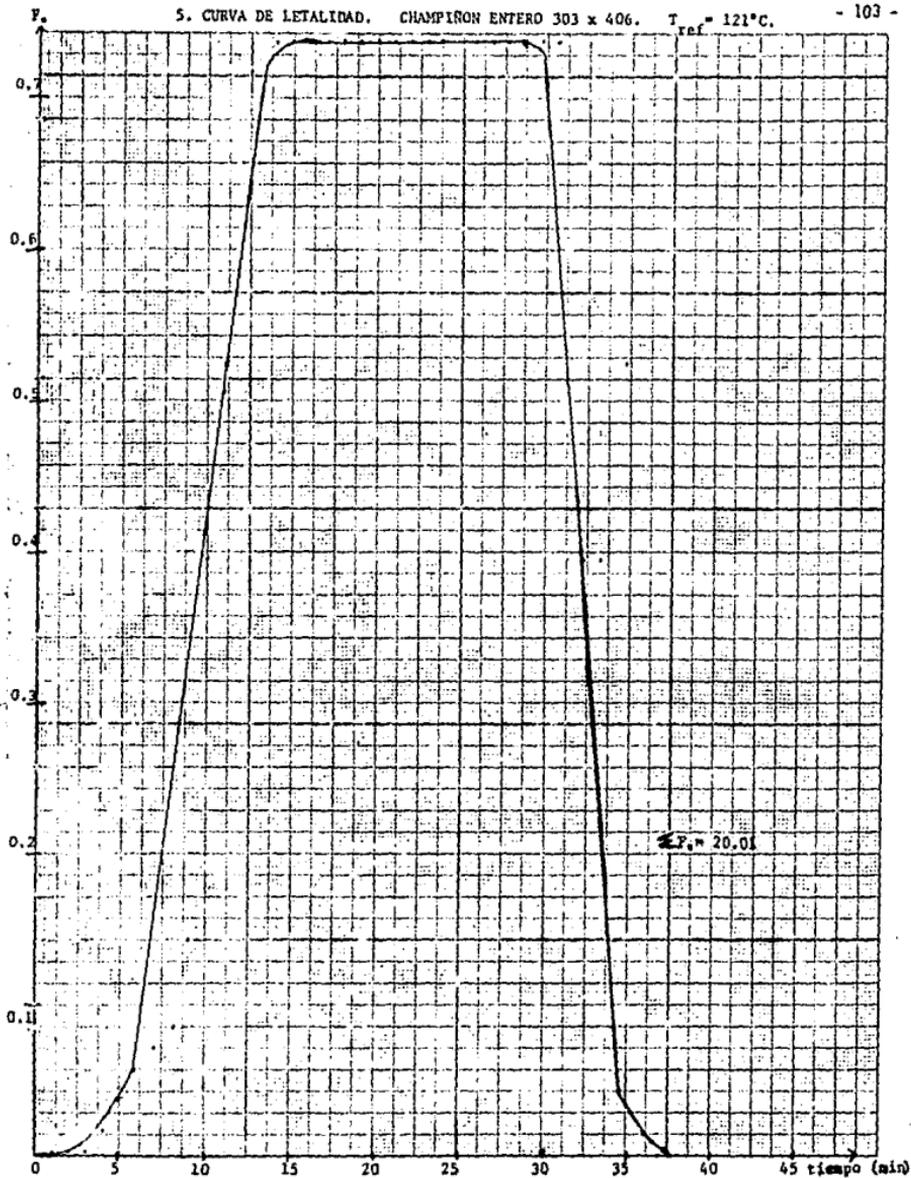


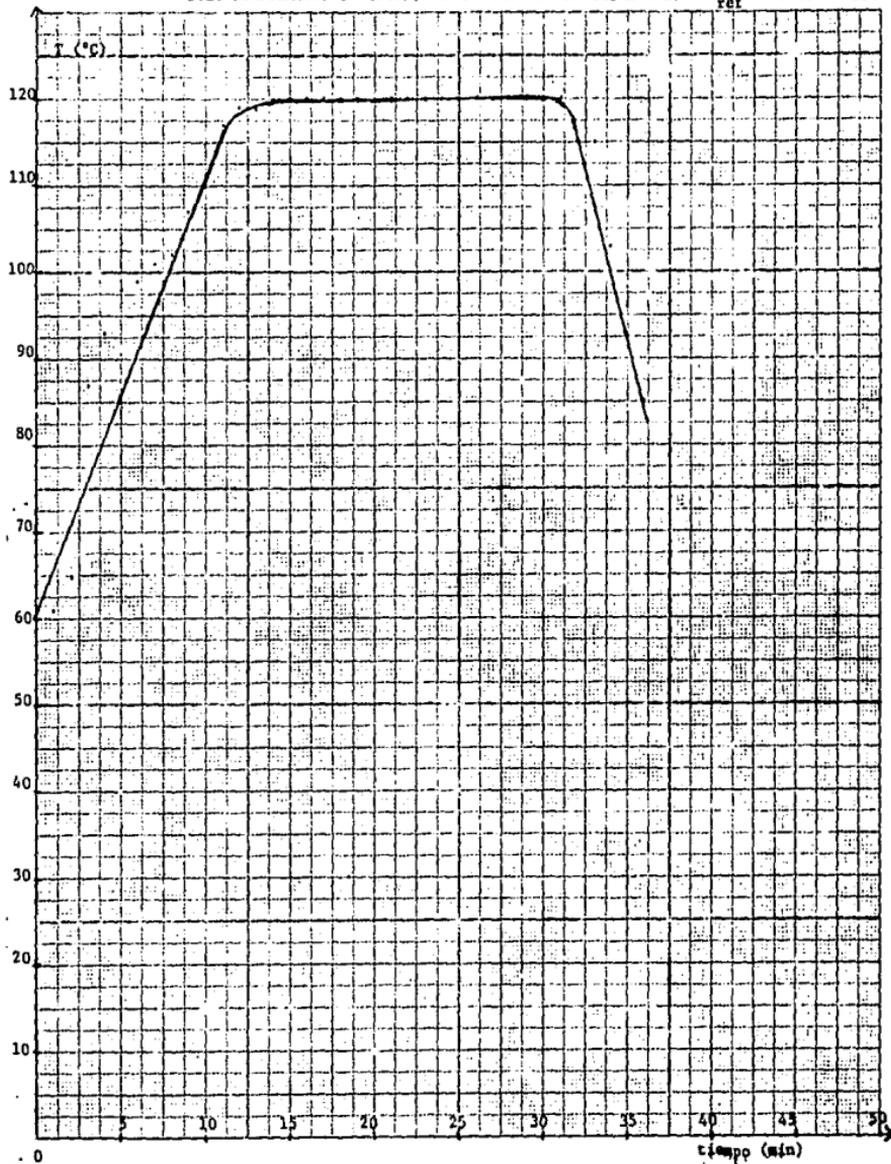
4.2. PENETRACION DE CALOR. CHAMPIÑON ENTERO 211 x 300. T = 121°C.



LABORATORIO DE INVESTIGACIONES

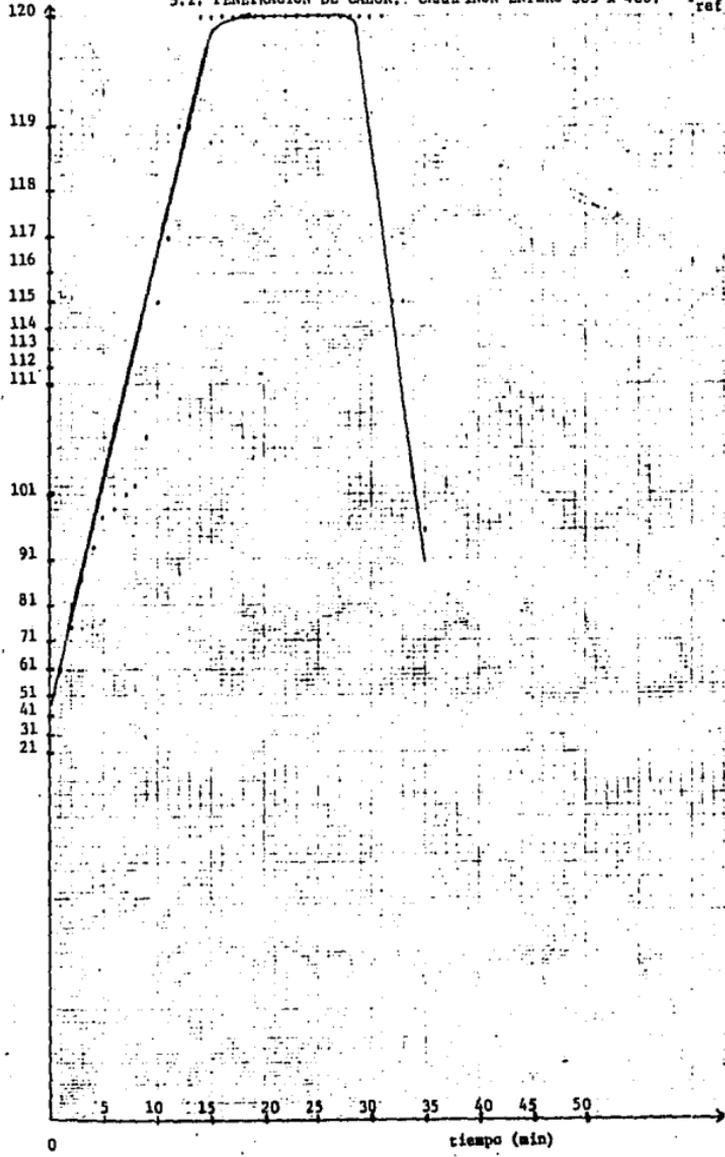
5. CURVA DE LETALIDAD. CHAMPIÑON ENTERO 303 x 406.  $T_{ref} = 121^{\circ}C.$





T (°C)

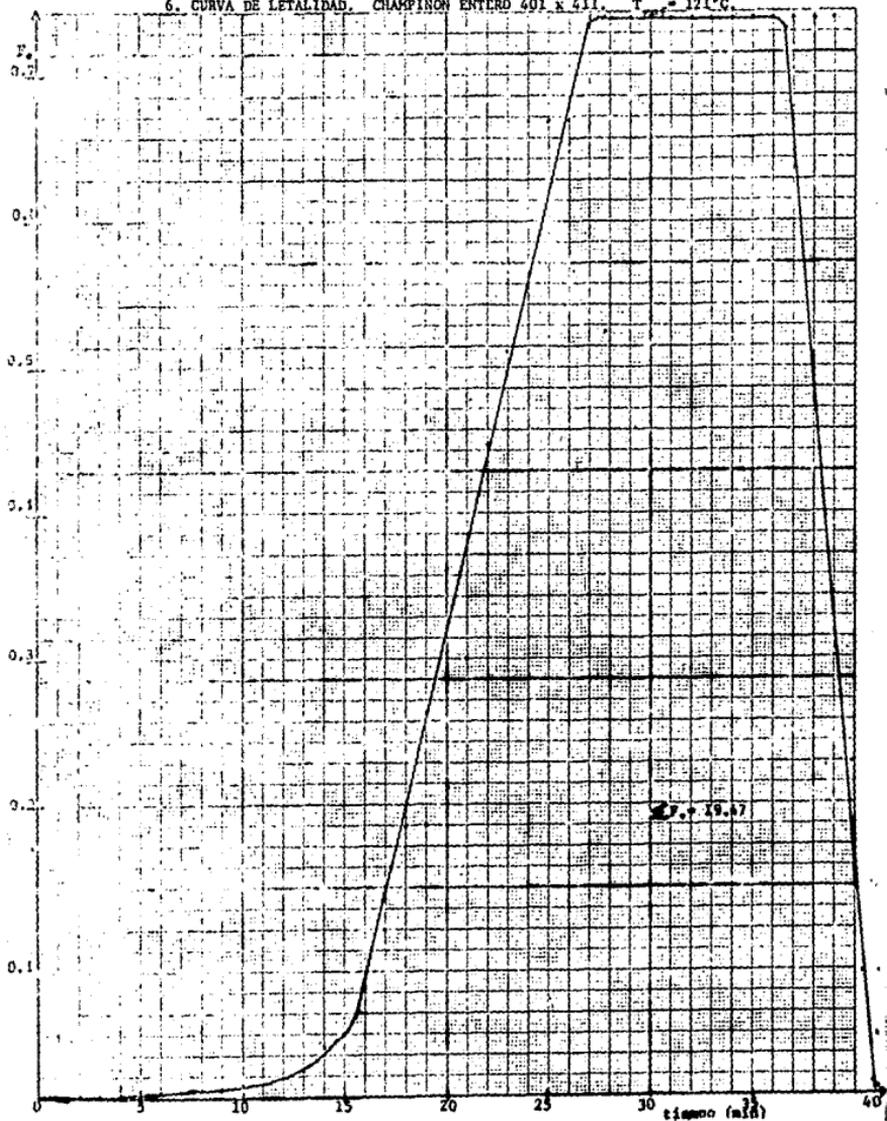
5.2. PENETRACION DE CALOR.. CHAMPINON ENTERO 303 x 406. T<sub>ref</sub> = 121°C. - 105 -

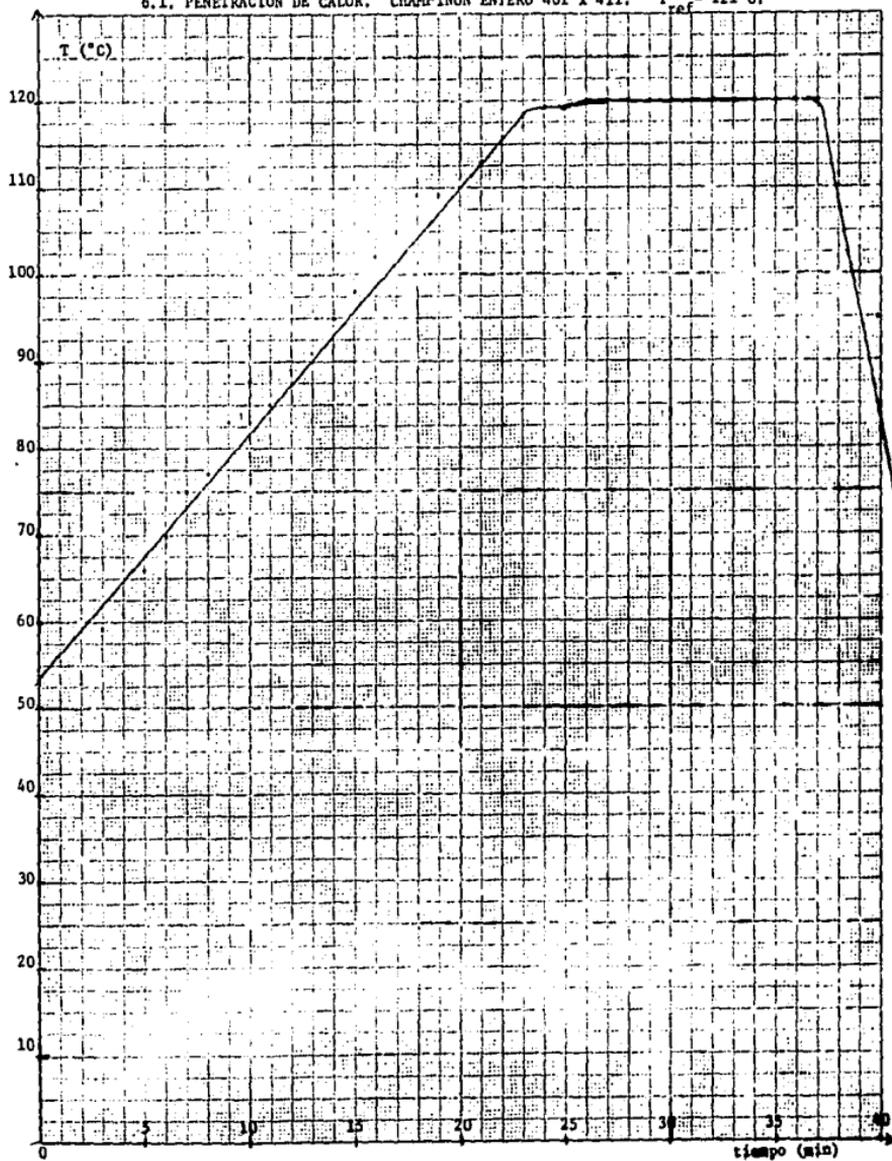


0

tiempo (min)

6. CURVA DE LETALIDAD. CHAMPIRON ENTERO 401 x 411. T<sub>ref</sub> = 121°C.

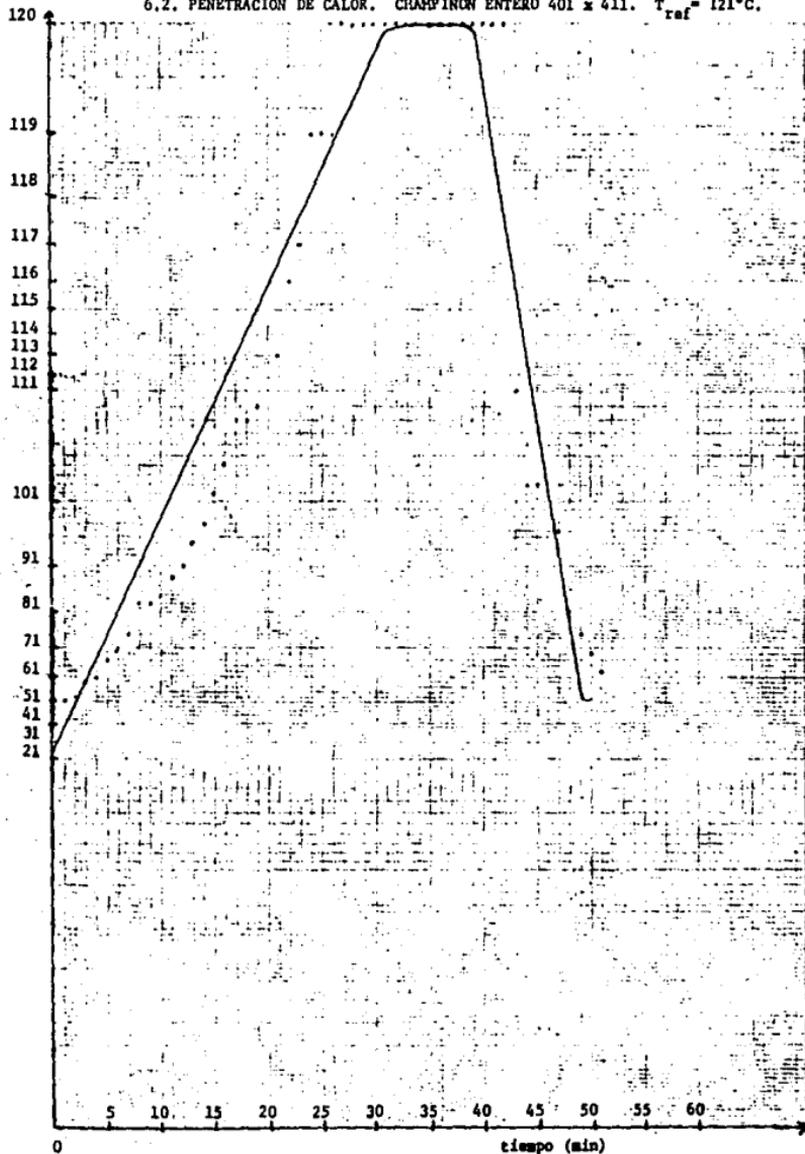




T (°C)

6.2. PENETRACION DE CALOR. CHAMPINON ENTERO 401 x 411. T<sub>ref</sub> = 121°C.

- 108 -



CAPITULO 5. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA BASICA.-

- Cita No. 1: Costell, Elvira y Durán, Luis. 1973. Esterilización de Conservas. Fundamentos Teóricos y Cálculos del Tiempo de Esterilización. Asociación de Investigación de Conservas Vegetales. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. España. pág. 3
- 2: National Canners Association. 1975. Canned Foods. Principles of Thermal Process Control and Container Closure Evaluation. 2nd. ed. Edited and Illustrated by Staff Members of the National Canners Association. Research Laboratories. U.S.A., pág. 99
- 3: Ob. Cit. No. 1:4
- 4: Board, P.W., Gallop, R.A. & Sykes, S.M. 1966 a. Quality of Canned Berry Fruits. 1. The Influence of Sucrose Concentration and of Low Methoxyl Pectin added to the Syrup. Food Tech. 20:109.
- 5: Board, P.W., Gallop, R.A. & Sykes, S.M. 1966 b. Quality of Canned Berry Fruits. 2. The Influence of Exhausting and Thermal Processing Methods. Food Tech. 20:116.
- 6: Lyon, C.E. and Lyon, B.G.; Klose, A.A. and Hudspeth, J.P. 1975. Effects of Temperature-Time Combination on Doneness and Yields of Water-Cooked Broiler Thighs. J. Food Sci.40:129.
- 7: Persson, T., Sydow, E. von, Akesson, C. 1973. Aroma of Canned Beef: Sensory Properties. J. Food Sci.38:386.
- 8: National Canners Association 1968. Laboratory Manual for Food Canners and Processors. Volume One - Microbiology and Processing. NCA Res. Lab. AVI Publishing Co., Inc. Westport, Conn.: 43.

- 9: Vinters, J.E., Patel, R.H. & Halaby, G.A. March 1975. Thermal Process Evaluation by Programmable Computer Calculator. Food Tech. 29 (3):43.
- 10: Williams, O.B. and Clark, E.D. 1942. Bacteriological Survey of Canned Salmon. Fd. Res. 7:178.
- 11: Denny, C.B. 1970. Collaborative Study of Procedure for Determining Commercial Sterility of Low-Acid Canned Foods. JAOAC 53:713.
- 12: Denny, C.B. 1972. Collaborative Study of a Method for the Determination of Commercial Sterility of Low-Acid Canned Foods. JAOAC 55:613.
- 13: Stumbo, C.R. 1973. Thermobacteriology in Food Processing. 2nd. edition. Academic Press, U.S.A.: 9.
- 14: Ball, C.O. and Olson, F.C.W. 1957. Sterilization in Food Technology. McGraw-Hill, New York: 554.
- 15: Ob. Cit. No. 2:35.
- 16: Cameron, E.J. and Esty, J.R. 1940. Comments on the Microbiology of Spoilage in Canned Foods. Food Res. 5:549.
- 17: Cameron, E.J. 1940. Report on Canned Vegetables. JAOAC 23:607.
- 18: Schoenemann, D.R. and Lopez, A. 1973. Heat Processing effects on Physical and Chemical Characteristics of Acidified Canned Tomatoes. J. Food Sci. 38 (2):195.
- 19: Lopez, Anthony Ph. D. 1975. A Complete Course in Canning. 10th. ed. Vol. I. The Canning Trade. Baltimore, Maryland: 105.

- 20: Ob. Cit. No. 13:10.
- 21: Ob. Cit. No. 13:10.
- 22: Ob. Cit. No. 19:06.
- 23: Food and Drug Administration 1969. Bacteriological Analytical Manual. 2nd. ed. FDA, Division of Microbiology, USA. pH Ranges, Section 42.03.
- 24: Home Canning. A Scientific Status Summary by the Institute of Food Technologists. Expert Panel on Food Safety & Nutrition and the Committee on Public Information. 1977. Food Tech. 31 (6):46.
- 25: Adams, H.W. 1961. A statistical Survey of pH Variation and Sodium Content of Tomatoes. Food Tech. 15:16.
- 26: Lopez, A., Cooler, F.W. and Wyatt, W.B. 1968. Acidification of Canned Mid-Atlantic Tomatoes. Canning Trade 90 (20):8.
- 27: Pelczar, Michael Jr. and Reid, R.D. 1978. Microbiologia. McGraw-Hill México:93.
- 28: Ob. Cit. No. 13:13.
- 29: Ob. Cit. No. 2:35.
- 30: Desrosier, Norman W. & Desrosier, James N. 1977. The Technology of Food Preservation. 4th. ed. AVI Pub. Co. Inc. USA: 241.
- 31: Ob. Cit. No. 2:43.
- 32: Lamanna, C. and Mallette, M.F. 1954. Basic Bacteriology. The Williams and Wilkins Co., Baltimore:42.

- 33: Weiser, Harry H. Ph. D., Mountney, George J. Ph. D. & Gould, Wilbur A. Ph. D. 1971. Practical Food Microbiology and Technology. 2nd. ed. AVI Pub. Co. Inc. Westport, Conn.:79.
- 34: Ob. Cit. No. 33:79.
- 35: Ob. Cit. No. 33:80.
- 36: Ob. Cit. No. 1:6.
- 37: Ob. Cit. No. 1:8.
- 38: Lynt, R.K., Kautter, D.A. and Read, R.B. Jr. 1975. Botulism in Commercially Canned Foods. J. Milk Food Tech.38(9):546.
- 39: National Canners Association. April, 1976. Processes for Low - Acid Canned Foods in Metal Containers. Res. Lab. Bull. 26 - L 11th. edition. Washington, D.C.: 98.
- 40: MMWR 1980. Mushrooms Possibly Contaminated with Botulinal Toxin, Morbidity and Mortality Weekly Report. 29 (2):262.
- 41: Ob. Cit. No. 13:13.
- 42: Ob. Cit. No. 14:552.
- 43: Food and Drug Administration 1979. Thermally Processed Low-Acid Foods Packaged in Hermetically Sealed Containers. 21 Code of Fed. Reg. Part. 113.
- 44: Ob. Cit. No. 9:42.
- 45: Ob. Cit. No. 13:9.
- 46: Food and Drug Administration 1973. Federal Register 38 (116): 2401, January 24.

- 47: Food and Drug Administration 1977. Part 113. Thermally Processed Low-Acid Foods Packaged in Hermetically Sealed Containers. FDA Fed. Reg. 45 (50):14341.
- 48: Ob. Cit. No. 8:220.
- 49: Ob. Cit. No. 9:111.
- 50: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 1976. Prepared by the APHA Intersociety/Agency Committee on Microbiological Methods for Foods. Marvin L. Speck, Editor. Washington, USA. 2nd. ed.:633.
- 51: Jacobs, Richard A., Kempe, Lloyd L. and Milone, Nicholas A. 1973. High Temperature-Short-Time (HTST) Processing of Suspensions Containing Bacterial Spores. J. Food Sci. 38 (1):168.
- 52: Busta, F.F. 1967. Thermal Inactivation Characteristics of Bacterial Spores at Ultra High Temperatures. Appl. Microbiol. 15:640.
- 53: Ob. Cit. No. 47:14342.
- 54: Segner, Wayne P. January 1979. Mesophilic Aerobic Sporeforming Bacteria in the Spoilage of Low-Acid Canned Foods. Food Tech. 33 (1):55.
- 55: Botulism. A Scientific Status Summary by the Institute of Food Technologists' Expert Panel on Food Safety and Nutrition. Nov-Dec. 1972. J. Food Sci. 37 (6):985.
- 56: Ob. Cit. No. 19:107
- 57: Ob. Cit. No. 19:108.
- 58: Ob. Cit. No. 19:108.

- 59: Ob. Cit. No. 24:46.
- 60: Bigelow, W. D. & Esty, J.R. 1920. The Thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. J. Infect. Dis. 27:602.
- 61: Esty, J.R. & Williams, C.C. 1924. Heat resistance studies. I. A new method for determination of heat resistance of bacterial spores. J. Infect. Dis. 34:516.
- 62: Dickson, E.C., et.al. 1925. Studies on the thermal death time of spores of C.l. botulinum. J. Infect. Dis. 36:472.
- 63: Stumbo, C.P., et. al. 1945. Bacteriological studies relating to thermal processing of canned meats. Food Res. 10:260.
- 64: Gross, C.E., et. al. 1946. Bacteriological studies relating to thermal processing of canned meats. 4. Viability of spores of a putrefactive anaerobic bacterium in canned meat after prolonged incubation. Food Res. 11:399.
- 65: Anellis, A., et. al. 1954. Heat resistance in eggs of some strains of the genus Salmonella. Food Res. 19:377.
- 66: Roberts, T.A., et. al. 1965. The heat resistance of spores of C.l. botulinum type E to heat and radiation. J. Appl. Bacteriol. 28:125.
- 67: Roberts, T.A., et. al. 1966. The effect of sodium nitrite on the recovery of heated bacterial spores. J. Food Technol. 1:47.
- 68: Segner, W.P. and Schmidt, C.F. 1971. Heat resistance of spores of marine and terrestrial strains of C.l. botulinum type C. Appl. Microbiol. 22:1030.

69: Futter, B.V. and Richardson, G. 1972. Viability of Clostridial spores and the requirements of damaged organisms. 3. The effect of delay in plating after exposure to the bactericidal influence. J. Appl. Bacteriol. 35:301.

70: Ob. Cit. No. 1:11.

71: Ob. Cit. No. 1:13.

72: Ob. Cit. No. 1:16.

73: Ob. Cit. No. 1:17.

74. Ob. Cit. No. 1:19.

75: Ob. Cit. No. 1:21.

76: Radio waves monitor product temperature. Food Engineering. June 1971.

77: Méthode bactériologique pour la détermination de la valeur Stérilisatrice. Revue de la Conserve, Juin 1972.

78: Ob. Cit. No. 1:24.

79: Ob. Cit. No. 1:26.

80: Ob. Cit. No. 17:6.

81: Ob. Cit. No. 17:9.

82: Ob. Cit. No. 17:15.

83: Ob. Cit. No. 17:22.

84: Fernández Escartín, Eduardo. Microbiología Sanitaria. Agua y Alimentos. Volumen I. Ed. Universidad de Guadalajara. Pág. 602-604.