

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**INFLUENCIA DE LAS PROPIEDADES
ESTRUCTURALES DE LOS ALIMENTOS
EN EL DESARROLLO DE
MICROORGANISMOS PATÓGENOS**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER
POR**

PAULA ALONSO GARCÍA

JULIO, 2019



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a las siguientes personas la ayuda recibida para la realización del presente trabajo:

A mis tutoras, las Doctoras Amanda Laca y Adriana Laca, por su amabilidad y estar siempre disponibles para ayudarme con cualquier dificultad que me surgió y por los consejos y conocimientos aportados en relación con la realización del proyecto.

A los compañeros de laboratorio del departamento con los que compartí tantas horas de laboratorio y me ayudaron cuando lo necesité.

A mis compañeros del máster por todas las horas de clase, estudio y laboratorio compartidas ayudándonos unos a otros siempre que fue posible.

A mi familia por todo el apoyo recibido este año.

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
LISTA DE FIGURAS	3
LISTA DE TABLAS	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	10
2.1. ETAs e inocuidad alimentaria	10
2.2. El huevo.....	12
2.2.1. Estructura y composición del huevo.....	12
2.2.2. Huevo y ETAs	14
2.3. El carragenato como texturizante alimentario	16
2.4. Alimentos modelo	18
2.5. Microorganismos modelo, cinética microbiana y microbiología predictiva	19
2.3.1. Microorganismos modelo	19
2.3.2. Cinética microbiana.....	20
2.3.3. Microbiología predictiva	22
2.4. Reología y textura de los alimentos.....	23
2.4.1. Reología de los alimentos.....	23
2.4.2. Textura de los alimentos.....	26
3. MATERIAL Y MÉTODOS	28
3.1. Cepa bacteriana, condiciones de cultivo y toma de muestras.....	28
3.1.1. Cepa bacteriana.....	28
3.1.2. Condiciones de cultivo	28
3.1.3. Toma de muestras.....	31
3.2. Reometría	31

3.3. Texturometría	33
3.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	34
3.5. Medida del pH	35
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1. Caracterización del alimento modelo	36
4.1.1. Ensayos de reometría.....	36
4.1.2. Ensayo de texturometría	52
4.1.3. Observación microscópica (SEM).....	54
4.2. Crecimiento de <i>Staphylococcus warneri</i>	56
4.3. Análisis del efecto de la estructura de la matriz alimentaria sobre el crecimiento de <i>S. warneri</i>	61
5. CONCLUSIONES.....	64
6. BIBLIOGRAFÍA	65

RESUMEN

El desarrollo y consumo de alimentos inocuos es un aspecto muy importante a tener en cuenta a la hora de prevenir las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs). Estas enfermedades se producen debido a la presencia de microorganismos patógenos, así como de toxinas, en gran variedad de alimentos, entre los que se encuentran los huevos y ovoproductos, ampliamente consumidos a nivel mundial. Asimismo, en la industria alimentaria es frecuente el uso de ingredientes espesantes, como el alginato, el agar o el carragenato, por ejemplo, en la elaboración de flanes, tartas o pudines. Los espesantes permiten obtener alimentos sólidos o semisólidos con distinta estructura, que pueden influir en el desarrollo de posibles microorganismos contaminantes.

El objetivo de este trabajo ha sido analizar el posible efecto que la estructura de un alimento ejerce sobre el desarrollo de microorganismos patógenos en un sistema sólido. Para ello, como alimento modelo se emplearon geles de yema de huevo con distintas concentraciones de κ -carragenato y se utilizó *Staphylococcus warneri* como microorganismo modelo del patógeno *Staphylococcus aureus*. Se evaluó el crecimiento de *S. warneri* en dichos geles con igual composición nutricional, pero con diferentes propiedades estructurales, que se caracterizaron mediante técnicas reológicas, texturométricas y microscópicas.

La caracterización reológica reveló que el κ -carragenato incrementa la pseudoplasticidad, el carácter elástico, la fuerza de interacción entre las unidades reológicas y el punto de coagulación de los geles. El análisis de textura mostró que a más concentración de κ -carragenato mayor es la dureza de los geles. Respecto al desarrollo del microorganismo modelo, se encontró que *S. warneri* crece peor en medio líquido que en presencia del espesante, si bien la velocidad específica de crecimiento decrece ligeramente al incrementar la concentración de κ -carragenato. Asimismo, se encontró una relación lineal inversamente proporcional entre la velocidad máxima de crecimiento de *S. warneri* y los parámetros que determinan la dureza y la elasticidad de los geles.

ABSTRACT

The development and consumption of innocuous foods is a key issue to be considered in order to prevent foodborne diseases. These diseases are originated by the presence of pathogen microorganisms and toxins in a huge variety of foodstuffs. Eggs and egg products, which are widely consumed worldwide, can be found among these foodstuffs. Additionally, in food industry is common the use of thickening agents, such as alginate, agar or carrageenan, as ingredients in flan, cakes and puddings, for example. Thickening agents allow to obtain solid or semisolid foods with different structure, which can affect the development of contaminant microorganisms.

The aim of this work has been to analyse the potential effect of food structure on the development of pathogen microorganisms in a solid system. For this purpose, gels of egg yolk with different concentrations of κ -carrageenan were developed and *Staphylococcus warneri* was employed as a surrogate of the pathogen *Staphylococcus aureus*. *S. warneri* growth was evaluated in these gels, which presented the same nutritional composition, but different structural properties. These gels were characterised by means of rheological, textural and microscopic measurements.

Rheological characterisation revealed that κ -carrageenan increases the pseudoplastic character, the elastic behaviour, the strenght of interaction between rheological units and the coagulation point in gels. Textural analysis showed that gel strenght increases with κ -carrageenan concentration. Regarding the development of model microorganism, *S. warneri* growth was better in solid systems than in liquid media. In addition, the maximum specific growth rate decreased when κ -carrageenan concentration increased. Moreover, an inverse linear correlation between maximum specific growth rate of *S. warneri* and the parameters that determine strength and elasticity of gels was found.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de un corte transversal de un huevo de gallina.....	13
Figura 2. Principales tipos de carragenato usados en la industria alimentaria	17
Figura 3. Mecanismo de formación de gel de κ -carragenato..	18
Figura 4. Cinética microbiana donde se representan las UFC/g o UFC/ml en escala logarítmica frente al tiempo.....	21
Figura 5. Clasificación de los fluidos no newtonianos.....	24
Figura 6. Preinóculo en matraz Erlenmeyer de 500mL con medio yema 10% (v/v) y <i>S. warneri</i> en una concentración de 10^7 UFC/ml tras ser incubado durante 1 día.	29
Figura 7. Tubo Falcon con medio yema de huevo/ κ -carragenato al 0.5% (p/v)	30
Figura 8. Tubos Falcon con medio yema de huevo/ κ -carragenato al 2% (p/v).....	31
Figura 9. Reómetro HAAKE MARSS II (ThermoFisher Scientific) empleado en los ensayos de reometría.	32
Figura 10. Texturómetro TA XTplus (Stable Micro Systems) con sonda Cylinder Probe (P/0.5R) empleado en los ensayos de texturometría.....	33
Figura 11. Jarras Bloom con gel de yema de huevo/ κ -carragenato al 1% (p/v).....	34
Figura 12. Microscopio electrónico de barrido JEOL-6610LV empleado en el ensayo de microscopía.....	34
Figura 13. Curva de flujo para los geles yema de huevo/ κ -carragenato	37
Figura 14. Curva de viscosidad para los geles de yema de huevo/ κ -carragenato	37
Figura 15. Relación entre la <i>n</i> y la concentración de κ -carragenato de los geles de yema de huevo/ κ -carragenato	39
Figura 16. Curva de coagulación para el medio sin κ -carragenato	41
Figura 17. Curva de coagulación para gel de yema de huevo/ κ -carragenato al 0.75% (p/v)..	41
Figura 18. Curva de coagulación para gel de yema de huevo/ κ -carragenato al 1% (p/v).	42
Figura 19. Curva de coagulación para gel de yema de huevo/ κ -carragenato al 1.25% (p/v).	42
Figura 20. Curva de coagulación para gel de yema de huevo/ κ -carragenato al 1.5% (p/v)	42

Figura 21. Curva de coagulación para gel de yema de huevo/ κ -carragenato al 1,75% (p/v)	43
Figura 22. Curva de coagulación para gel de yema de huevo/ κ -carragenato al 2% (p/v).	43
Figura 23. Ajuste lineal entre la temperatura de coagulación y la concentración de κ -carrageanto.	43
Figura 24. Barrido de frecuencias para el medio sin κ -carragenato. Los valores de frecuencia se representan en rad/s, frente a G' y G'' en Pa.	45
Figura 25. Barrido de frecuencias para los seis geles de yema de huevo/ κ -carragenato.	45
Figura 26. Ajuste lineal entre el módulo elástico G' y la concentración de κ -carragenato (%) para los seis geles de yema de huevo/ κ -carragenato ensayados.	46
Figura 27. Representación del módulo complejo frente a la frecuencia para los seis geles ensayados.	47
Figura 28. Ajustes de la ecuación indicada en el texto para el medio sin κ -carragenato.	48
Figura 29. Ajustes de la ecuación indicada en el texto para el medio con κ -carragenato 0.75% (p/v).	48
Figura 30. Ajustes de la ecuación indicada en el texto para el medio con κ -carrageanto al 1% (p/v).	48
Figura 31. Ajustes de la ecuación indicada en el texto para el medio con κ -carrageanto al 1.25% (p/v).	49
Figura 32. Ajustes de la ecuación indicada en el texto para el medio con κ -carragenato al 1.5% (p/v).	49
Figura 33. Ajustes de la ecuación indicada en el texto para el medio con κ -carrageanto 1.75% (p/v).	49
Figura 34. Ajustes de la ecuación indicada en el texto para el medio con κ -carragenato 2% (p/v).	50
Figura 35. Relación entre la $\tan \delta$ y la concentración de κ -carragenato (%).	52
Figura 36. Gráfica obtenida del programa del texturómetro utilizado en este estudio. Se representa la Fuerza (g) frente al tiempo para cuatro muestras del gel de yema de huevo/ κ -carragenato al 1% (p/v).	53

Figura 37. Imagen al microscopio electrónico de barrido de las muestras de geles de yema de huevo/ κ -carragenato al 1% (A), 1.25% (B), 1.5% (C) y 1.75% (D) tras ser incubados con <i>S. warneri</i> durante 24 horas	54
Figura 38. Imagen al microscopio electrónico de barrido de la superficie de geles de yema de huevo/ κ -carragenato al 1% (A), 1.25% (B), 1.5% (C) y 1.75% (D) sin inocular a <i>S. warneri</i> . También se muestra una imagen de κ -carragenato al 1.5% sin yema (E) y sin inocular.	55
Figura 39. Curva de crecimiento de <i>S. warneri</i> donde se representan las UFC/g en escala logarítmica frente al tiempo para los siete medios de yema de huevo/ κ -carragenato	57
Figura 40. Representación de \ln (UFC/g) frente al tiempo para el gel de yema de huevo/ κ -carragenato del 1% (p/v) según el ajuste de la ecuación de primer orden.....	58
Figura 41. Ajuste lineal entre la concentración de κ -carragenato frente a μ_{max} para los seis geles de yema de huevo/ κ - carragenato.	61
Figura 42. Relación lineal entre la μ_{max} obtenida del recuento del microorganismo frente al módulo elástico (G') obtenido de los ensayos de reometría	63
Figura 43. Relación lineal entre la μ_{max} obtenida del recuento del microorganismo frente a la fuerza “Bloom” obtenida en los ensayos de texturometría.....	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales enfermedades de transmisión alimentaria.....	11
Tabla 2. Propiedades primarias que definen la textura.....	26
Tabla 3. Datos de la n, K y ajuste de r^2 obtenidos para los seis geles de yema de huevo/ κ -carragenato según el modelo de Herchel-bulkey.....	38
Tabla 4. Parámetros A y z obtenidos del ajuste para barridos de frecuencia indicada en el texto.	50
Tabla 5. Valores medios junto con la desviación estándar de la fuerza “Bloom” (g) para los seis geles de yema de huevo/ κ -carragenato ensayados.....	53
Tabla 6. Datos de μ_{\max} obtenidos a partir del ajuste de los datos de crecimiento en la fase exponencial a la ecuación cinética de primer orden indicada en el texto.....	59

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs) implican un gran abanico de dolencias, causadas por diversidad de microorganismos y sustancias químicas tóxicas, que constituyen un problema de salud pública a nivel mundial, tanto en los países desarrollados como en los de en vías de desarrollo. Millones de personas enferman y miles mueren al año en todo el mundo por esta causa, afectado gravemente a niños, ancianos y enfermos. Además, suponen un impacto a la economía y desarrollo de los países, así como al comercio internacional. Por lo tanto, el consumo de alimentos que no sigan un correcto proceso que asegure una correcta inocuidad alimentaria supone un riesgo para la salud y la economía. De hecho, la Segunda conferencia Internacional FAO/OMS sobre Nutrición, celebrada en Roma en 2014, destacó la importancia de la inocuidad alimentaria para asegurar una mejor nutrición humana (OMS, 2019).

Entre los principales alimentos implicados en las ETAs se encuentran los alimentos de origen animal no cocinados, las frutas y hortalizas, donde la contaminación de estos puede producirse en cualquier fase del proceso productivo. Sin embargo, una gran parte de las ETAs son causadas por aquellos alimentos que han sido preparados o manipulados de forma incorrecta en los hogares, en establecimientos que sirven comida o en los mercados. Los agentes microbiológicos causantes de ETAs pueden ser bacterias (como las pertenecientes a los géneros *Salmonella*, *Campylobacter* o *Echerichia*) virus o parásitos. Las dolencias más comunes comprenden síntomas gastrointestinales, aunque de forma menos frecuente se pueden producir cuadros clínicos más severos (OMS, 2019).

En base a lo anterior, el estudio de los patógenos involucrados en el desarrollo de las ETAs resulta fundamental para establecer protocolos adecuados de manejo y producción de los alimentos. Una de las herramientas de dicho estudio lo constituye la microbiología predictiva que, aunque tiene sus limitaciones, permite estudiar la influencia de determinados parámetros (como pH, temperatura o matriz alimentaria) en el desarrollo de microorganismos perjudiciales (Noriega *et al.* 2008).

Existe una amplia variedad de estudios sobre el desarrollo de microorganismos patógenos en distintos alimentos: como carnes, arroces, quesos, huevos y ovoproductos. En concreto, los huevos son uno de los alimentos de consumo diario ampliamente

producidos a nivel mundial. De hecho, solo en la Unión Europea se producen unos 7 millones de toneladas de huevos por año, donde España es uno de los mayores productores (Abín *et al.* 2018). Por lo tanto, resulta interesante estudiar el desarrollo de microorganismos patógenos potencialmente transmisibles en huevos y sus derivados. Entre estos microorganismos se encuentra *Salmonella*, que es el que ha sido más estudiado, así como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Dada a la escasa bibliografía sobre *S. aureus* en relación con huevos y ovoproductos, es importante evaluar su desarrollo en estos alimentos, ya que la intoxicación por toxinas estafilocócicas es una de las ETAs más comunes a nivel mundial (Yang *et al.* 2001; Hennekinne *et al.* 2012; Kadariya *et al.* 2014; Sanchez *et al.* 2019). Estas toxinas pueden provocar desde cuadros clínicos leves de curación espontánea hasta afecciones graves (Hennekinne *et al.* 2012).

Dada la complejidad de los sistemas alimentarios, debido a una estructura a menudo heterogénea y que cambia con el tiempo, se hace imprescindible el empleo de alimentos modelo a la hora de realizar estudios sobre ETAs. Un alimento modelo es aquel cuyas características han sido determinadas con el objetivo de simplificar los ensayos (Noriega *et al.* 2010; Costello *et al.* 2018; Verheyen *et al.* 2018). De la misma forma, y dado la peligrosidad de algunos microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, se suelen emplear en los estudios microorganismos modelo, los cuales presentan menor grado de patogenicidad y un comportamiento análogo al microorganismo de interés (Noriega *et al.* 2008; Noriega *et al.* 2010; Sinclair *et al.* 2012).

Por otra parte, en la industria alimentaria es muy frecuente el uso de polisacáridos que ofrezcan estabilidad a las suspensiones y emulsiones alimentarias, funcionando como agentes texturizantes (Costello *et al.* 2018). Entre los más empleados se encuentra el alginato, la goma de xantana, las pectinas, la goma arábica y el carragenato (Mancini *et al.* 2002; Zhou *et al.* 2016; Aguilar *et al.* 2017). Concretamente, el carragenato es un agente gelificante ampliamente usado, en concentraciones de 0.005 a 3% (p/v), para la fabricación de salchichas, pudings, flanes, helados, etc. (Manuhara *et al.* 2016; Saha & Bhattacharya, 2010). Por lo tanto, resulta interesante el empleo de texturizantes con el fin de reproducir estas características en un sistema alimentario modelo a la hora de evaluar el desarrollo de microorganismos patógenos causante de ETAs.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar las características de la matriz alimentaria en el desarrollo de microorganismos contaminantes de alimentos. Para ello, se han planteado los siguientes objetivos concretos:

- Caracterizar matrices alimentarias elaboradas con yema de huevo y diferentes concentraciones de κ -carragenato mediante técnicas reométricas, texturométricas y microscópicas.
- Analizar el desarrollo de *Staphylococcus warneri*, considerado microorganismo modelo, en las matrices alimentarias de yema de huevo y κ -carragenato.
- Evaluar la posible relación existente entre las cinéticas de crecimiento del microorganismo y las propiedades reológicas y texturométricas de la matriz alimentaria.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. ETAs e inocuidad alimentaria

Las ETAs son definidas por la OMS como una diversa variedad de dolencias que constituyen un problema de salud pública creciente en todo el mundo. Estas enfermedades se desarrollan como consecuencia de la ingestión de alimentos contaminados por microorganismos o por sustancias químicas. Dicha contaminación puede producirse en cualquier fase del proceso de producción del alimento. Se estima que cada año sufren ETAs unos 600 millones de personas y 420.000 mueren por estas causas. Entre los alimentos causantes de ETAs se encuentran los de origen animal no cocinados, las frutas y hortalizas contaminadas con heces y mariscos crudos contaminados con biotoxinas marinas (OMS, 2019).

Muchas de las ETAs son originadas por infecciones causadas por bacterias, virus o parásitos de origen alimentario. De entre los patógenos más frecuentes a nivel mundial implicados en este tipo de enfermedades se encuentra *Salmonella*, *Campylobacter* y *Escherichia coli* enterohemorrágica (Hartman, 2012; Bhaskar, 2017), aunque también se pueden producir por *Clostridium perfringens*, *Bacillus anthracis* y toxinas estafilocócicas, entre otros (Doyle & Beuchat, 2007; Bhaskar, 2017). Las manifestaciones clínicas más comunes implican la aparición de síntomas gastrointestinales como la diarrea, aunque también pueden desarrollarse afecciones más graves como insuficiencia renal y/o hepática, trastornos neurológicos, artritis reactiva o incluso cáncer (Doyle & Beuchat, 2007). Las principales ETAs, así como sus manifestaciones clínicas más comunes, y sus agentes causantes se recogen en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Principales enfermedades de transmisión alimentaria (FDA, 2019).

ORGANISMO	NOMBRE COMÚN DE LA ENFERMEDAD	TIEMPO DE APARICIÓN DESPUÉS DE LA INGESTA	SÍNTOMAS	DURACIÓN	ORIGEN ALIMENTICIO
<i>Bacillus cereus</i>	Envenenamiento por consumo de alimentos con <i>B. cereus</i> .	De 10 a 16 horas	Calambres abdominales, diarrea acuosa, náuseas.	De 24 a 48 horas	Carnes, guisos, jugo de carne, salsa de vainilla.
<i>Campylobacter jejuni</i>	Campilobacteriosis	De 2 a 5 días	Diarrea, calambres, fiebre y vómitos; puede tener diarrea con sangre.	De 2 a 10 días	Carne de aves cruda o poco cocida; leche sin pasteurizar, agua contaminada.
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismo	De 12 a 72 horas	Vómitos, diarrea, visión borrosa, visión doble, dificultad para tragar, debilidad muscular. Puede causar insuficiencia respiratoria y la muerte.	Variable	Alimentos mal enlatados, especialmente verduras enlatadas en el hogar; pescado fermentado, papas asadas en papel de aluminio, ajo envasado.
<i>Clostridium perfringens</i>	Intoxicación de alimentos por <i>Perfringens</i>	8 a 16 horas	Calambres abdominales intensos, diarrea acuosa	Habitualmente 24 horas	Carnes, aves, salsa de carne, alimentos precocidos o deshidratados, alimentos con mal uso de la temperatura o del tiempo de cocción.
<i>Cryptosporidium</i>	Criptosporidiasis intestinal	De 2 a 10 días	Diarrea (generalmente acuosa), calambres estomacales, malestar estomacal, fiebre leve.	Puede que se remita y hayan recaídas durante semanas o incluso meses	Alimentos crudos o contaminados por una persona enfermo que la manipuló luego de cocinarla; agua potable contaminada.
<i>Cyclospora cayatanensis</i>	Ciclosporiasis	De 1 a 14 días, generalmente al menos 1 semana	Diarrea (generalmente acuosa), pérdida del apetito, pérdida de peso significativa, calambres estomacales, náuseas, vómitos, fatiga.	Puede que se remita y hayan recaídas durante semanas o incluso meses	Varios tipos de frutas y verduras frescas (bayas, lechuga y albahaca importadas).
<i>E. coli (Escherichia coli) productor de toxina</i>	Infección por <i>E. coli</i> (causa común de la "diarrea del viajero")	De 1 a 3 días	Diarrea acuosa, calambres abdominales, algo de vómito.	De 3 a 7 o más días	Agua o alimentos contaminados con excrementos humanos.
<i>E. coli O157:H7</i>	Colitis hemorrágica o infección por <i>E. coli O157:H7</i>	De 1 a 8 días	Diarrea aguda (a menudo con sangre), dolores abdominales y vómitos. Por lo general, no se tiene fiebre o se tiene muy poca. Es más común en niños de 4 años o menos. Puede causar insuficiencia renal.	De 5 a 10 días	Carne de res poco cocida (especialmente hamburguesas); leche y jugo sin pasteurizar; frutas y verduras crudas (ej. brotes); y agua contaminada.
<i>Hepatitis A</i>	Hepatitis	28 días en promedio (De 15 a 50 días)	Diarrea, orina oscura, ictericia y síntomas similares a los de la gripe, por ejemplo, fiebre, dolor de cabeza, náuseas y dolores abdominales.	Variable, de 2 semanas a 3 meses	Frutas y verduras crudas, agua potable contaminada, alimentos sin cocer o alimentos cocidos que no son recalentados luego de haber estado en contacto con una persona infectada que los manipuló.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriosis	De 9 a 48 horas para síntomas gastrointestinales, de 2 a 6 semanas para enfermedades invasivas	Fiebre, dolores musculares y náuseas o diarrea. Las mujeres embarazadas pueden tener síntomas leves similares a los de la gripe, y la infección podría ocasionar un parto prematuro o de un bebé muerto. Los ancianos o pacientes con deficiencias inmunitarias podrían contraer bacteremia o meningitis.	Variable	Leche sin pasteurizar, quesos blandos hechos con leche sin pasteurizar, carnes preparadas listas para comer.
<i>Norovirus</i>	Se le llama de distintas maneras: gastroenteritis viral, diarrea invernal, gastroenteritis aguda no bacteriana, envenenamiento por consumo de alimentos e infección por consumo de alimentos	De 12 a 48 horas	Náuseas, vómitos, calambres abdominales, diarrea, fiebre, dolor de cabeza. La diarrea es más frecuente en los adultos y los vómitos en los niños.	De 12 a 60 horas	Frutas y verduras crudas, agua potable contaminada, alimentos sin cocer o alimentos cocidos que no son recalentados luego de haber estado en contacto con una persona infectada que los manipuló; mariscos de aguas contaminadas.
<i>Salmonella</i>	Salmonelosis	De 6 a 48 horas	Diarrea, fiebre, calambres abdominales, vómitos	De 4 a 7 días	Huevos, aves, carne de res; no pasteurizados leche o jugos; quesos, frutas y verduras crudas contaminadas.
<i>Shigella</i>	Shigelosis o disenteria bacilar	De 4 a 7 días	Calambres abdominales, fiebre y diarrea. La materia fecal puede contener sangre y mucosidad.	De 24 a 48 horas	Frutas y verduras crudas, agua potable contaminada, alimentos sin cocer o alimentos cocidos que no son recalentados luego de haber estado en contacto con una persona infectada que los manipuló.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Envenenamiento por consumo de alimentos con estafilococos	De 1 a 6 horas	Inicio repentino de náuseas y vómitos severos. Calambres abdominales. Pueden presentarse diarrea y fiebre.	De 24 a 48 horas	Carnes de res, ensaladas de papa y huevo, y pasteles con crema no refrigerados o refrigerados incorrectamente.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Infección por <i>V. parahaemolyticus</i>	De 4 a 96 horas	Diarrea acuosa (ocasionalmente con sangre), calambres abdominales, náuseas, vómitos, fiebre.	De 2 a 5 días	Mariscos poco cocidos, tales como los moluscos.
<i>Vibrio vulnificus</i>	Infección por <i>V. vulnificus</i>	De 1 a 7 días	Vómitos, diarrea, dolores abdominales, infección transmitida por la sangre. Fiebre, sangrado bajo la piel, úlceras que deben extirparse quirúrgicamente. Puede ser fatal en el caso de personas con enfermedades hepáticas o sistemas inmunitarios débiles.	De 2 a 8 días	Mariscos poco cocidos, tales como los moluscos.

En base a lo anteriormente comentado, resulta fundamental asegurar la inocuidad de los alimentos para prevenir la aparición de las ETAs. En este sentido, la OMS ayuda a los Estados Miembros por medio de la Red Internacional de Autoridades en Materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN) a capacitarse para prevenir, detectar y gestionar los riesgos de origen alimentario. Además, la OMS, consciente de la necesidad de concienciar a los manipuladores de alimentos sobre sus responsabilidades en cuanto a inocuidad alimentaria, a principios de los noventa formuló las diez reglas de oro para la preparación de alimentos inocuos. Sin embargo, a efectos prácticos se hizo necesario elaborar unas normas más simples y de aplicación más general. Por lo que la OMS presentó en 2001 el manual con las cinco claves para lograr la inocuidad de los alimentos. Estas cinco claves son: mantener la limpieza, separar alimentos crudos y cocinados, cocinar completamente, mantener los alimentos a temperaturas seguras y usar agua y materias primas seguras (OMS, 2007).

2.2. El huevo

El huevo de gallina es un ingrediente popular en la producción de alimentos debido a sus numerosas propiedades funcionales, especialmente su habilidad natural para incorporarse en los alimentos mediante la formación de geles (Zhang *et al.* 2019). Además, los huevos son una fuente económica de proteínas de alta calidad que se comercializan tanto en forma de huevos con cáscara, así como en productos líquidos, congelados y deshidratados (Sánchez *et al.* 2019).

2.2.1. Estructura y composición del huevo

El huevo de gallina está compuesto fundamentalmente en un 60% (p/p) por la clara, un 30% (p/p) por la yema y un 10% (p/p) por la cáscara y membranas (IEH, 2019). En un corte transversal se pueden diferenciar sus partes más detalladamente (ver **Figura 1**), las cuales se comentarán a continuación.

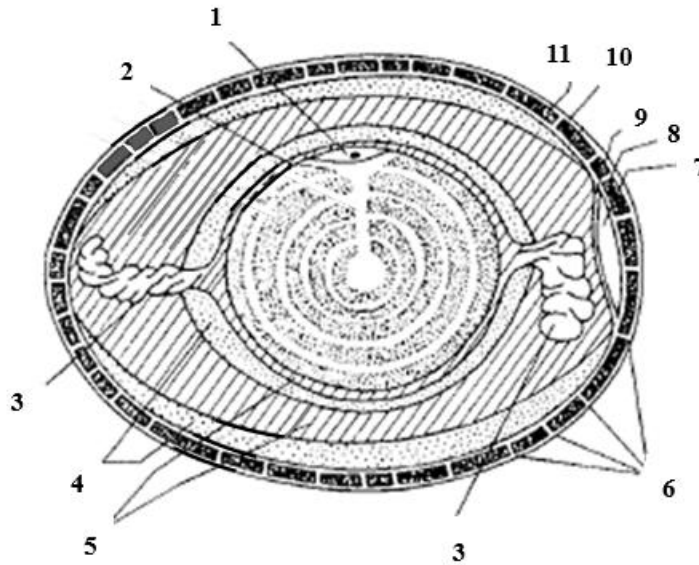


Figura 1. Esquema de un corte transversal de un huevo de gallina. 1: Disco germinal. 2: Membrana vitelina. 3: Chalaza, 4: Clara o albúmen denso, 5: Albúmen fluido. 6: Poros, 7: Cámara de aire. 8: Membrana testácea interna, 9: Membrana testácea externa, 10: Cutícula, 11: capa calcárea de la cáscara. Modificado de Belitz *et al.* (2008).

- Cáscara

Constituye la cubierta exterior del huevo, mantiene su integridad física y actúa como barrera bacteriológica. Esta estructura se encuentra constituida fundamentalmente por una matriz cálcica, aunque, en menor concentración, se encuentran minerales como sodio, magnesio, manganeso, cinc, hierro, cobre, aluminio y boro. Además, la cáscara está atravesada por numerosos poros (entre 7000 y 15000) que permiten el intercambio gaseoso con el exterior. Recubriendo la superficie de la cáscara, así como los poros, se encuentra una cutícula formada principalmente por proteínas (hasta un 90%) y, en menor cantidad, por lípidos y carbohidratos. Por la cara interna de la cáscara, y rodeando a la clara o albúmen, se encuentran dos membranas: membrana testácea interna y externa. Ambas membranas se encuentran fuertemente unidas entre sí en todo el huevo salvo en una zona, denominada cámara de aire (IEH, 2019).

- Clara o albúmen

En la clara se distinguen dos partes según su densidad: el albúmen denso y el fluido. El primero rodea fundamentalmente a la yema y es la principal fuente de riboflavina y proteína en el huevo, mientras que el segundo se encuentra más próximo a la cáscara. La composición de la clara es fundamentalmente agua (88%) y proteínas (12%), donde la

proteína más importante es la ovoalbúmina (54% del total proteico), seguida de la ovotransferrina (12%) y el ovomucoide (11%) (IEH, 2009; Zhang *et al.* 2019). Aunque también se encuentran presentes otras proteínas como la lisozima, la avidina, el ovinhibidor, la ovomucina (contribuye a la viscosidad de la clara) y la flavoproteína (se une a la riboflavina facilitando su entrada desde la sangre de la gallina al huevo en formación). Las tres primeras tienen función antibacteriana, protegiendo a la yema de posibles contaminaciones externas. Otros constituyentes no proteicos de la clara, que se encuentran en muy baja concentración, son los lípidos, carbohidratos (como glucosa, galactosa, etc.), minerales (como sodio, potasio, calcio, etc.) y vitaminas (Belitz *et al.* 2008). Además, el albumen forma unos filamentos enrollados de naturaleza proteica, denominados chalazas, que van desde la yema hasta los polos opuestos del huevo y mantienen a la yema centrada (IEH, 2019).

- **Yema o vitelo**

La yema, que es la parte central del huevo, se encuentra rodeada por la membrana vitelina, la cual le da forma y la separa de la clara. La yema se distribuye uniformemente debajo de dicha membrana salvo en un punto con forma de disco, denominado disco germinal, en donde se comenzaría a desarrollar el embrión en caso de fecundación (IEH, 2019). La yema de huevo, que se encuentra constituida fundamentalmente por una compleja asociación de lípidos y proteínas en agua, puede separarse por centrifugación en dos fracciones, los gránulos y de plasma. Los gránulos (que constituyen un 22% de la materia seca del huevo) son agregados proteicos formados por un 70% de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y un 16% de fosvitina (con función quelante del hierro). El plasma (que constituye un 78% de la materia seca del huevo) está compuesta por un 85% de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y un 15% de livetinas (procedentes del suero sanguíneo de la gallina) (Belitz *et al.*, 2008; Aguilar *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2019).

2.2.2. Huevo y ETAs

La producción mundial de huevo y su consumo se ha ido incrementando en los últimos veinte años, por lo que establecer una correcta seguridad alimentaria en la producción y manufactura de huevos es un tema de interés principal. De hecho, en los últimos años, aproximadamente el 40% de los brotes notificados están relacionados con el consumo de huevos y productos derivados (Sánchez *et al.* 2019).

La calidad microbiológica y la seguridad del huevo y ovoproductos depende en gran medida de un cocinado, manejo, enfriamiento y almacenamiento adecuados (Sanchez *et al.*, 2019; IEH, 2019). En la producción de huevos, las medidas de prevención de contaminación microbiológica se basan en el control de las aves. De forma concreta, en España, las gallinas deben ser vacunadas obligatoriamente contra *Salmonella*, llevarse a cabo buenas prácticas de higiene en el manejo de la explotación, así como realizar controles periódicos para asegurar que las medidas de prevención funcionan adecuadamente. Sin embargo, también deben llevarse a cabo unas correctas prácticas de manejo tras el proceso de producción. Esto es así porque una vez se rompe la cáscara del huevo las principales defensas contra la colonización microbiana presentes en este disminuyen drásticamente (IEH, 2019).

Estudios epidemiológicos muestran que los huevos son fuentes importantes exposición de microorganismos patógenos a los consumidores. El principal riesgo alimentario que se relaciona con el consumo de huevos o sus derivados es la toxiinfección por *Salmonella*, ya que, aunque esta bacteria no es demasiado resistente a condiciones ambientales desfavorables, puede encontrarse en el medio ambiente y transmitirse a través de alimentos de origen animal (IEH, 2019). En concreto, *Salmonella* y *Campylobacter* han recibido especial atención en cuanto a su presencia en huevos y productos derivados de estos, siendo foco de numerosos estudios (Sánchez *et al.*, 2019). También han sido desarrollados otros trabajos con el objetivo de analizar el comportamiento de bacterias como *Bacillus*, *Serratia*, *Staphylococcus* o *Pseudomonas* en ovoproductos. El género *Staphylococcus* en particular produce enterotoxinas estafilocócicas que están relacionadas con ETAs como la intoxicación alimentaria o el síndrome de shock tóxico. Estas toxinas son producidas principalmente por *Staphylococcus aureus*, aunque se ha encontrado otras especies pertenecientes a este género, como *S. epidermis*, *S. haemolyticus* y *S. warneri*, con capacidad para producir este tipo de toxinas. Por lo tanto, la prevención de la proliferación de *Staphylococcus* en alimentos es un tema de gran interés. Sin embargo, en la bibliografía publicada hasta la fecha se ha prestado muy poca atención a la relación entre este género bacteriano con el huevo y los ovoproductos (Yang *et al.*, 2001; Sanchez *et al.*, 2019).

2.3. El carragenato como texturizante alimentario

Los polisacáridos son macromoléculas comúnmente usadas como ingredientes texturizantes con el fin de que contribuyan a la estructura, textura y estabilidad de los sistemas alimentarios a través de sus propiedades gelificantes y/o espesantes (Saha & Bhattacharya, 2010; Aguilar *et al.* 2017). Entre los polímeros utilizados en la industria alimentaria se encuentran, entre otros, los alginatos, la goma de xantana, goma arábiga, las pectinas y el carragenato (Mancini *et al.* 2002; Zhou *et al.*, 2016; Aguilar *et al.* 2017).

El carragenato es un polisacárido aniónico, extraído de varios tipos de algas rojas (como los géneros *Cottoni*, *Spinosum* y *Chondrus*), formado por unidades repetidas de D-galactosa y 3,6-anhidro-D-galactosa unidas por enlaces glicosídicos α (1 \rightarrow 3) y β (1 \rightarrow 4). Es un polímero de alto peso molecular (superior a 100 kDa) con un contenido variable en su estructura de grupos éster sulfato (CPKelco, 2001).

En cuanto a sus propiedades, el carragenato es un polisacárido soluble en agua e insoluble en muchos solventes orgánicos. Esta solubilidad se encuentra influenciada por el tipo de carragenato, los iones presentes, otros solutos, la temperatura y el pH. Aunque el carragenato es un polisacárido hidrosoluble, en agua fría (por debajo de 30°C) habitualmente forma aglomerados entre las moléculas del polímero que dificultan su dispersión. Esto se debe a que las moléculas del polímero se agregan entre si formándose una capa acuosa alrededor del aglomerado resultando difícil para las moléculas de agua entrar y romper dichos grumos. Sin embargo, en agua caliente (aproximadamente a 50°C y temperaturas superiores) dichos aglomerados se rompen y el polisacárido se encuentra ya en disolución. En cuanto al pH, el carragenato es estable a pH neutro y alcalino, mientras que a pH ácido comienza a hidrolizarse (CPKelco, 2001).

Dentro del carragenato se encuentran varios tipos, lambda, kappa, iota, épsilon y mu, los cuales contienen entre un 22 - 35% de grupos sulfato. Esta cantidad de grupos sulfato determina la mayor o menor hidrosolubilidad de cada tipo de carragenato. La estructura de los tres tipos principales (lambda, kappa e iota), usados en la industria alimentaria, se muestran en la **Figura 2**. En general, las propiedades de cada tipo de carragenato se ven influenciadas por la cantidad y la posición de los grupos de éster sulfato en la 3,6-anhidro-D-galactosa (Manuhara *et al.* 2016). Así, en el kappa carragenato (κ -carragenato) algunas de las D-galactosas pueden contener grupos éster 4-

sulfato y algunas de las 3,6-anidro-D-galactosa contienen grupos éster 2-sulfato. El iota carragenato se caracteriza por tener grupos éster 4-sulfato en todos los residuos de D-galactosa y grupos éster 2-sulfato en todos los residuos de la 3,6-anidro-D-galactosa. El lambda carragenato se diferencia del kappa e iota en tener un grupo bisulfatado en la β (1 \rightarrow 4)-D-galactosa y cantidades variables de grupos éster 2-sulfato en la α (1 \rightarrow 3)-D-galactosa, a diferencia de kappa e iota que tienen un grupo éster 4-sulfato (ver **Figura 2**). Por lo tanto, dado que el κ -carragenato presenta menor número de grupos sulfato que el resto, es menos soluble e hidrofílico que el iota y lambda carragenato (CPKelco, 2001).

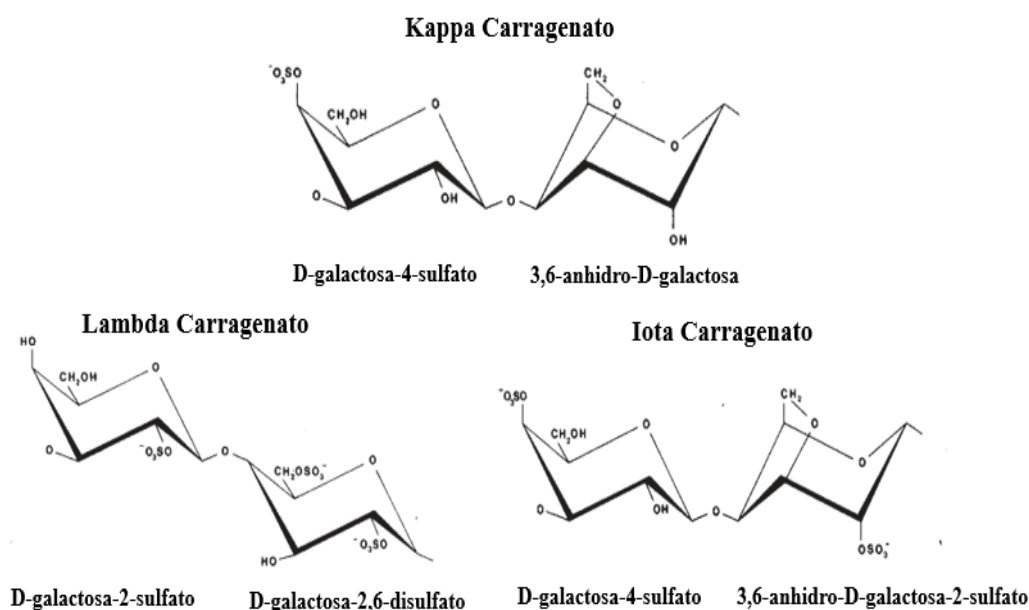


Figura 2. Principales tipos de carragenato usados en la industria alimentaria. Modificado de CPKelco (2001).

El mecanismo de gelificación del carragenato no se comprende completamente. Sin embargo, se sabe que el κ -carragenato forma geles termorreversibles en soluciones acuosas y en presencia de cationes como el Ca^{2+} , Na^+ y el K^+ , formándose geles más fuertes si la solución tiene K^+ (Núñez-Santiago & Tecante 2007; Aguilar *et al.* 2017). Cuando el polímero se encuentra de disolución, las unidades que conforman el κ -carragenato se encuentran distribuidas aleatoriamente y a medida que la temperatura disminuye se induce el giro de las secuencias de 3,6-anhidro-D-galactosa en dobles hélices. Estas se unen en cadenas formando una red tridimensional, el gel (CPKelco, 2001; Núñez-Santiago & Tecante, 2007; Agoda-Tandjawa *et al.* 2017). El mecanismo de formación de gel se muestra esquematizado en la **Figura 3**.

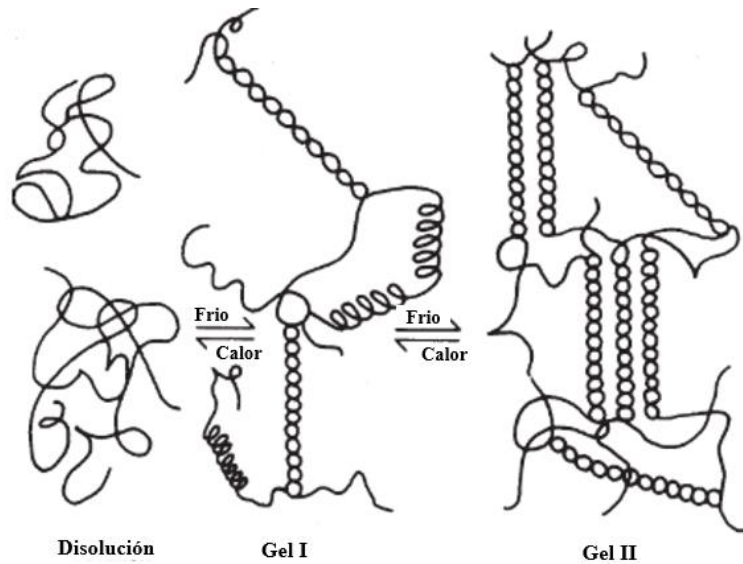


Figura 3. Mecanismo de formación de gel de κ -carragenato. Modificado de CPKelco (2001).

El κ -carragenato, que forma geles fuertes y quebradizos (CPKelco, 2001), se emplea ampliamente como agente espesante y gelificante en la industria alimentaria. Por ejemplo, es utilizado en fabricación de tartas, flanes, pudines, carnes, salchichas, etc. (Manuhara *et al.* 2016).

2.4. Alimentos modelo

Los alimentos se pueden considerar como un ecosistema, que varía en función del tipo de entorno que constituyen y de los microorganismos que albergan. Dicho entorno se compone de una matriz compuesta de múltiples constituyentes y fases que le confiere una gran complejidad estructural. Asimismo, en base a esta estructura los microorganismos se comportarán de manera distinta (Aspridou *et al* 2014).

Los alimentos modelo se pueden definir como sistemas alimentarios cuya composición, complejidad y propiedades reológicas son controladas con el objetivo de poder realizar ensayos en el laboratorio (Costello *et al* 2018; Verheyen *et al.* 2018). El trabajo con estos sistemas permite obtener información tan importante como la influencia de la estructura del sistema en relación con el desarrollo de microorganismos. Los sistemas alimentarios más utilizados están compuestos por la adición de un agente gelificante (como la gelatina, agar, goma de xantana o carragenato) en un medio nutritivo (Costello *et al.* 2018). Un ejemplo de esto lo constituye la evaluación del efecto de

diferentes estructuras alimentarias en la cinética microbiana de *Listeria monocytogenes* (Noriega *et al.* 2008; Verheyen *et al.* 2018).

Hay gran variedad de publicaciones que estudian el desarrollo de microorganismos patógenos en diversos alimentos. Entre ellos se encuentra el estudio del desarrollo de *Bacillus cereus* en arroz (Hariram *et al.* 2016; Juneja *et al.* 2019), el efecto de la temperatura en el desarrollo de *E. coli* en carne (Redemann, *et al.* 2018) o el crecimiento de *Listeria* en quesos (Callon *et al.* 2014). Respecto al desarrollo de ETAs en ovoproductos, la mayoría de los estudios se centran en el desarrollo de patógenos como *Salmonella*, aunque también sobre *Listeria* o *Escherichia coli* en huevo u ovoproductos. En cuanto a *Salmonella*, se encuentran numerosos ejemplos de publicaciones que se enfocan en como coloniza esta bacteria el interior del huevo a través de la cáscara y qué condiciones (como la temperatura, humedad o tiempo de almacenamiento) favorecen dicha colonización (Chemaly & Salvat, 2011; Raspoet *et al.* 2011; Samiullah *et al.* 2013; Gross *et al.* 2015; Liu *et al.* 2016). También hay estudios que evalúan el crecimiento de *Listeria* en huevos cocidos (Fang & Huang, 2014) o en otros ovoproductos (Rivoal *et al.* 2013; Hwang *et al.* 2019). Sin embargo, hay pocos estudios que evalúen el desarrollo de patógenos pertenecientes al género *Staphylococcus* en huevo u ovoproductos (Yang *et al.* 2001; Sanchez *et al.* 2019).

2.5. Microorganismos modelo, cinética microbiana y microbiología predictiva

2.3.1. Microorganismos modelo

En el laboratorio en vez de trabajar con microorganismos patógenos, resulta muy frecuente el empleo de especies menos peligrosas que se comportan de manera similar al patógeno, consiguiéndose así reducir los riesgos derivados del manejo de especies patógenas (Sinclair *et al.* 2012). Por ejemplo, hay numerosos estudios en la bibliografía que emplean *Listeria innocua* en lugar del patógeno en alimentos *Listeria monocytogenes* (Noriega *et al.* 2008; Noriega *et al.* 2010). También hay investigaciones que emplean cepas de *E. coli* no patógenas como microorganismo modelo de *Salmonella* en carnes (Redemann *et al.* 2018) y en frutas (Danyluk *et al.* 2019) o el empleo de *Clostridium sporogenes* como microorganismo modelo de *Clostridium botulinum* en mantequilla (Taylor *et al.*, 2013).

El género *Staphylococcus* comprende a microorganismos anaerobios facultativos, es decir, que pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Son gram positivos, comensales comunes y patógenos oportunistas de humanos y animales y ocasionalmente causan infecciones graves. En humanos se encuentran dos especies principales: *Staphylococcus epidermidis* (microorganismo comensal en la piel y membranas mucosas) y *Staphylococcus aureus*. (Mandigan *et al.*, 2015). De forma concreta, *S. aureus* puede causar un gran abanico de infecciones, desde afecciones superficiales en la piel hasta enfermedades invasivas y potencialmente mortales. Su patogenicidad viene dada por su capacidad para producir toxinas, por su invasividad y su resistencia a antibióticos. Esta bacteria puede contaminar los alimentos durante la preparación y el procesado de estos. Además, es capaz de crecer en condiciones extremas (temperatura hasta 48 °C; pH 4,2 a 9,3; NaCl hasta 15%), lo cual facilita que pueda estar presente en numerosos productos alimentarios, como en carnes, ovoproductos, así como en otros alimentos de consumo diario (Hennekinne *et al.* 2012; Kadariya *et al.* 2014). De la misma forma que se emplea *L. innocua* como organismo modelo de *L. monocytogenes*, se puede estudiar el comportamiento de *S. warneri* en productos alimentarios en vez utilizar *S. aureus*. *S. warneri* es un patógeno oportunista que ha sido aislado de huevos y que tiene menor capacidad para causar enfermedad que *S. aureus*, y presenta además un comportamiento similar. De hecho, recientemente se ha empleado *S. warneri* como microorganismo modelo para estudiar el comportamiento de *S. aureus* en ovoproductos (Sanchez *et al.* 2019).

2.3.2. Cinética microbiana

La cinética microbiana comprende cuatro fases de crecimiento: lag o latencia, exponencial o logarítmica, estacionaria y muerte. El número de microorganismos se cuantifica como el número de unidades formadoras de colonias por mililitro o gramo (UFC/ml o UFC/g) y estas se representan en escala logarítmica frente al tiempo (Doyle & Beuchat 2007; Mandigan *et al.*, 2015). Estas cuatro fases, que se detallaran a continuación, se representan en la **Figura 4**.

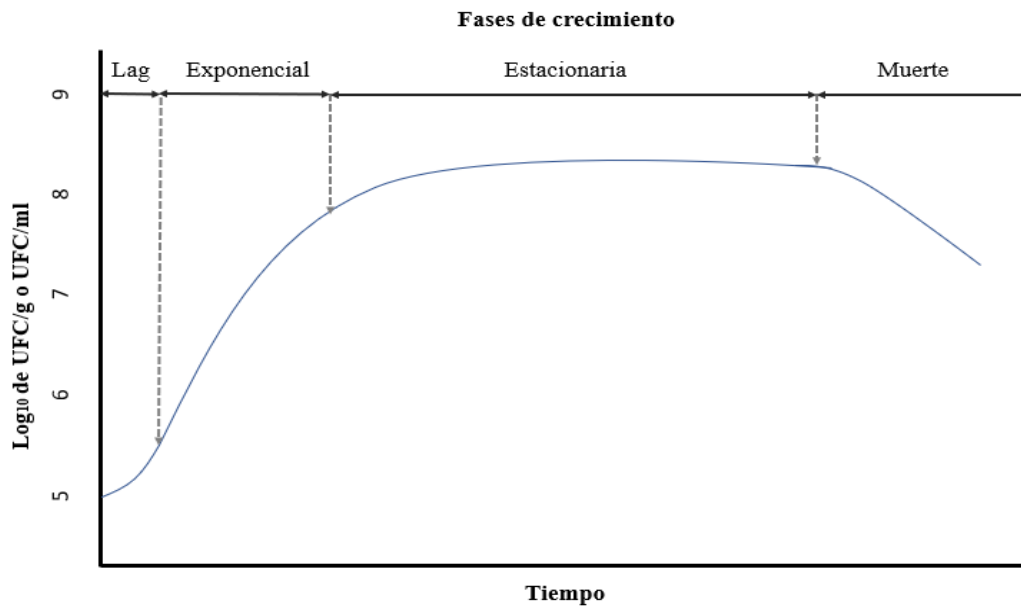


Figura 4. Cinética microbiana donde se representan las UFC/g o UFC/ml en escala logarítmica frente al tiempo. Se representan la fase lag, exponencial, estacionaria y de muerte. Modificado de Mandigan *et al.* (2015).

- **Fase lag**

Cuando un microorganismo se inocula en medio fresco, el crecimiento comienza tras un periodo de tiempo, más o menos extenso, denominado fase lag o de latencia. La duración de esta fase depende del tipo de inóculo, del medio al que se transfiere y del tipo de microorganismo (Mandigan *et al.*, 2015).

- **Fase exponencial**

Durante la fase exponencial, la población de células se duplica en intervalos de tiempo regulares por un corto o largo periodo de tiempo, ya que depende, entre otros factores, de la disponibilidad de recursos en el medio. Es en esta fase, sobre la que se basan estudios sobre microbiología alimentaria, permite el uso de ecuaciones cinéticas de primer orden para describir las características de este crecimiento exponencial. La tasa de crecimiento es muy variable en función de las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio, etc.), así como de las características propias del microorganismo (Thompson *et al.* 2013; Mandigan *et al.*, 2015).

- Fase estacionaria y de muerte

En la fase estacionaria no hay un incremento o descenso neto en el número de células y, por lo tanto, la tasa de crecimiento de la población es cero. Sin embargo, el metabolismo energético y los procesos de biosíntesis en esta fase continúan, pero a una tasa mucho más baja que en la fase exponencial. Según avance el tiempo la población microbiana entrará en fase de muerte, con una tasa de muerte que ocurrirá de forma exponencial. Sin embargo, la tasa de muerte de las células es mucho más lenta que el crecimiento observado en la fase exponencial (Mandigan *et al.*, 2015).

2.3.3. Microbiología predictiva

La microbiología predictiva es una herramienta que permite evaluar a potenciales microorganismos patógenos en un determinado medio, así como los factores que regulan el crecimiento microbiano. Esto es útil para controlar la posible aparición de eventos indeseables de contaminación microbiana en los alimentos (Noriega *et al.* 2008).

La mayoría de los modelos predictivos disponibles para el crecimiento microbiano están basados en datos experimentales sobre medio líquido en el laboratorio (Dos Santos, 2007; Theys *et al.* 2008; Aspridou *et al.* 2014). Por lo tanto, no consideran el efecto que tendría la difusión de nutrientes, de oxígeno y productos metabólicos, así como las restricciones mecánicas que los microorganismos podrían experimentar debido a la microestructura de un sustrato. Esto limita la habilidad de cualquier modelo predictivo de crecimiento microbiano para predecir adecuadamente la seguridad y calidad de alimentos sólidos. Un fallo en los modelos predictivos podría conducir a perjuicios tanto en salud y seguridad como económicos (Theys *et al.* 2008; Noriega *et al.* 2008; Aspridou *et al.* 2014).

Los modelos predictivos microbiológicos pueden dividirse en modelos cinéticos y modelos de probabilidad. Los primeros calculan la vida microbiológica de los alimentos, es decir, el periodo de tiempo durante el cual el número de microorganismos en el alimento se encuentra por debajo de un determinado valor. Los modelos de probabilidad determinan si el microorganismo puede crecer e identifica que condiciones de almacenamiento del alimento conllevan a una baja o nula probabilidad de crecimiento. Ambos modelos suelen estar estrechamente relacionados porque la probabilidad de

detectar el crecimiento de un microorganismo en un determinado periodo de tiempo depende de su cinética microbiana (Dos Santos, 2007).

2.4. Reología y textura de los alimentos

Los estudios reológicos de los alimentos tienen un papel importante no solo en el control de la calidad, sino en determinar en muchos casos la aceptación de estos por parte del consumidor. Además, permiten predecir los a menudo complejos cambios que puede sufrir la estructura de un alimento durante los procesos de acondicionamiento y elaboración de un determinado producto (Gallegos & Franco, 1999; Day & Golding, 2016; Joyner, 2018).

2.4.1. Reología de los alimentos

La reología es una rama de la física que estudia la ciencia de la deformación y flujo de la materia. Es, por tanto, el estudio de la manera en la cual los materiales (fluido, sólido o gas) responden a un estrés o esfuerzo aplicado (Steffee 1996; Schramm 2004). Existen numerosas áreas donde se aplican análisis reológicos a la industria alimentaria, como es la determinación de la funcionalidad de un ingrediente en el desarrollo de un producto o en la evaluación de su calidad, entre otros (Steffee 1996).

Los sólidos ideales se deforman elásticamente, esto es que la energía requerida para la deformación se recupera cuando el estrés es eliminado. Los fluidos ideales deforman irreversiblemente, es decir, fluyen y la energía requerida para la deformación se disipa en el fluido en forma de calor sin recuperarse tras eliminar el estrés aplicado. Los sólidos y los fluidos reales no presentan estas características ideales, sino que tienen propiedades intermedias (Steffee 1996; Schramm 2004).

La viscosidad es una propiedad importante de los fluidos alimentarios, ya que tiene numerosas implicaciones en la tecnología alimentaria, como es el desarrollo de procesos alimentarios, el control de productos y la evaluación de la calidad de estos, así como para entender la estructura de un alimento (Arana 2012). La viscosidad se define como la resistencia interna de un fluido cuando se le aplica un esfuerzo. En función del modo de fluir, los fluidos se clasifican en dos grupos principales: newtonianos y no newtonianos. En los primeros la viscosidad es constante, independiente del esfuerzo aplicado y la

relación entre la velocidad de deformación y el esfuerzo es lineal. En los fluidos no newtonianos la viscosidad varía en función del esfuerzo, el tiempo y la relación entre el esfuerzo y la velocidad de deformación no es constante (Steffee 1996). Los fluidos no newtonianos se pueden clasificar según la **Figura 5**.

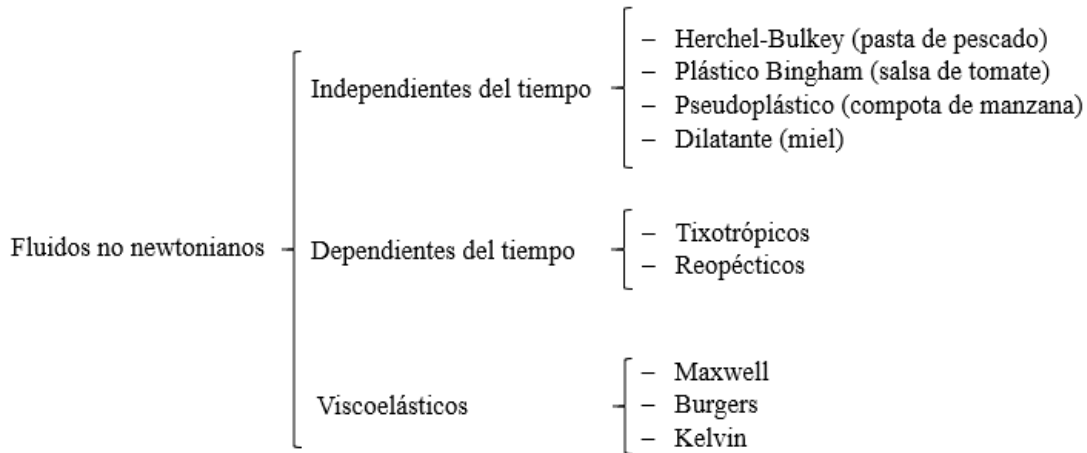


Figura 5. Clasificación de los fluidos no newtonianos. Modificado de Steffee (1996).

De forma general para describir el comportamiento de los fluidos no newtonianos, se utiliza el modelo de Herchel-Bulkley, que es apropiado para muchos fluidos alimentarios:

$$\sigma = K(\dot{\gamma})^n + \sigma_0$$

Donde σ es el esfuerzo cortante aplicado, K es el coeficiente de consistencia, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación, n es el índice de comportamiento del fluido y σ_0 es el mínimo esfuerzo necesario para iniciar el movimiento del fluido (límite de fluencia o esfuerzo umbral). Por lo tanto, obteniendo a partir de datos experimentales el valor de dichas variables se puede determinar el tipo de fluido del que se trata (Steffee 1996).

Los ensayos para estudiar el comportamiento de una muestra desde un punto de vista reológico pueden ser de dos tipos: estacionarios y oscilatorios. En los ensayos estacionarios el esfuerzo o la velocidad de deformación se aplica de manera constante. Sin embargo, en los dinámicos u oscilatorios se caracterizan porque el esfuerzo o la velocidad de deformación se aplican de manera oscilatoria a una determinada frecuencia (Steffee 1996).

Los ensayos dinámicos se utilizan para caracterizar sustancias viscoelásticas. De forma concreta, los fluidos viscoelásticos son sustancias que tiene comportamiento tanto elástico como viscoso. Este tipo de fluidos se pueden caracterizar determinando el módulo complejo (G^*), el elástico (G') y el viscoso (G''). El módulo G^* representa la resistencia de una sustancia a una deformación aplicada; el módulo G' representa la parte del esfuerzo de deformación aplicado que se almacena temporalmente y luego se recupera; el módulo G'' representa el esfuerzo de deformación aplicado que no se recupera, perdiéndose en forma de calor. Para determinar estos tres parámetros se pueden hacer ensayos de viscoelasticidad, donde se debe trabajar en la zona lineal viscoelástica, que es aquella región en que el módulo G^* es constante (Steffee 1996).

Uno de los ensayos estacionarios más comunes es la curva de flujo dónde la correlación entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación definen el tipo de flujo de un líquido, representándose el esfuerzo cortante en el eje de las ordenadas y la velocidad de deformación en el de abscisas. Por otra parte, dentro de los ensayos oscilatorios, los barridos de frecuencia y de temperatura se emplean habitualmente para caracterizar muestras viscoelásticas. El barrido de temperatura se lleva a cabo incrementando o reduciendo la temperatura a una determinada velocidad, siendo la frecuencia y el esfuerzo aplicado constantes. Este ensayo es de gran importancia en el estudio del proceso de gelificación de diferentes productos, ya que permite determinar el punto de coagulación en función de la evolución de los módulos G' y G'' . El barrido de frecuencia aporta información relacionada con las características estructurales de la sustancia analizada. Este ensayo se realiza aplicando un esfuerzo cortante constante a temperatura también constante, partiendo de una frecuencia inicial que se va incrementando progresivamente hasta alcanzar una frecuencia final (Steffee 1996).

Los reómetros son los instrumentos usados para el análisis de las propiedades de los alimentos, como aquellas implicadas en la calidad. Aunque hay distintos tipos (reómetros oscilatorios, rotacionales, elongacionales, capilares y reoscópicos), los reómetros rotacionales se usan con diferentes instrumentos (como, por ejemplo, platos paralelos o cilindros concéntricos) que permiten adecuarse a las heterogéneas condiciones que pueden presentar los alimentos (Steffee 1996).

2.4.2. Textura de los alimentos

La textura de los alimentos se puede definir como la sensación derivada del comportamiento reológico de un alimento durante la masticación y la deglución (Steffee 1996). Es un atributo muy importante para la aceptación de un producto por el consumidor, así como para evaluar la calidad de un alimento (Tunick 2011; Day & Golding, 2016).

Los parámetros que definen la textura son difíciles de determinar debido a su carácter frecuentemente subjetivo, ya que es función de la percepción por los sentidos. Entre los principales parámetros que definen la textura se encuentran la dureza, cohesividad, viscosidad, elasticidad, adhesividad, fracturabilidad, masticabilidad y gomosidad (ver **Tabla 2**) (Steffee 1996; Szczesniak 2002; Tunick 2011).

Tabla 2. Propiedades primarias que definen la textura. Modificado de Szczesniak (2002).

Propiedad	Características físicas	Características sensoriales
Dureza	Fuerza que se necesita para alcanzar una deformación determinada.	Fuerza requerida para comprimir una sustancia entre los dientes o la lengua y el paladar.
Cohesividad	Alargamiento de un material que puede deformarse antes de romperse.	Grado en que una sustancia se comprime entre los dientes antes de romperse.
Viscosidad	Velocidad de flujo por unidad de fuerza.	Fuerza que se requiere para llevar un líquido de la cuchara a la lengua
Elasticidad	Velocidad con la que un material deformado retorna a su estado inicial tras eliminar la fuerza aplicada.	Grado en que un producto vuelve a su estado inicial tras ser comprimido con los dientes.
Adhesividad	Trabajo necesario para superar las fuerzas atractivas entre la superficie del alimento y la de otros materiales en contacto con este.	Fuerza que se requiere para eliminar el material que se adhiere a la boca.

Obtener información cuantitativa que describa la textura usando datos instrumentales es muy complicado debido a que ningún instrumento puede reproducir fielmente los sentidos humanos. Sin embargo, se combinan dos métodos para evaluar la textura en los alimentos: sensoriales e instrumentales. Los métodos sensoriales utilizan paneles de cata por expertos. Los métodos instrumentales, más baratos y rápidos, permiten correlacionar atributos sensoriales críticos de los alimentos para la aceptación por parte de los consumidores. Por lo tanto, en los ensayos de textura no se realizan con una única prueba, sino que suelen ser combinación de paneles de cata con ensayos instrumentales (Steffee 1996).

Los texturómetros son los instrumentos empleados en el análisis de la textura, cuya función es la de simular los sentidos humanos para proporcionar información objetiva sobre determinadas características sensoriales de un alimento. Durante el ensayo, el equipo somete a la muestra a un esfuerzo entre dos placas, donde una de ellas está fija, y mide el tiempo, la fuerza y la distancia. Esto permite obtener información sobre las propiedades texturales primarias y secundarias de un alimento (Joyner, 2018).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cepa bacteriana, condiciones de cultivo y toma de muestras

Todos los procedimientos que se describen a continuación se llevaron a cabo bajo condiciones de esterilidad, utilizando una cabina de flujo laminar (Telstar PV-100) y un autoclave modelo AES-75 (Raypa) para esterilizar el material.

3.1.1. Cepa bacteriana

Los ensayos fueron realizados con la cepa comercial de *Staphylococcus warneri* (CECT 236), suministrada por la Colección Española de Cultivo Tipo (CECT), empleado como microorganismo modelo de *S. aureus*.

3.1.2. Condiciones de cultivo

El microorganismo *S. warneri* fue primeramente cultivado en medio líquido como preinóculo durante un día, a 37°C y 250 rpm, para posteriormente inocularlo en geles de yema de huevo/ κ -carragenato. Además, para mantener el microorganismo activo se hicieron resiembras en placas de medio *Nutrient Broth* (NB) (Biokar) aproximadamente cada 15 días.

- Preparación del preinóculo

El medio líquido empleado en el preinóculo se elaboró diluyendo yema al 10% (v/v) en agua destilada al que se inoculó *S. warneri*. Para ello, se cogieron huevos frescos (categoría A, clase L y peso entre 60 y 73g) adquiridos en un comercio local y se les pasó etanol por la superficie para eliminar cualquier posible contaminación. Después, con un separador de yemas, se eliminó la clara y con unas pinzas se perforó la yema para verter su contenido en un vaso, eliminando cuidadosamente la membrana vitelina. A continuación, se echó con una probeta 10 mL de yema de huevo y 90 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 500 mL (ver **Figura 6**). Tras homogenizar la disolución manualmente, se inocularon dos colonias de *S. warneri* a partir de placas de medio NB con el asa de siembra previamente flameada en la llama. Tras la inoculación se llevaron los matraces a incubar a 37°C y 250 rpm durante un día.

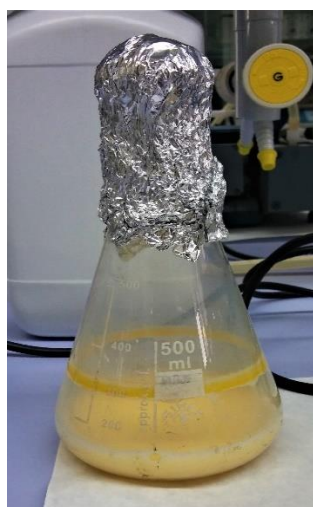


Figura 6. Preinóculo en matraz Erlenmeyer de 500mL con medio yema 10% (v/v) y *S. warneri* en una concentración de 10^7 UFC/ml tras ser incubado durante 1 día.

- Preparación geles yema de huevo/ κ -carragenato

En la industria alimentaria el carragenato se usa en concentraciones entre 0.005% y 3% en diferentes productos. En estas concentraciones, el carragenato estabiliza las suspensiones y emulsiones, generando además una textura agradable para el consumidor (CPKelco, 2001; Saha & Bhattacharya, 2010). Por otro lado, la yema de huevo es un ingrediente ampliamente usado en la industria alimentaria, debido fundamentalmente a sus características organolépticas y a su capacidad emulsificante, coagulante y gelificante (Aguilar *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2019). Por tanto, el alimento modelo ensayado se elaboró combinando yema de huevo y diferentes concentraciones de κ -carragenato (Sigma-Aldrich). Las concentraciones de empleadas se encontraron dentro del intervalo antes mencionado. Además, el κ -carragenato ofrece únicamente restricciones mecánicas al microorganismo, ya que *Staphylococcus* no tiene capacidad para degradarlo (Chauhan & Saxena, 2016).

Concretamente, se prepararon ocho geles de yema de huevo/ κ -carragenato manteniendo la concentración de yema de huevo al 10% (v/v) y variando la concentración de κ -carragenato, para alterar así la estructura de los geles sin modificar su composición nutritiva. Las concentraciones de κ -carragenato ensayadas fueron de 0%, 0.5%, 0.75%, 1%, 1.25%, 1.5%, 1.75% y 2% (p/v). Sin embargo, la concentración del 0.5% fue descartada debido a que la baja concentración del polímero no hizo posible que se formase

un gel, originando además una muestra heterogénea en la que se aprecian diferentes fases (ver **Figura 7**). El medio del 0% no forma un gel, pero se empleó como control para comparar el crecimiento del microorganismo en medio líquido respecto al sólido. El medio de yema se preparó de la misma forma a la descrita para el preinóculo.



Figura 7. Tubo Falcon con medio yema de huevo/ κ -carragenato al 0.5% (p/v)

El gel del 0% se preparó cogiendo un volumen de 400 mL de medio de yema al 10% (v/v) al que se le añadieron 40 mL de preinóculo. Desde 0.5% a 1.25% (p/v) se preparó un concentrado de κ -carragenato en 200 mL (calculando la concentración de κ -carragenato correspondiente para obtener una concentración final de 0.5%, 0.75%, 1% y 1.25% (p/v)) que se autoclavó y atemperó a unos 40°C, después se le añadieron 200 mL de yema al 10% (v/v) y 40 mL de preinóculo. A partir de 1.25% (p/v), debido a las altas concentraciones de κ -carragenato, para evitar su gelificación antes de mezclarlo con la yema, se preparó el concentrado sobre un volumen mayor, 360 mL, al que se le añadieron directamente los 40 mL de yema y 40 mL de inóculo. Aunque los procedimientos de preparación de los geles presentaron ligeras variaciones dependiendo de la concentración final de κ -carragenato, el volumen final ensayado siempre fue de 440 mL.

Tras añadir el inóculo y la yema a la disolución de κ -carragenato, se agitó vigorosamente a fin de homogenizar bien mezcla que se distribuyó en tubos Falcon estériles de 11.5 cm de longitud, 3.3 cm de diámetro y 50 mL de capacidad (30 mL en cada tubo) (ver **Figura 8**). Por último, se llevaron a incubar en condiciones estáticas a 25 °C con el objetivo de simular la temperatura ambiente.

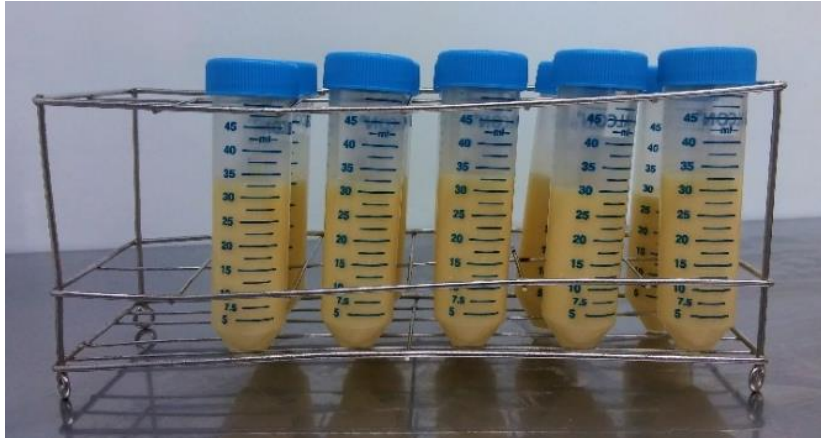


Figura 8. Tubos Falcon con medio yema de huevo/ κ -carragenato al 2% (p/v)

3.1.3. Toma de muestras

El recuento del microorganismo se realizó a los tiempos 0, 3, 7, 14, 20, 24, 48 y 72 horas. Para ello, se cogió con una cuchara estéril lo más exactamente posible un gramo de gel procedente de los tubos Falcon previamente preparados y se echó en una bolsa de Stomacher. Después se le echaron 9 mL de una solución de NaCl al 0.7% (p/v) y se homogenizó la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos. Se analizaron dos tubos Falcon a cada uno de los tiempos indicados y para cada uno de los tubos se realizaron diluciones seriadas en placa (NB), haciendo triplicados en aquella dilución óptima para hacer el recuento del microorganismo.

3.2. Reometría

Los ensayos de reometría que se describen a continuación fueron realizados en el reómetro rotacional HAAKE MARS II (ThermoFisher Scientific) (ver **Figura 9**), empleando platos serrados PP35 con 1 mm de espacio entre ambos. Además, los análisis fueron realizados a cada muestra en el orden que se describe a continuación: curva de flujo, ensayo de coagulación y barrido de frecuencia. Entre cada uno de los ensayos, así como tras colocar la muestra en el equipo, transcurrieron al menos 20 min de espera para que la muestra se recuperase de las tensiones sufridas. Todos los análisis fueron realizados al menos por duplicado.

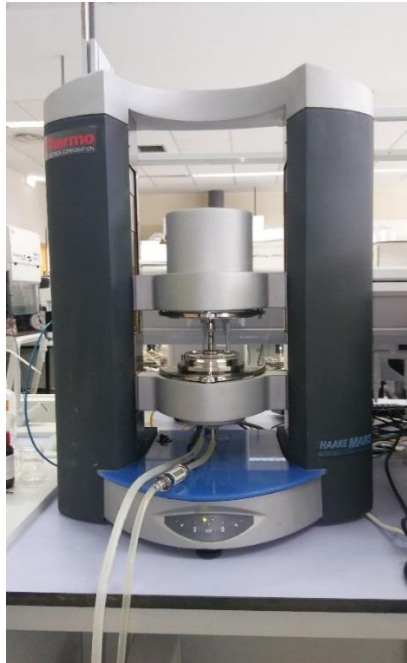


Figura 9. Reómetro HAAKE MARSS II (ThermoFisher Scientific) empleado en los ensayos de reometría.

- **Curva de flujo y viscosidad**

La temperatura de la placa se fijó a 45 °C para evitar la coagulación de los geles durante el ensayo. Se realizó el análisis incrementando la velocidad de deformación desde 0.01 s⁻¹ hasta 100 s⁻¹ en 300 segundos.

- **Barrido de temperatura**

El ensayo de coagulación del gel se realizó a una frecuencia constante de 1 Hz y un esfuerzo cortante constante de 1 Pa. El barrido de temperaturas se hizo desde 45°C a 25 °C durante 600 segundos.

- **Barrido de frecuencia**

Una vez coagulado el gel, el barrido de frecuencia se realizó a una temperatura constante de 25°C y un esfuerzo cortante constante de 1 Pa. El barrido de frecuencias se hizo desde 0.01 rad/s hasta 500 rad/s.

Los datos obtenidos en el barrido de frecuencia permitieron calcular el coeficiente de proporcionalidad (A) y el número de coordinación (z). El primero está relacionado con la fuerza de interacción entre las unidades reológicas que componen el gel, mientras que el segundo refleja las unidades reológicas relacionadas con otras en dicha red

tridimensional. Estos parámetros se relacionan según la ecuación $G^* = A \cdot \nu^{\frac{1}{z}}$, donde G^* es el módulo complejo en Pa y ν la frecuencia en Hz (Gabrielle *et al.*, 2001; Mancini *et al.* 2002).

3.3. Texturometría

El ensayo de textura se realizó en TA XTplus (Stable Micro Systems) (ver **Figura 10**) con una sonda *Cylinder Probe* (P/0.5R) en jarras “Bloom”. Se midió la fuerza “Bloom” de los geles de acuerdo con el estándar internacional *ISO 9665 Adhesives-Animal glues-Methods of sampling and testing*. La altura de la sonda se calibró a 30 mm y la profundidad de penetración en el gel fue de 4 mm.

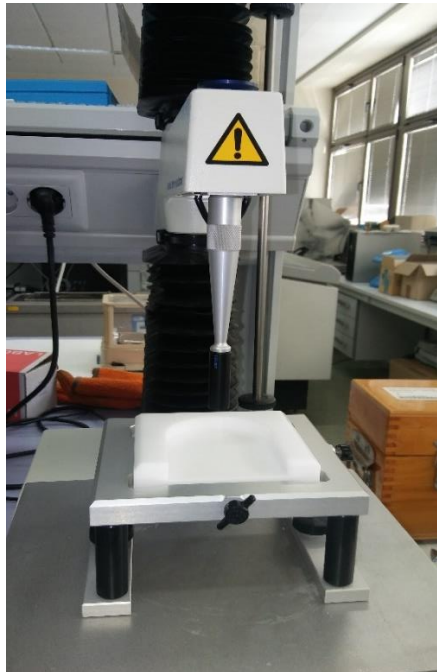


Figura 10. Texturómetro TA XTplus (Stable Micro Systems) con sonda *Cylinder Probe* (P/0.5R) empleado en los ensayos de texturometría.

Las muestras fueron preparadas haciendo los distintos tipos de geles de yema de huevo/ κ - carragenato de la misma forma a la descrita en el apartado 3.1.2. Una vez hecho el gel y atemperado a 45°C se llenaron cuatro jarras “Bloom” a una altura de 2 cm (ver **Figura 11**) y se llevaron a incubar aproximadamente 1 hora en una estufa a 26 °C para su gelificación. Trascorrido ese tiempo, el gel, ya sólido, se midió en el texturómetro. Se realizaron al menos cuatro medidas de cada gel.

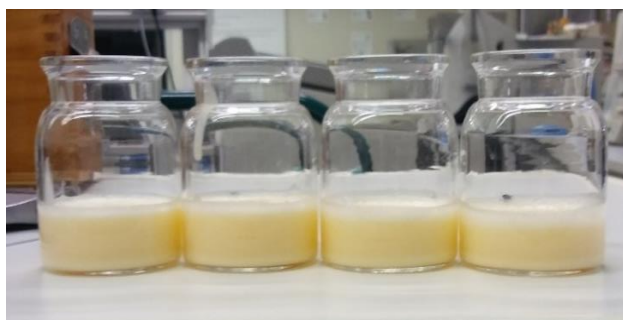


Figura 11. Jarras Bloom con gel de yema de huevo/ κ -carragenato al 1% (p/v)

En este ensayo, se obtiene una gráfica en la que se representa la fuerza en gramos en el eje de ordenadas frente al tiempo en segundos en el eje de abscisas. El punto máximo se corresponde con la dureza del gel (fuerza “Bloom”) y el mínimo con la pegajosidad.

3.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras se analizaron en el microscopio electrónico de barrido modelo JEOL-6610LV (ver **Figura 12**).



Figura 12. Microscopio electrónico de barrido JEOL-6610LV empleado en el ensayo de microscopía.

Se prepararon geles a las concentraciones de 1%, 1.25%, 1.5% y 1.75% (p/v) de igual manera a la descrita en el apartado 3.1.2 y se incubaron a 25 °C durante 24 horas. No se prepararon concentraciones de 0.75% y 0% porque en el primer caso el gel era demasiado débil y no permitía realizar el protocolo de preparación necesario para observar las muestras al SEM y en el segundo caso porque el medio es líquido. Se tomaron

muestras de los inóculos empleados, así como de los geles a las 0 y 24 horas a fin de determinar las UFC presentes tanto en el inóculo, como en la muestra que se iba a llevar al microscopio. Una vez transcurridas 24 horas se cortaron con un cúter fragmentos rectangulares de cada gel y se introdujeron en un tubo Falcon con una solución de tampón fosfato 25 mM (VWR) y glutaraldehído (Panreac) al 3% (v/v). Se dejaron en dicha solución durante una noche. Tras ese tiempo se realizaron tres lavados con el tampón fosfato para eliminar el glutaraldehído, transcurriendo 15 minutos entre cada lavado. Posteriormente se deshidrataron las muestras añadiendo de forma sucesiva disoluciones de etanol (Panreac) en agua al 20%, 40%, 60%, 80% y 100% (v/v), esperando 15 minutos entre cada pase. Finalmente se pasaron sucesivamente las muestras deshidratadas a soluciones de acetona (Sigma-Aldrich) en etanol al 30%, 50%, 70%, 90% y 100% (v/v), esperando 10 minutos entre cada pase. Los pases del 100% tanto para el etanol como para la acetona se realizaron dos veces.

Una vez hecho esto, se procedió al secado de las muestras empleando CO₂ supercrítico (Critical Point Dryer Balzers CPD 030, Polaron). Una vez secas, se montaron sobre soportes de aluminio con cinta de carbón adhesiva de doble cara y se bombardearon con oro en un evaporador al vacío (Sputtering Balzers SCD 004).

Se repitió todo el procedimiento de preparado de muestras, pero sin inocular al microorganismo a fin de observar la microestructura de las muestras en presencia y ausencia de *Staphylococcus*. Para ello se prepararon las concentraciones de κ -carragenato de 1%, 1.25%, 1.5% y 1.75% y κ -carragenato diluido en agua destilada al 1.5% (p/v) (para tener referencia del gel formado por el κ -carragenato por separado).

Por lo tanto, se realizaron fotos de geles de yema de huevo/ κ -carragenato al 1%, 1.25%, 1.5% y 1.75% en presencia y ausencia de *S. warneri*, así como de κ -carragenato al 1.5% en agua destilada.

3.5. Medida del pH

El pH es un parámetro importante tanto en la viabilidad celular de *S. warneri* como en la estructura de los geles. Por ello, se midió el pH de todos los geles ensayados, así como del preinóculo, con un pH-metro (Crison BASIC 20).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización del alimento modelo

4.1.1. Ensayos de reometría

La caracterización reológica de los geles de yema de huevo/ κ -carragenato, así como del medio sin κ -carragenato, se realizó mediante tres pruebas: curva de flujo, barrido de temperaturas y barrido de frecuencias. Las condiciones de los ensayos se detallan en el apartado 3.2. Los resultados obtenidos para cada prueba se comentan a continuación.

4.1.1.1. Curva de flujo

La curva de flujo permitió determinar qué tipo de fluido se trata, así como comparar el efecto de la concentración de κ -carragenato en los geles. Se obtuvo una curva de flujo en la que se representa el esfuerzo (σ) frente la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$) y otra curva de viscosidad en que se representa la viscosidad (η) frente a la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$). Los resultados obtenidos de la curva de flujo y de viscosidad para todos los medios ensayados se muestran en la **Figura 13** y **Figura 14** respectivamente.

Las muestras que contienen κ -carragenato muestran un comportamiento claramente pseudoplástico, donde la viscosidad disminuye al incrementarse la velocidad de deformación. Esta característica coincide con la información encontrada en la bibliografía, ya que este comportamiento es típico de muchos hidrocoloides, incluyendo el carragenato (CPKelco, 2001). Además, se observa que a medida que se incrementa la concentración de κ -carragenato los valores de σ y de η también lo hacen, observándose un aumento mayor a partir del gel de yema de huevo/ κ -carragenato al 1.25% (p/v).

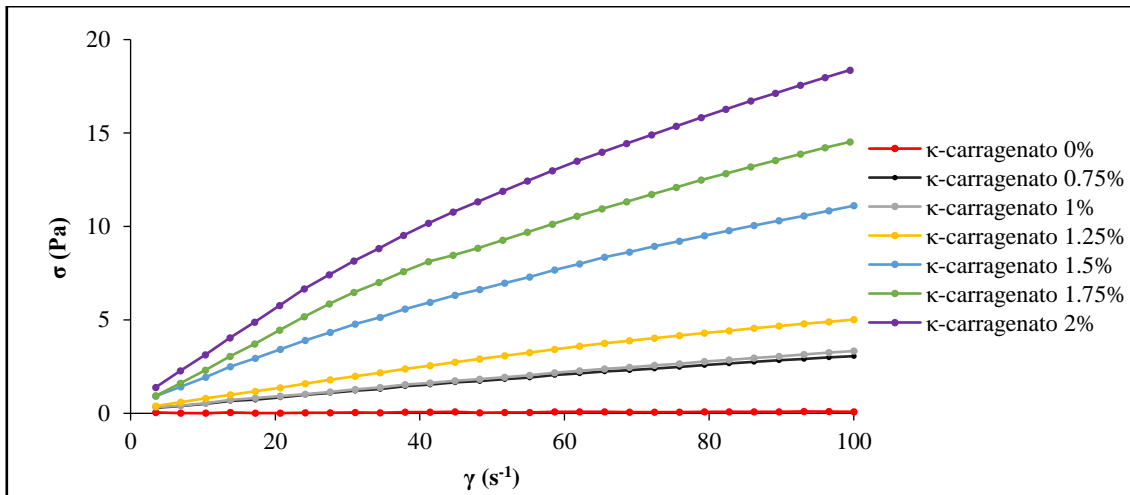


Figura 13. Curva de flujo para los geles yema de huevo/κ-carragenato. Los datos se corresponden con el valor medio de dos medidas.

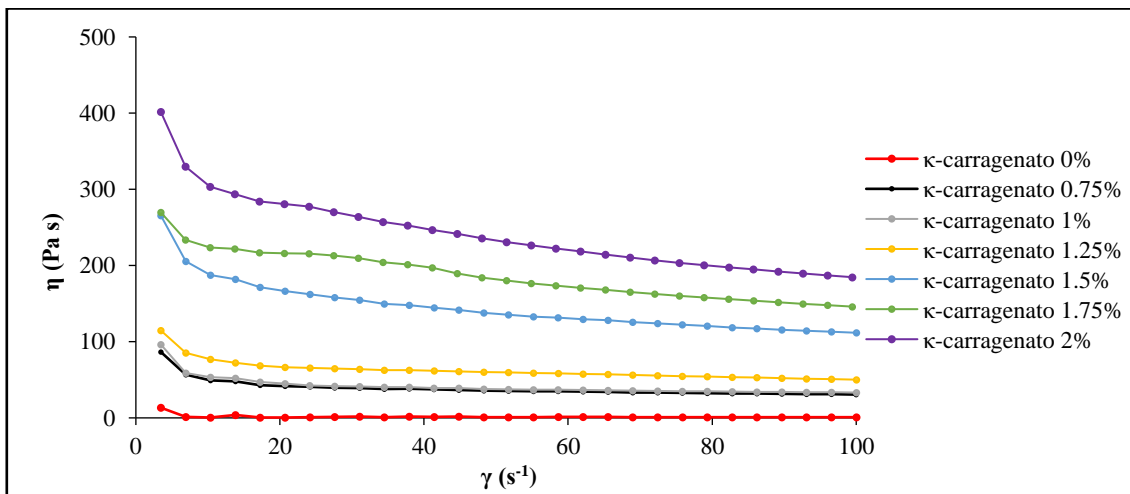


Figura 14. Curva de viscosidad para los geles de yema de huevo/κ-carragenato. Los datos se corresponden con el valor medio de dos medidas.

Para obtener más información sobre el tipo de fluido, los datos de la curva de flujo se ajustaron al modelo Herchel-Bulkey, descrito en el apartado 2.4.1. A partir de este modelo se obtienen los valores de n y K (Pa sⁿ) mostrados en la **Tabla 3**. Debe señalarse que, en todos los casos, excepto en la muestra líquida, el ajuste fue muy bueno ($r^2=0.999$).

Tabla 3. Datos de la n , K y ajuste de r^2 obtenidos para los seis geles de yema de huevo/ κ - carragenato según el modelo de Herchel-bulkey Los datos que se muestran se corresponden con los valores medios de dos medidas.

κ -carragenato (%)	n (-)	K (Pa s ⁿ)	r^2
0	0.9609 ± 0.1226	0.0011 ± 0.0006	0.800
0.75	0.8202 ± 0.0122	0.0697 ± 0.0052	0.999
1	0.8570 ± 0.0567	0.0611 ± 0.0028	0.999
1.25	0.7626 ± 0.0233	0.1578 ± 0.0352	0.999
1.5	0.6884 ± 0.0478	0.4975 ± 0.1216	0.999
1.75	0.6124 ± 0.0478	0.9851 ± 0.2798	0.999
2	0.6226 ± 0.0089	1.14 ± 0.05	0.999

Cuando el fluido es pseudoplástico la n se encuentra entre 0 y 1, si es dilatante la n es superior a 1 y para los fluidos newtonianos la n es igual a 1. Por otro lado, el índice de consistencia K es un parámetro relacionado con la viscosidad de un fluido, de manera que cuando más alta sea la K , más viscoso es el fluido (Steffee 1996). De este modo, en base a los datos obtenidos del ajuste recogidos en la **Tabla 3**, se observa que K aumenta y que la n disminuye a medida que se incrementa la concentración de κ -carragenato. Por lo tanto, los valores de n indican que a mayor cantidad de κ -carragenato, mayor es el carácter pseudoplástico del sistema alimentario. De hecho, se ha observado una relación lineal ($r^2=0,9283$) entre la n y la concentración de κ -carragenato (ver **Figura 15**). Los valores crecientes de K indican que la viscosidad también se incrementa con la concentración del polímero, lo cual también se observa en la **Figura 14**.

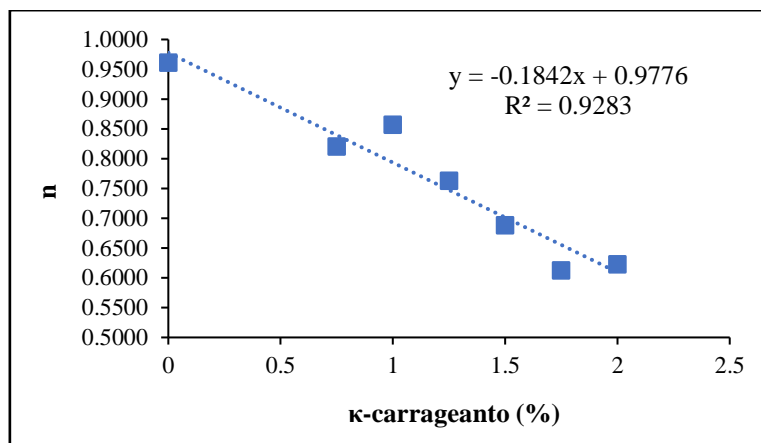


Figura 15. Relación entre la n y la concentración de κ -carragenato de los geles de yema de huevo/ κ -carragenato. Los datos de n que se muestran se corresponden con el valor medio de dos medidas.

4.1.1.2. Curva de coagulación

La curva de coagulación muestra cómo, mediante la evolución del módulo elástico (G') y viscoso (G'') en función del tiempo y la temperatura, una solución pasa de un estado de sol a estado de gel.

Los resultados obtenidos para las curvas de coagulación de los seis geles y del medio líquido se muestran en las **Figura 16**, **Figura 17**, **Figura 18**, **Figura 19**, **Figura 20**, **Figura 21** y **Figura 22**. Durante el enfriamiento de las muestras con κ -carragenato, los valores de los módulos G' y G'' se van incrementando ligeramente debido a una pérdida de movilidad de las moléculas que conforman la solución. Se observa además que el módulo G'' presenta inicialmente valores superiores a los de G' , lo que indica que todas las muestras a 45°C se encuentra en estado líquido (o de sol). Tras un periodo más o menos largo en el que los valores de ambos módulos permanecen aproximadamente constantes, según sigue disminuyendo la temperatura, tanto G' como G'' se incrementan bruscamente, aumentando G' más rápidamente que G'' . Por lo tanto, en un determinado punto G' y G'' se cruzan, pudiéndose obtener el valor de la temperatura de coagulación a partir de este punto. Por debajo de esta temperatura, G' y G'' se continúan incrementando y G' presenta ahora valores superiores a los de G'' , lo cual indica que la muestra se encuentra en estado de gel. Aunque este punto, en el que G' es igual G'' , es una buena estimación del punto de coagulación, existen también otras formas de calcularlo según se recoge en la bibliografía (Winter & Chambon 1986; Nuñez-Santiago & Tecante, 2007; Aguilar *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018).

Como era de esperar, en el medio sin κ -carragenato no se produce la formación de gel (no existe cruce entre ambos módulos y los valores de G'' siempre son superiores a G') (ver **Figura 16**). Los puntos de coagulación de los geles analizados se encuentran comprendidos entre los 34 y 44°C. Además, se encontró una relación lineal positiva ($r^2=0,9664$) entre la concentración de κ -carragenato y la temperatura de coagulación (ver **Figura 23**). En otros estudios se ha visto que las soluciones con solo κ -carragenato presentan una temperatura de coagulación inferior que si este se encuentra en presencia de otros componentes, como otro polisacárido (Chen *et al.*, 2019) o sacarosa (Yang *et al.*, 2018). De acuerdo con estos autores, en este trabajo se comprobó si la presencia de yema contribuye a incrementar el punto de coagulación en los geles analizados. Para ello, se realizó este ensayo para el gel con κ -carragenato al 1% (p/v) sin yema y se observó una temperatura de coagulación inferior a aquel con yema (29,8 °C sin yema; 35,5°C con yema).

Según plantean, Chen *et al.* (2019) y Yang *et al.* (2018), la presencia de otras moléculas, como la sacarosa u otro polímero, lo que hacen es favorecer la formación de una red más fuerte y la unión de las cadenas de κ -carragenato cuando se encuentran en disolución. En el caso de la presencia de otro polímero podría ocurrir porque este ejercería un efecto mecánico que haría que las moléculas de κ -carragenato estuviesen más juntas, favoreciendo que se unieran entre ellas más rápidamente en el proceso de enfriamiento (Chen *et al.*, 2019). En el caso de la sacarosa esto ocurriría mediante la exclusión de las moléculas de agua unidas al κ -carragenato al ser sustituidas por el disacárido cuando se encuentran en disolución, lo que favorecería nuevamente esta mayor agregación del polímero incrementándose la temperatura de coagulación (Yang *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos con los geles de yema de huevo/ κ -carragenato indican que la presencia de yema permite la formación de un gel más fuerte, al tiempo que favorece la formación de gel a una temperatura de coagulación mayor para cada una de las concentraciones de κ -carragenato (ver **Figura 23**). Esta influencia de la yema en la formación del gel con κ -carragenato también ha sido observada por Aguilar *et al.* (2017) en un estudio similar. Esto podría estar relacionado con las interacciones electrostáticas entre las proteínas de la yema y el κ -carragenato, que haría que las moléculas del polímero se encontrasen más juntas, favoreciendo el incremento en la temperatura de coagulación observado. A pesar de que se sabe que el pH juega un papel fundamental en estas interacciones (Aguilar *et al.*, 2017; Le *et al.*, 2017), en este caso no es un factor a

considerar ya que el pH de todos los geles se encontraba entre 6 y 6.5 y el κ -carrageno comienza a hidrolizar a pHs muy inferiores (en torno a 3.5) (Aguilar *et al.*, 2017). Sin embargo, todos estos procesos son complejos y no están del todo claros, por lo que sería interesante realizar más estudios tanto para la yema, como para otros componentes que formen gel con el κ -carrageno.

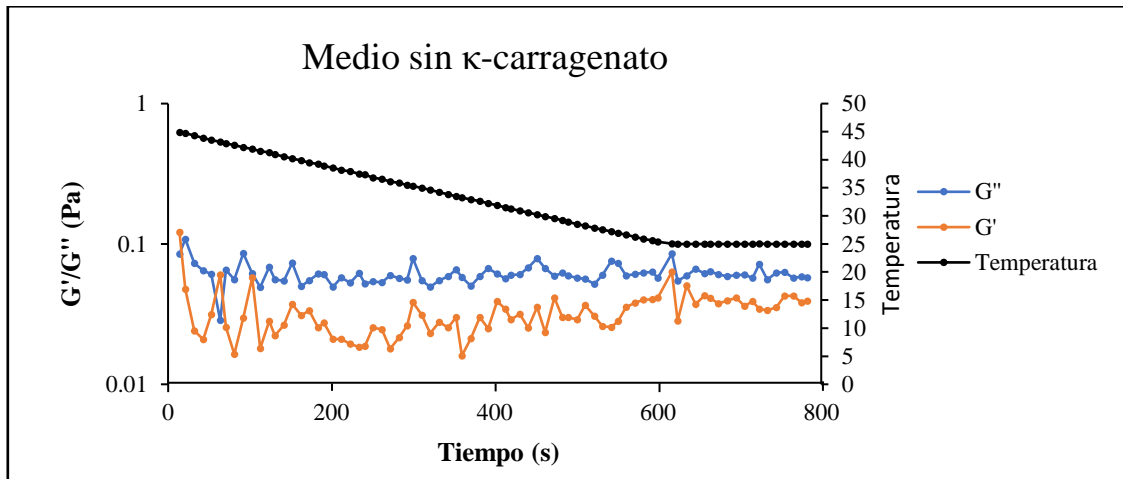


Figura 16. Curva de coagulación para el medio sin κ -carragenato. Los resultados obtenidos se corresponden con valores medios de dos medidas.

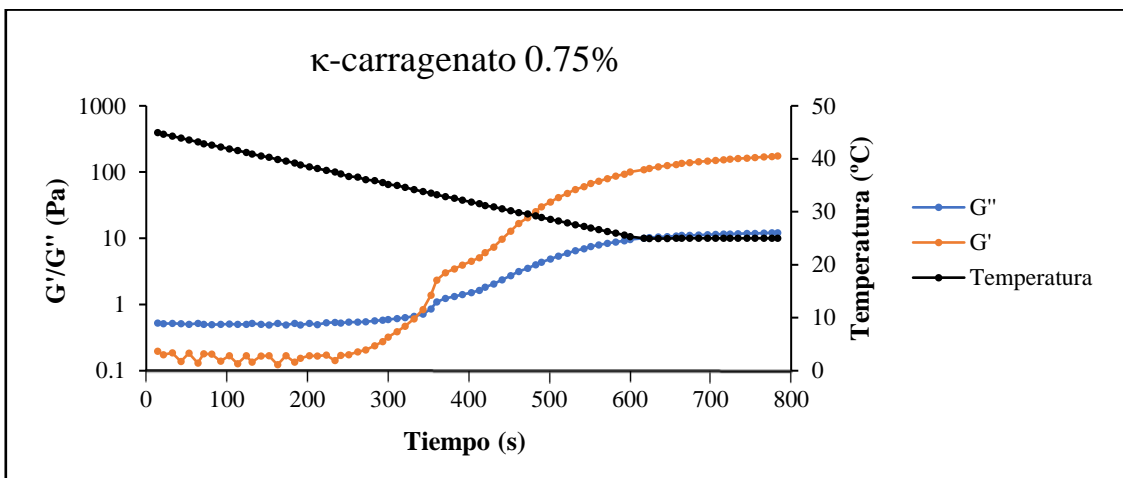


Figura 17. Curva de coagulación para gel de yema de huevo/ κ -carragenato al 0.75% (p/v). Los resultados obtenidos se corresponden con valores medios de dos medidas.

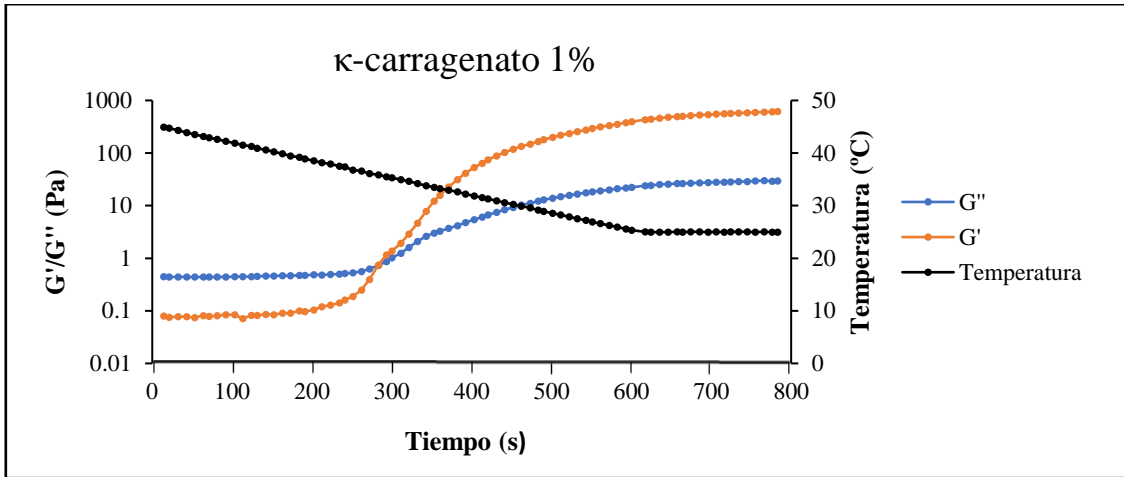


Figura 18. Curva de coagulación para gel de yema de huevo/κ-carragenato al 1% (p/v). Los resultados obtenidos se corresponden con valores medios de dos medidas.

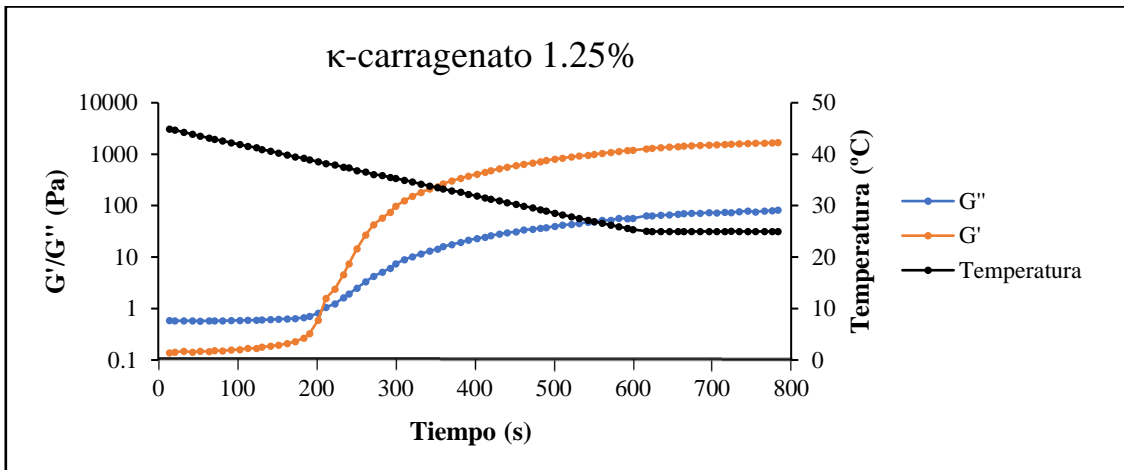


Figura 19. Curva de coagulación para gel de yema de huevo/κ-carragenato al 1.25% (p/v). Los resultados obtenidos se corresponden con valores medios de dos medidas.

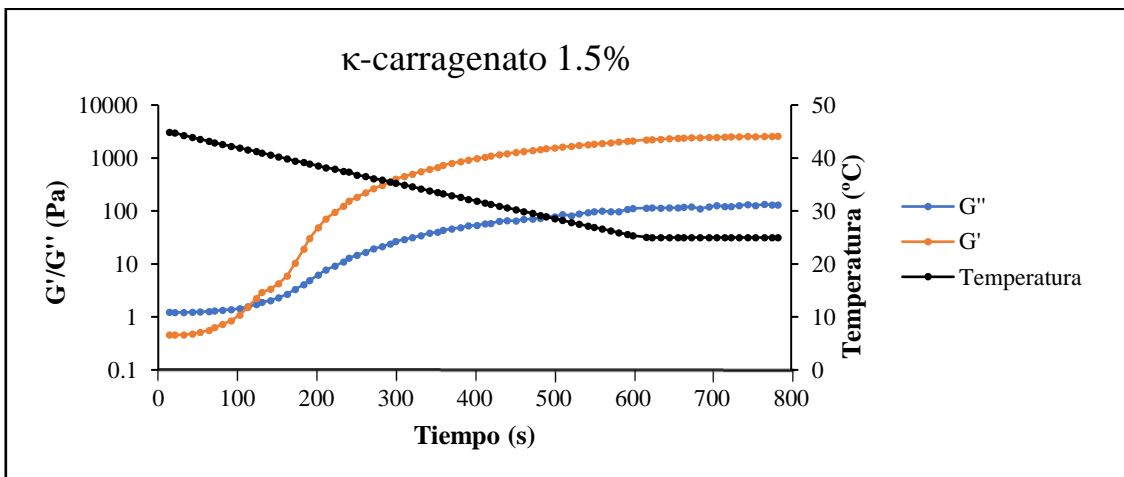


Figura 20. Curva de coagulación para gel de yema de huevo/κ-carragenato al 1.5% (p/v). Los resultados obtenidos se corresponden con valores medios de dos medidas.

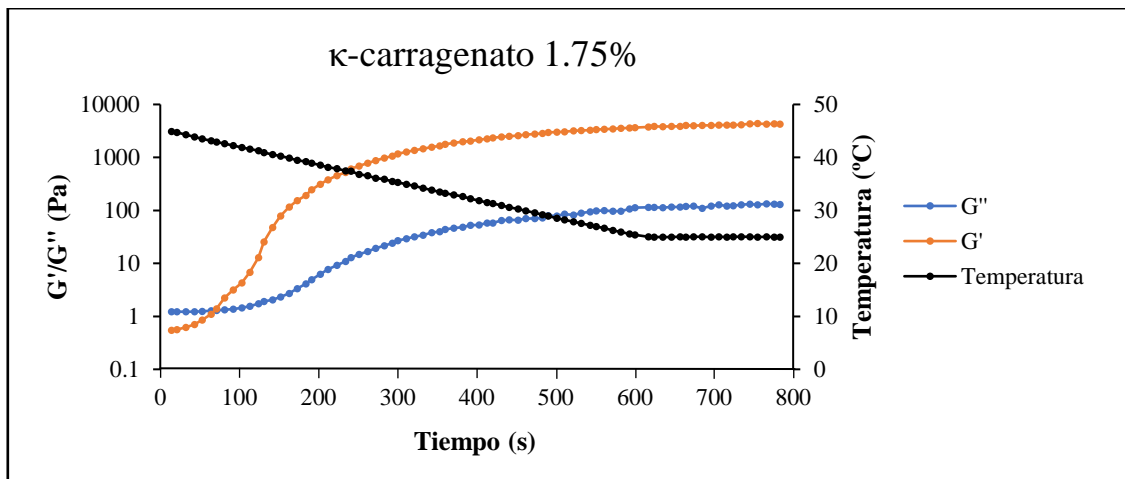


Figura 21. Curva de coagulación para gel de yema de huevo/κ-carragenato al 1,75% (p/v). Los resultados obtenidos se corresponden con valores medios de dos medidas.

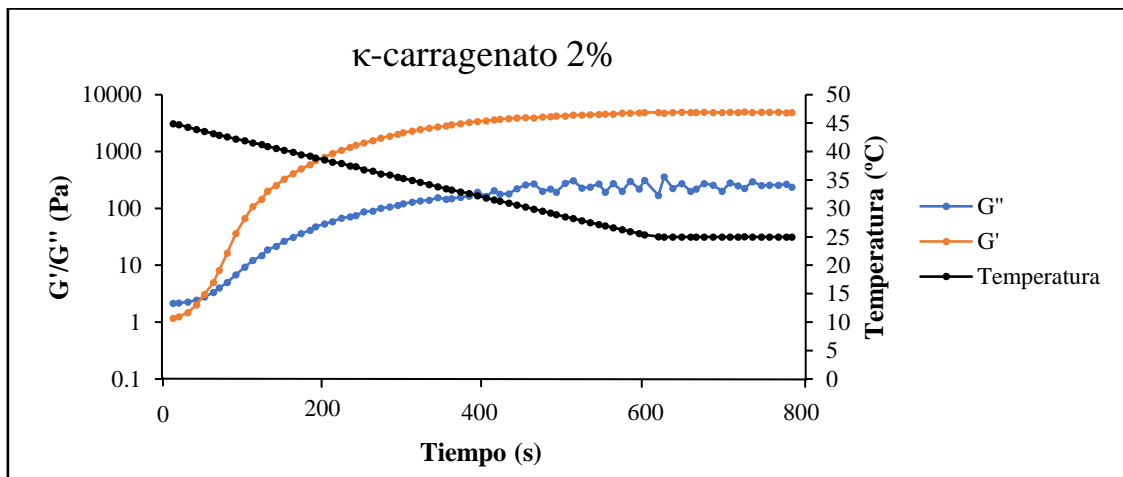


Figura 22. Curva de coagulación para gel de yema de huevo/κ-carragenato al 2% (p/v). Los resultados obtenidos se corresponden con valores medios de dos medidas.

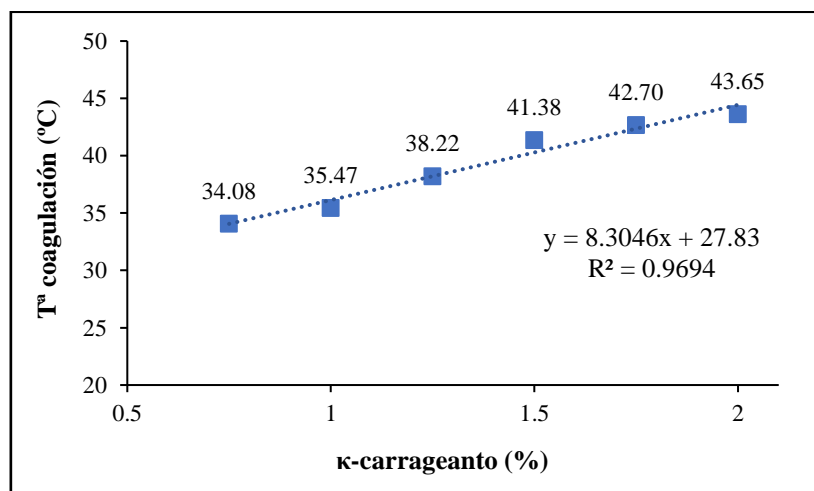


Figura 23. Ajuste lineal entre la temperatura de coagulación y la concentración de κ-carragenato. Los resultados obtenidos se corresponden con la media de dos medidas.

4.1.1.3. Barrido de frecuencia

El barrido de frecuencia es un ensayo de gran utilidad ya que proporciona información sobre la estructura de un sistema alimentario. Se muestra en las **Figura 24** y **Figura 25** la evolución de los módulos G' y G'' al variar la frecuencia desde 0.6 a 60 rad/s. En todos los casos, excepto para el medio sin κ -carragenato, el módulo G' se encuentra por encima de G'' , indicando un comportamiento predominantemente elástico para todas las matrices alimentarias, lo cual concuerda con los resultados de la curva de coagulación una vez se ha formado el gel. De acuerdo con otros estudios sobre geles compuestos por κ -carragenato sin aditivar (Ikeda & Nisinari, 2001; Nuñez-Santiago & Tecante, 2007), mezclado con gelatina (Derkach *et al.*, 2015) o con yema (Aguilar *et al.*, 2011), en general, el comportamiento de los módulos elástico y viscoso no depende de la frecuencia. Sin embargo, puede observarse que en el caso de las muestras con concentraciones de κ -carragenato comprendidas entre 1.25 y 2%, el valor de G'' tiende a aumentar ligeramente al incrementarse la frecuencia. Por el contrario, en el medio líquido (0% κ -carragenato) los valores de los módulos G' y G'' muestra una clara dependencia con respecto a la frecuencia, ya que ambos se incrementan al aumentar la frecuencia. Asimismo, en este caso, a valores de frecuencia por debajo de 5 rad/s, se observa que la muestra tiene un comportamiento predominantemente viscoso, mientras que a valores por encima de esta frecuencia la muestra es predominantemente elástica (ver **Figura 24**). Aunque hay que tener en cuenta que a partir de la frecuencia 1.56 rad/s (línea roja, **Figura 24**) los valores de ambos módulos son muy cercanos.

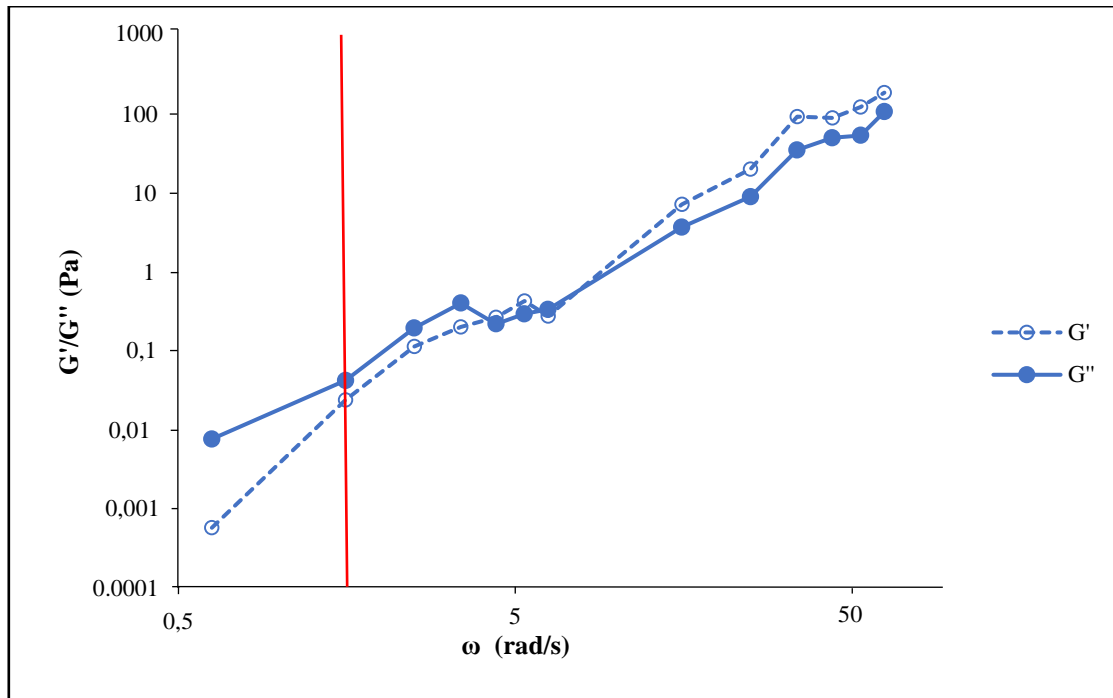


Figura 24. Barrido de frecuencias para el medio sin κ -carragenato. Los valores de frecuencia se representan en rad/s, frente a G' y G'' en Pa. Los valores se corresponden con medias de dos medidas. Línea roja marca frecuencia de 1.56 rad/s.

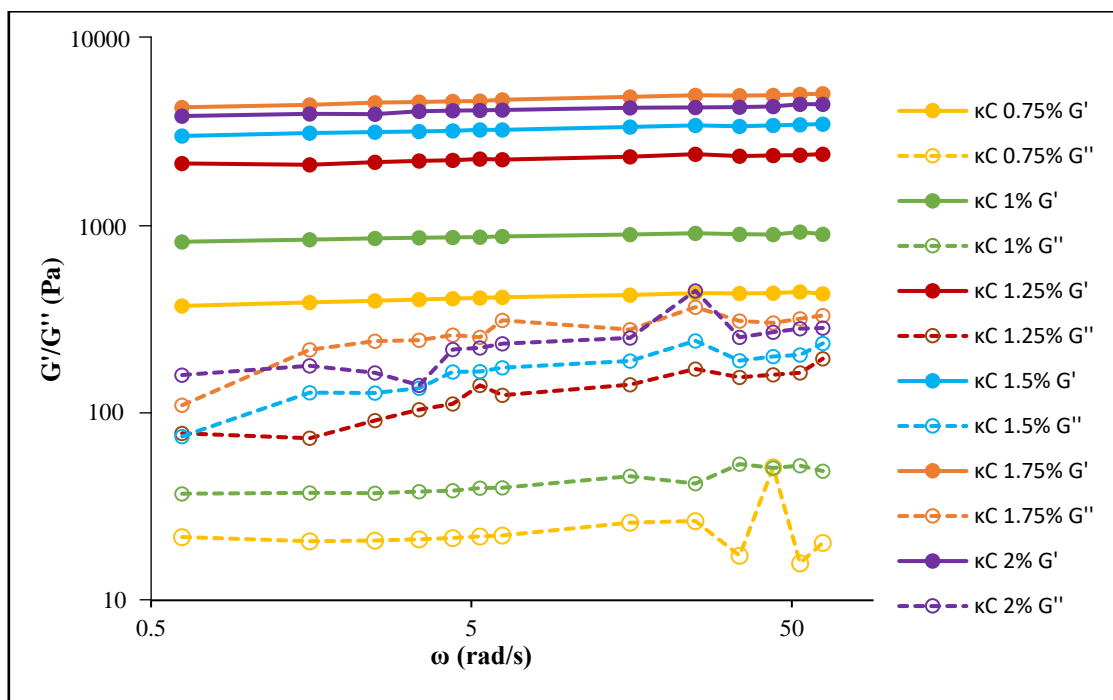


Figura 25. Barrido de frecuencias para los seis geles de yema de huevo/ κ -carragenato. Los valores de frecuencia se representan en rad/s, frente a G' y G'' en Pa. Los valores se corresponden con medias de dos medidas. $\kappa C = \kappa$ -carragenato.

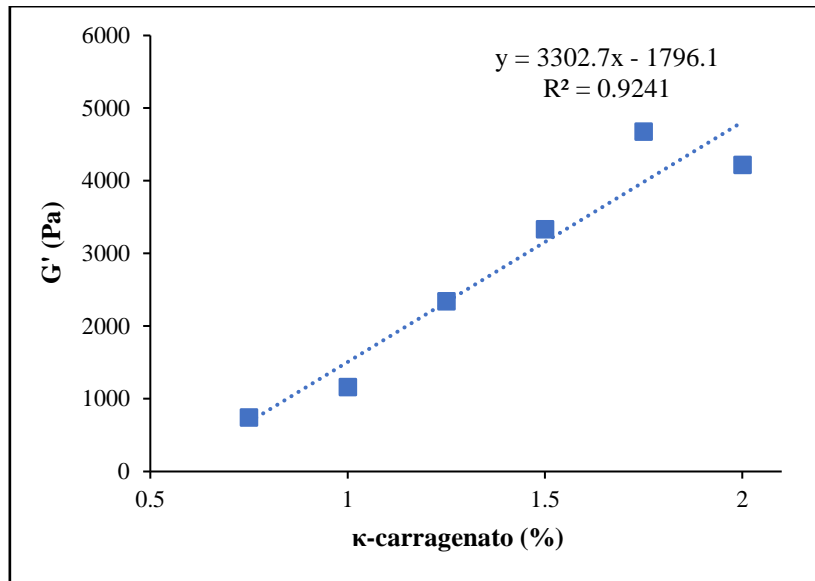


Figura 26. Ajuste lineal entre el módulo elástico G' y la concentración de κ -carragenato (%) para los seis geles de yema de huevo/ κ -carragenato ensayados.

En la **Figura 25** se observa que al incrementarse la concentración de κ -carragenato también lo hacen los valores de los módulos elástico y viscoso. De hecho, se ha encontrado una relación lineal ($r^2=0.9241$) entre la concentración de κ -carragenato y el valor del módulo G' , que se mantiene para todo el rango de frecuencias ensayado (0.01 a 500 rad/s) (ver **Figura 26**), lo que indica que el polisacárido contribuye a incrementar la elasticidad del gel. Este resultado es consistente con otros estudios, donde se ha visto que a partir de una determinada concentración de gelatina se produce un aumento de G' (Derkach *et al.*, 2015) y también para concentraciones crecientes de κ -carragenato sin aditivar y mezclado con otro polisacárido (goma garrofín) (Turquois *et al.*, 1992).

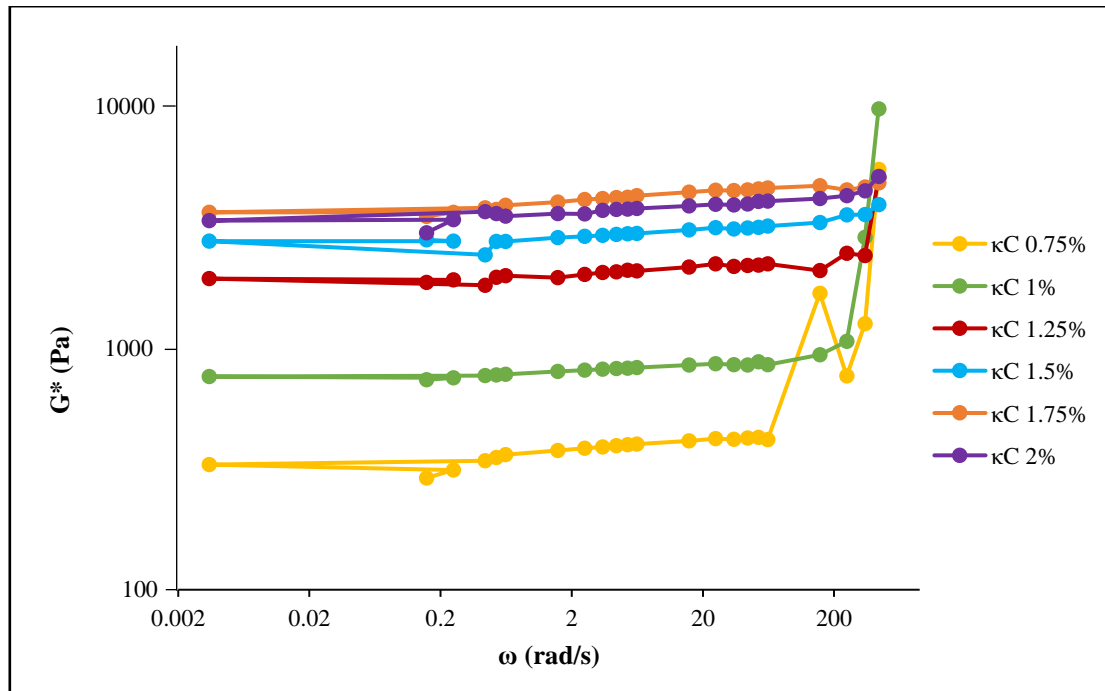


Figura 27. Representación del módulo complejo frente a la frecuencia para los seis geles ensayados. La región lineal, donde G^* es constante, se encuentra entre las frecuencias 0.6 a 60 rad/s. $\kappa C = \kappa$ -carragenato.

Tal y como se observa en la **Figura 27**, el módulo complejo (G^*) muestra en todos los casos un comportamiento lineal entre los valores de frecuencia de 0.6 y 60 rad/s. A partir de esta zona lineal, donde el módulo G^* se mantiene constante, se calculó en todos los sistemas ensayados el número de unidades reológicas (z) y la fuerza de interacción entre ellas (A), en función del ajuste de los datos a la ecuación $G^* = A \cdot \nu^{\frac{1}{z}}$, descrita en el apartado 3.2 (Gabrielle *et al.*, 2001). En todos los casos, incluyendo la matriz líquida el ajuste fue bueno ($r^2 > 0.90$) (ver **Figura 28**, **Figura 29**, **Figura 30**, **Figura 31**, **Figura 32**, **Figura 33** y **Figura 34**).

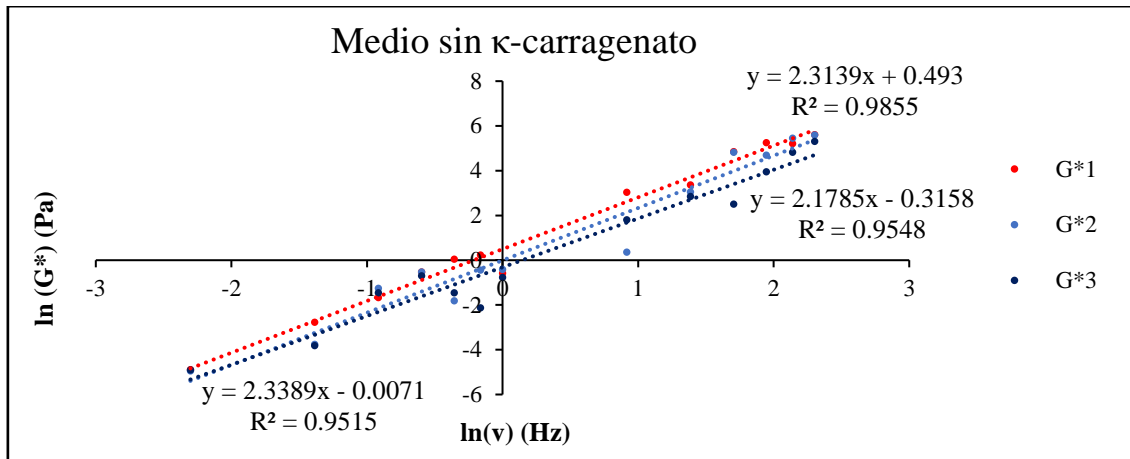


Figura 28. Gráfica con los ajustes de la ecuación indicada en el texto para el medio sin κ -carragenato.

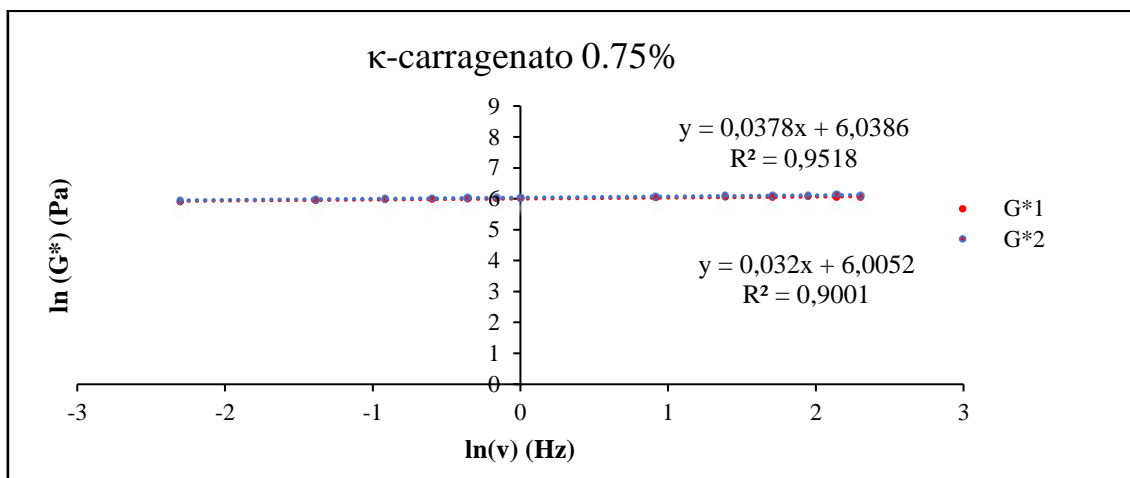


Figura 29. Gráfica con los ajustes de la ecuación indicada en el texto para el medio con κ -carragenato 0.75% (p/v).

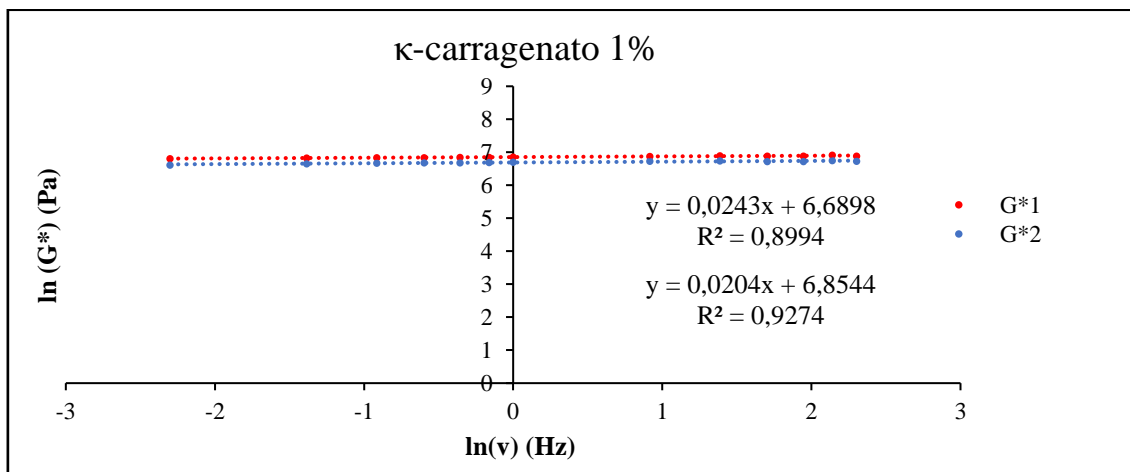


Figura 30. Gráfica con los ajustes de la ecuación indicada en el texto para el medio con κ -carragenato al 1% (p/v).

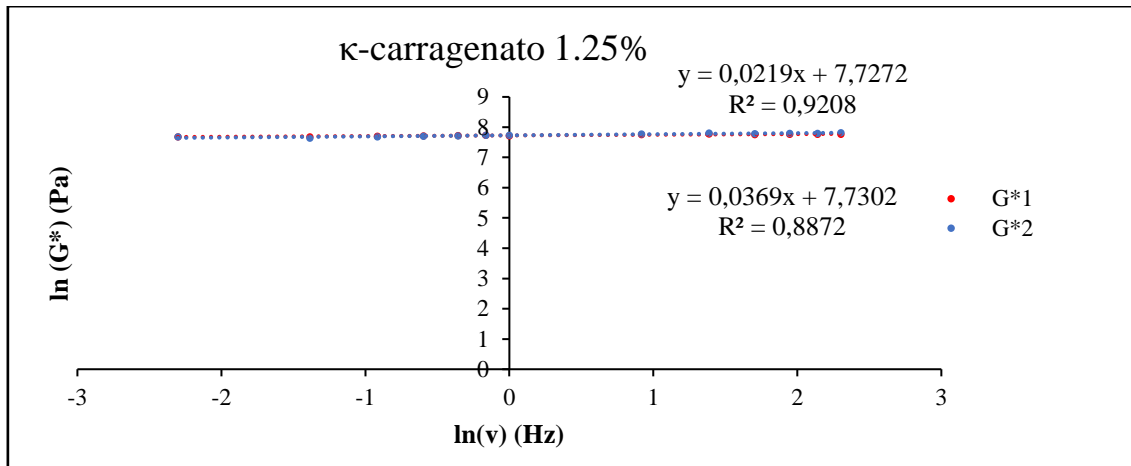


Figura 31. Gráfica con los ajustes de la ecuación indicada en el texto para el medio con κ-carragenato al 1.25% (p/v).

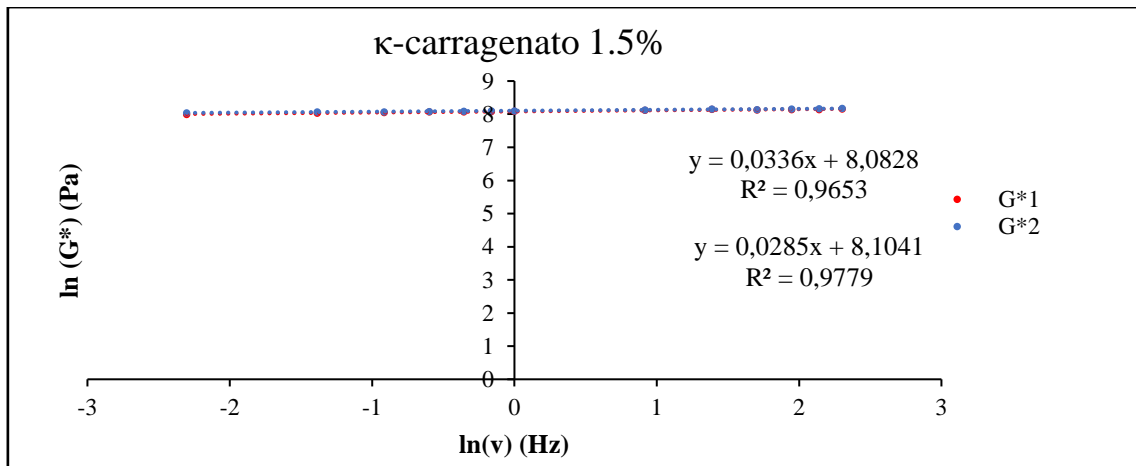


Figura 32. Gráfica con los ajustes de la ecuación indicada en el texto para el medio con κ-carragenato al 1.5% (p/v).

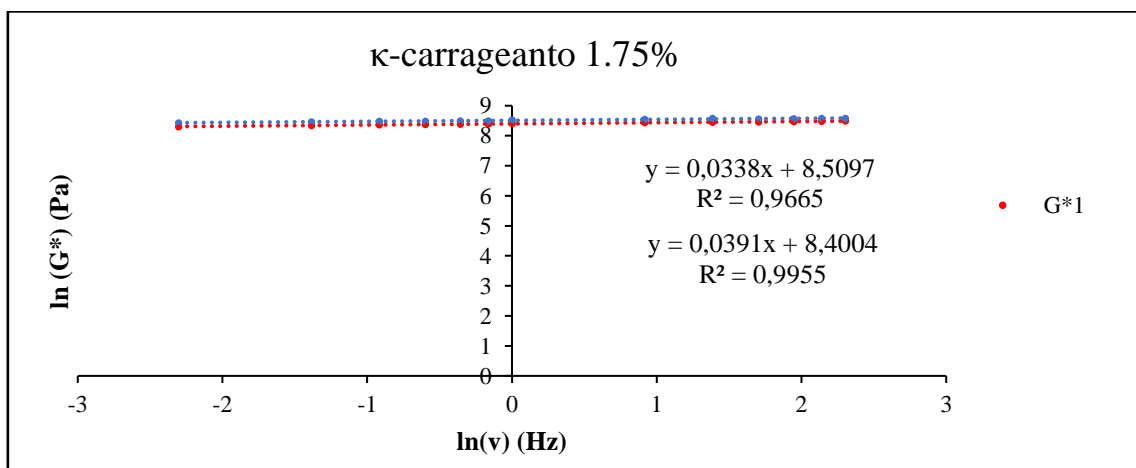


Figura 33. Gráfica con los ajustes de la ecuación indicada en el texto para el medio con κ-carragenato 1.75% (p/v).

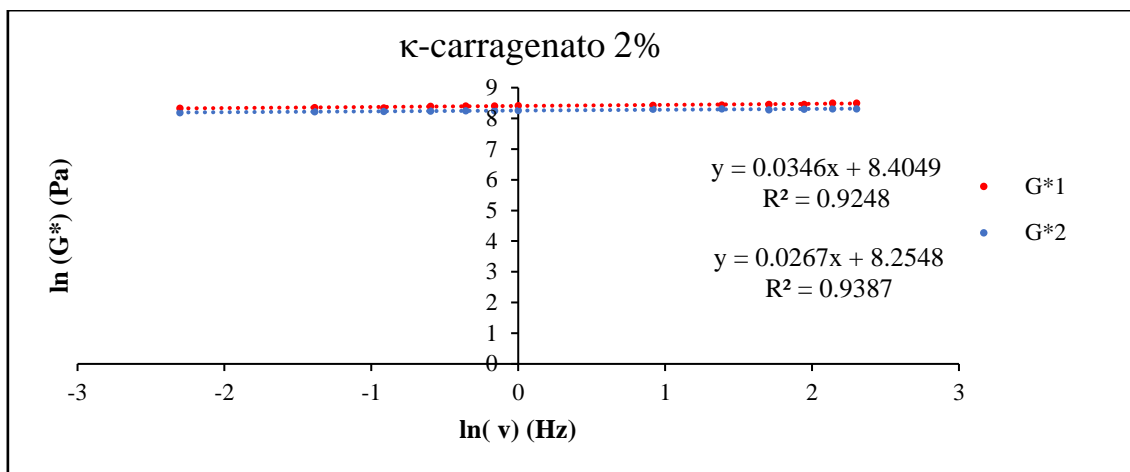


Figura 34. Gráfica con los ajustes de la ecuación indicada en el texto para el medio con κ -carragenato 2% (p/v).

Tabla 4. Parámetros A y z obtenidos del ajuste para barridos de frecuencia indicada en el texto. Se muestran los valores medios con sus desviaciones estándar.

κ -carragenato (%)	A (kPa)	z (-)	r^2
0	0.0005 ± 0.00001	0.43 ± 0.02	0.964
0.75	0.41 ± 0.01	28.85 ± 3.39	0.926
1	0.87 ± 0.09	45.08 ± 5.56	0.913
1.25	2.27 ± 0.04	36.38 ± 13.12	0.904
1.5	3.27 ± 0.02	32.42 ± 3.76	0.971
1.75	4.74 ± 0.38	27.58 ± 2.83	0.981
2	4.18 ± 0.45	33.17 ± 6.04	0.932

Los valores obtenidos de A y z para los distintos geles, así como para medio líquido, se recogen en la **Tabla 4**. Se observa que a medida que se incrementa la concentración de κ -carragenato también lo hace el coeficiente de proporcionalidad (A), indicando que las uniones entre los componentes del gel se hacen más fuertes. Sin embargo, no se observa ninguna tendencia en los valores del número de coordinación (z), siendo del mismo orden de magnitud y oscilando entre 27 y 45, excepto para medio líquido que tiene valores cercanos a cero. El incremento de A con la concentración de κ -carragenato podría deberse a las interacciones entre las proteínas del huevo con el polisacárido, que parecen alcanzar

un valor máximo para el gel yema de huevo/ κ -carragenato 1.75% (p/v). A esta concentración debido a la proporción de yema y κ -carragenato parece alcanzarse un equilibrio entre las interacciones de ambos componentes, siendo la diferencia con respecto al gel de 2% muy pequeña. Con el fin de determinar el efecto de la yema, se calcularon los valores de A y z para el gel de κ -carragenato al 1% (p/v) sin yema. Los valores de A y z obtenidos fueron mucho más bajos en comparación al mismo gel con yema ($A = 0.060 \pm 0.012$ kPa y $z = 9.52 \pm 1.60$; con yema ver **Tabla 4**), lo que indica que la yema favorece que se formen un mayor número de interacciones entre las unidades reológicas, así como más fuertes. Asimismo, en el caso del medio líquido se observan unos valores de A y z mucho más bajos que en medio sólido (ver **Tabla 4**). Dada la ausencia de κ -carragenato y que la yema en este medio no coagula las uniones que se forman son mucho menores, así como más débiles.

Por último, la tangente delta ($\tan \delta$) mide la contribución relativa de los componentes viscosos a las propiedades mecánicas de un material ($\tan \delta = G''/G'$). Si la $\tan \delta$ es igual a 1 significa que el material es tan elástico como viscoso, si es superior a 1 se comporta predominantemente como un fluido mientras que si es inferior a 1 se comporta fundamentalmente como un sólido. Asimismo, los geles que presentan valores de $\tan \delta$ por debajo de 0.1 se denominan geles verdaderos, mientras que si están por encima se trata de geles más “débiles” (Ikeda & Nishinari, 2001; Apridou *et al.*, 2014; Díazñez *et al.*, 2019). Estos geles “débiles” se caracterizan por un cambio en las uniones de las moléculas que componen el gel cuando se somete a un determinado esfuerzo durante un tiempo, lo que provoca una fluctuación en el estado del gel (Díazñez *et al.*, 2019).

La $\tan \delta$ de los geles de yema de huevo/ κ -carragenato ensayados (ver **Figura 35**) muestra que para concentraciones por encima de 1.25% predomina el componente elástico en los geles ($\tan \delta < 0.1$), tratándose de geles verdaderos. Las concentraciones de 0.75 a 1.25%, donde la $\tan \delta$ es superior a 0.1, indica que se trata de geles con un carácter “débil”. Esta disminución de la $\tan \delta$ al aumentar la concentración de κ -carragenato se ha visto en otro estudio que emplea yema y κ -carragenato con distintas concentraciones (Aguilar *et al.*, 2011).

En los geles evaluados en este estudio, se observa que la $\tan \delta$ disminuye al aumentar la concentración de κ -carragenato desde 0.75% hasta 1.75%, volviendo a

aumentar ligeramente para el gel de 2% de κ -carragenato (ver **Figura 35**). Esto parece indicar que a 1.75% se alcanza un equilibrio entre las interacciones de proteínas de la yema y el polisacárido, lo que está en concordancia con los valores obtenidos para el parámetro A (**Tabla 4**) donde el valor de mayor fuerza de interacción entre las moléculas que componen el gel coincide con dicha concentración. Sin embargo, como se comentó anteriormente, se debe tener en cuenta que la diferencia observada con la concentración de 2% es pequeña.

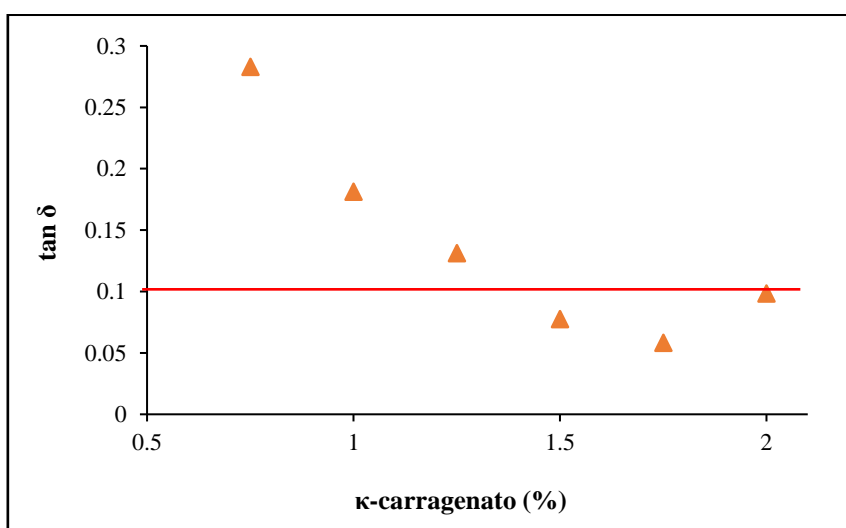


Figura 35. Relación entre la $\tan \delta$ y la concentración de κ -carragenato (%). La línea roja marca el límite de $\tan \delta=0.1$.

4.1.2. Ensayo de texturometría

El ensayo de textura realizado, descrito en el apartado 3.3, permitió obtener los valores de la fuerza “Bloom” para los seis geles ensayados. Al medio sin κ -carragenato no se le analizó la textura porque es líquido. A partir de este ensayo se obtienen gráficas del tipo de la que se muestra como ejemplo en la **Figura 36**, donde el pico máximo de la gráfica se corresponde con el valor de la fuerza “Bloom” del gel. A partir de estas gráficas se calcularon los valores medios de la fuerza “Bloom” de los alimentos modelo (realizadas al menos por cuadruplicado) junto con su desviación estándar, recogidas en la **Tabla 5**.

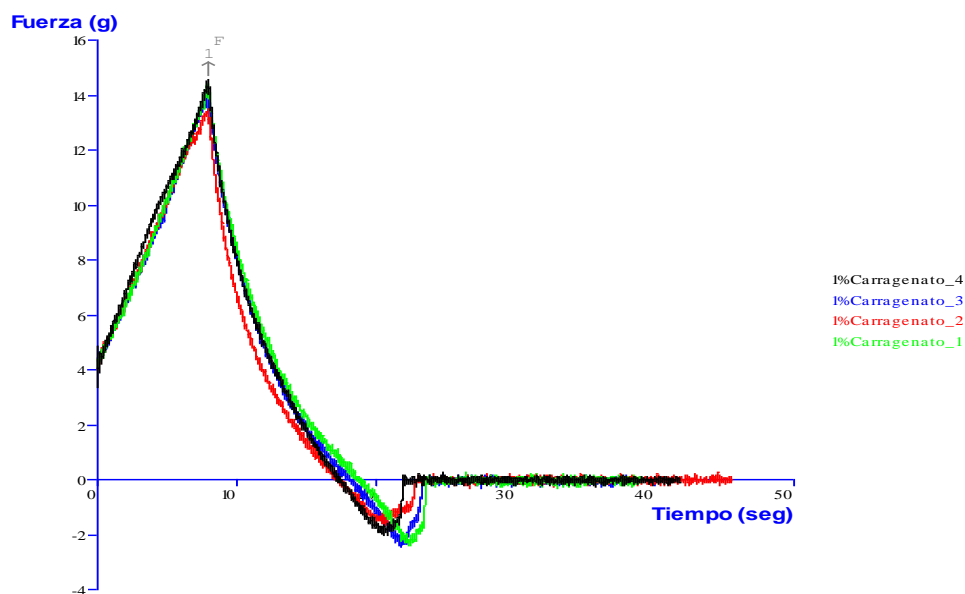


Figura 36. Gráfica obtenida del programa del texturómetro utilizado en este estudio. Se representa la Fuerza (g) frente al tiempo para cuatro muestras del gel de yema de huevo/κ-carragenato al 1% (p/v).

Tabla 5. Valores medios junto con la desviación estándar de la fuerza “Bloom” (g) para los seis geles de yema de huevo/κ-carragenato ensayados.

κ-carragenato (%)	Fuerza “Bloom” (g)
0.75	17.5 ± 1.5
1	14.1 ± 0.4
1.25	52.9 ± 11.7
1.5	93.9 ± 13.5
1.75	103.8 ± 19.1
2	163.2 ± 11.5

Los resultados obtenidos para la fuerza “Bloom” (ver **Tabla 5**) muestran que a medida que se incrementa la concentración de κ-carragenato la fuerza “Bloom” aumenta. Esto es debido a que a medida que se incrementa la concentración del polímero el gel se vuelve más firme, lo que está en concordancia con los valores de *A* obtenidos a partir de los barridos de frecuencias, que indican que la fuerza de interacción entre las moléculas es mayor para mayores concentraciones de κ-carragenato. Este incremento de la firmeza de geles de yema de huevo/κ-carragenato al aumentar la concentración de κ-carragenato

ha sido observado por Aguilar *et al.* (2017) en un trabajo previo. Por otra parte, Valverde *et al.* (2016) obtuvieron valores de dureza mayores en geles con carragenato y yema a los geles que únicamente contenían carragenato.

4.1.3. Observación microscópica (SEM)

La microestructura de los geles de yema de huevo/ κ -carragenato fue evaluada mediante microscopía electrónica de barrido, tal y como se describe en el apartado 3.4. Los resultados se muestran en la **Figura 37** y **Figura 38**.

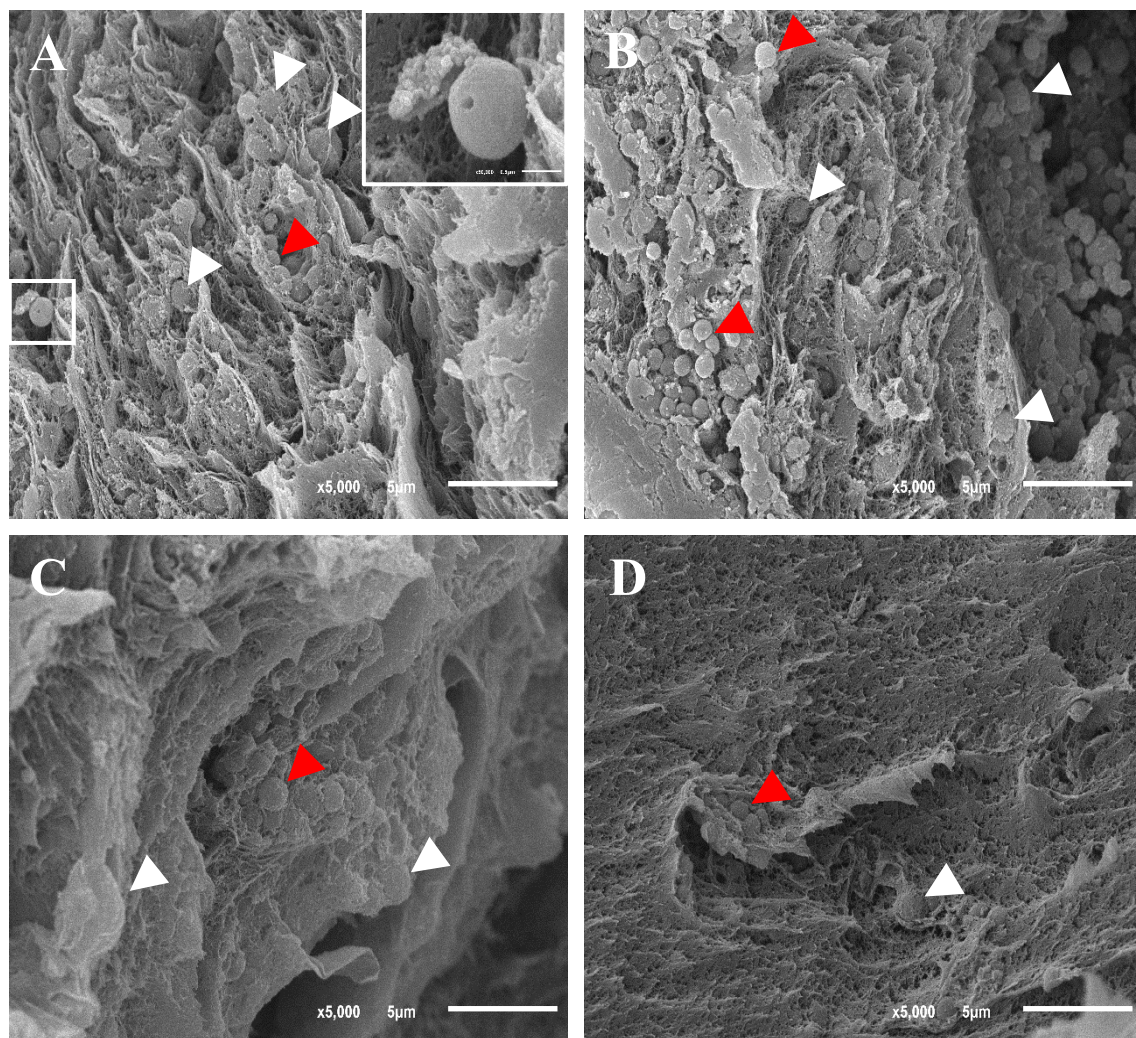


Figura 37. Imagen al microscopio electrónico de barrido de las muestras de geles de yema de huevo/ κ -carragenato al 1% (A), 1.25% (B), 1.5% (C) y 1.75% (D) tras ser incubados con *S. warneri* durante 24 horas. Se muestra detalle posible *S. warneri* para el gel A. Las cabezas de flecha blancas indican posibles agrupaciones de proteína globular de yema de huevo y las rojas posibles células correspondientes a *S. warneri*.

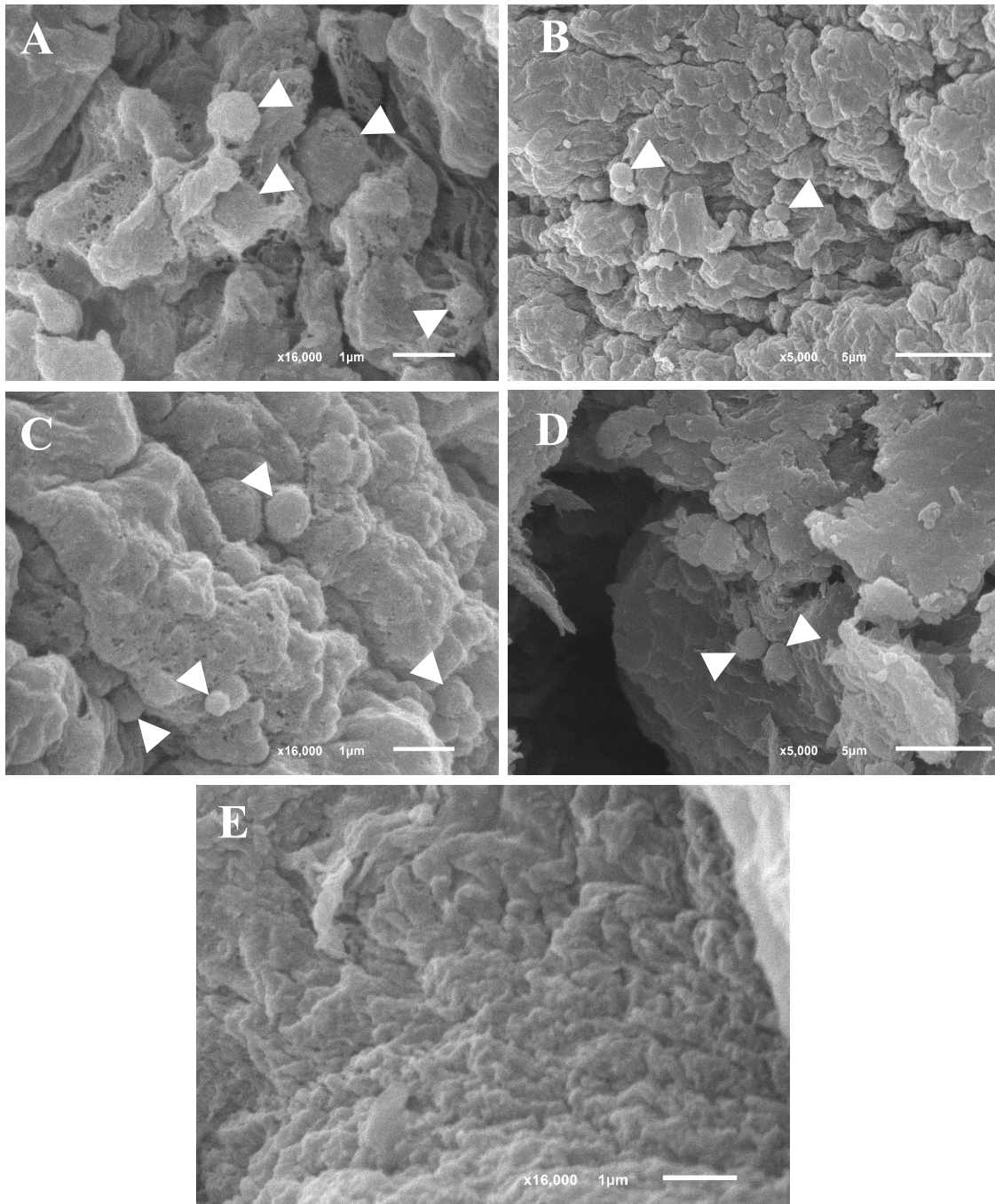


Figura 38. Imagen al microscopio electrónico de barrido de la superficie de geles de yema de huevo/ κ -carragenato al 1% (A), 1.25% (B), 1.5% (C) y 1.75% (D) sin inocular a *S. warneri*. También se muestra una imagen de κ -carragenato al 1.5% sin yema (E) y sin inocular. Cabezas de flecha blancas señalan estructuras globulares correspondientes a la yema de huevo.

En todos los geles se observa la presencia de unas estructuras esféricas de tamaño variable. En un principio cabría pensar que las esferas con un diámetro entre 1 y 2 μm se corresponden con *S. warneri*. Sin embargo, según se indica en otros trabajos, estas estructuras también se pueden formar debido a las proteínas globulares presentes en la yema de huevo (Aguilar *et al.*, 2017; Laca *et al.*, 2010; Valverde *et al.*, 2016). Por esta razón, se analizó la estructura de geles sin inocular a *S. warneri*, donde se observaron las mismas estructuras globulares (ver **Figura 38**).

Se cree que estos agregados se forman debido a las interacciones electrostáticas que tienen lugar entre las proteínas de la yema y el κ -carragenato, que contribuirían al atrapamiento de estos agregados proteicos en la red del polisacárido (Aguilar *et al.*, 2017). En el caso de aquellas partículas esféricas de tamaño superior a 2 μm está claro que se corresponden con proteínas globulares de la yema, mientras que aquellas en torno a dicho tamaño podrían corresponderse tanto con *S. warneri* como con yema. Por lo tanto, sería necesario realizar pruebas complementarias para comprobar de que se trata en cada caso particular.

Otro aspecto a tener en cuenta es que a medida que se incrementa la concentración de κ -carragenato se observa que la matriz del polímero con la yema presenta un aspecto más “compacto”, encontrándose grandes diferencias para la concentración de κ -carragenato de 1.5% y 1.75% con respecto a las concentraciones inferiores. Esto concuerda con los resultados obtenidos para la fuerza “Bloom” (ver apartado 4.1.2). Además, se observan numerosas cavidades las cuales podrían secuestrar aire durante el proceso de preparado del gel y contribuir a la disponibilidad de oxígeno para los microorganismos inóculados. Las posibles células se encuentran rodeadas por la matriz de gel como se puede observar en la **Figura 37. (A)**.

4.2. Crecimiento de *Staphylococcus warneri*

En un trabajo previo (Sanchez *et al.*, 2019) en el que se estudió el desarrollo de *S. warneri* en alimentos modelo preparados con clara y yema de huevo, así como con el huevo completo, se observó que el mayor crecimiento se obtenía en medio líquido de yema a 25°C y 250 rpm, alcanzando concentración al cabo de 24 horas del orden de 10^8 UFC/mL. Teniendo en cuenta el riesgo que suponen los alimentos que tienen yema para el desarrollo de contaminación microbiana, en el presente trabajo se analizó el

crecimiento de *S. warneri* en seis geles empleados como alimento modelo y elaborados con yema y κ -carragenato, tal y como se describe en el apartado 3.2.1., e incubados a temperatura ambiente (25°C). A partir de los resultados obtenidos de los recuentos en placa para todas las muestras de yema de huevo/ κ -carragenato se obtuvo una curva de crecimiento del microorganismo en cada medio (ver **Figura 39**).

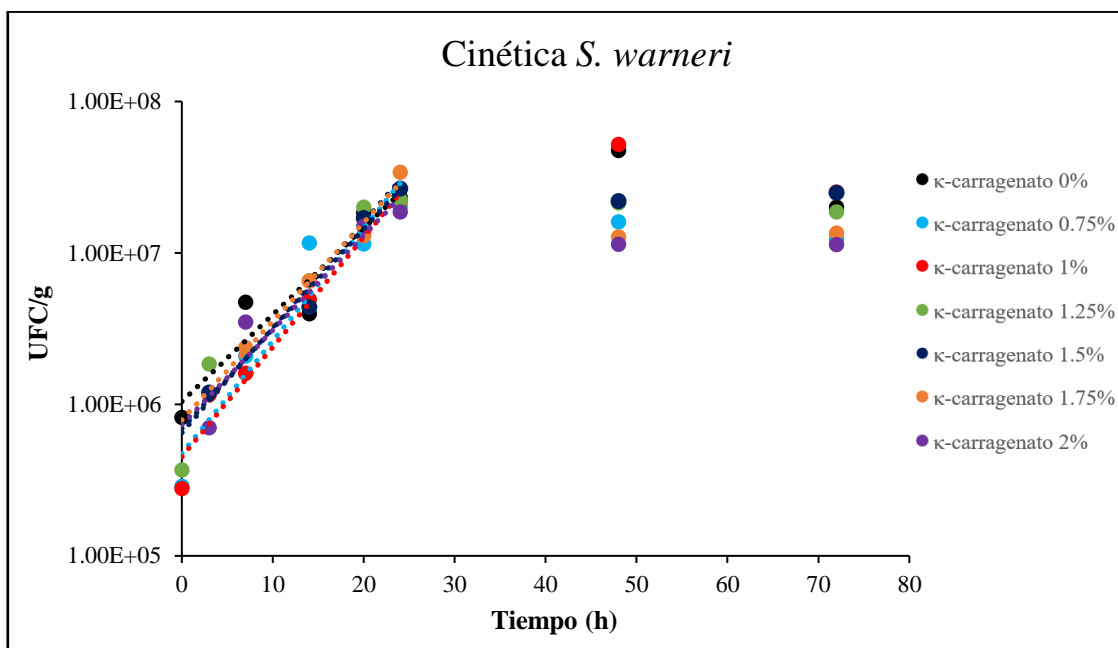


Figura 39. Curva de crecimiento de *S. warneri* donde se representan las UFC/g en escala logarítmica frente al tiempo para los siete medios de yema de huevo/ κ -carragenato. Los datos se corresponden con valores medios de triplicados. En línea discontinua se muestran los resultados del ajuste para los valores de μ_{max} recogidos en la **Tabla 6**.

La **Figura 39** muestra que en todos los casos el microorganismo alcanza la fase estacionaria a las 24 horas aproximadamente, donde se alcanza una concentración celular del orden de 10^7 UFC/g (UFC/mL en el caso del medio sin κ -carragenato). En el estudio de Sanchez *et al.*, 2019 antes mencionado, *S. warneri* inoculado en medio líquido de yema al 10% (v/v) alcanzaba una concentración celular similar trascurridas unas 24 horas, observándose presencia de fase lag. Sin embargo, como muestra la **Figura 39**, no hay fase lag en ninguno de los sistemas ensayados. Esto probablemente sea debido a que, en este trabajo, el preinóculo se ha realizado en un medio con la misma composición, por lo que el microorganismo se encontraría ya totalmente adaptado, a diferencia de los resultados obtenidos por Sanchez *et al.*, 2019, donde el microorganismo era incubado a partir de un medio distinto (*Nutrient Broth*). Como se puede observar, las diferencias entre medios,

tanto en la velocidad de crecimiento del microorganismo como en la concentración máxima alcanzada, son pequeñas.

Con el fin de poder comparar las curvas de crecimiento de una manera cuantitativa se obtuvieron los valores de la velocidad de crecimiento máxima específica. Para ello, la fase de crecimiento exponencial se ajustó a una ecuación cinética de primer orden: $\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \cdot X$, donde X se corresponde con el número de células en UFC/g (UFC/mL en el caso del medio sin κ -carragenato) y μ_{max} es la tasa de crecimiento máximo específico del microorganismo. Tras integrar la ecuación cinética anterior se obtiene la expresión: $\ln X = \ln X_0 + \mu_{max} \cdot t$, donde X_0 se corresponde con el número de células en UFC/g (o UFC/mL) en el tiempo inicial. Al representar el $\ln X$ frente al tiempo (t) se obtiene una recta cuya pendiente se corresponde con μ_{max} y la ordenada en el origen con el $\ln X_0$. En la **Figura 40** se muestra como ejemplo esta recta en el ajuste realizado para el gel yema de huevo/ κ -carragenato al 1% (p/v), que se realizó de la misma forma para todos los geles, así como para el medio líquido. De esta manera se obtuvieron los valores de μ_{max} recogidos en la **Tabla 6**. En la **Figura 39** se muestran las rectas de ajuste.

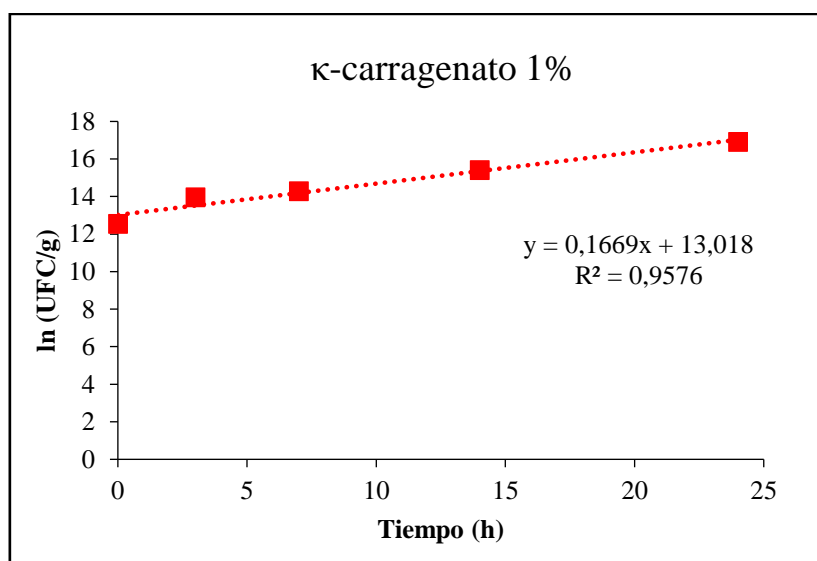


Figura 40. Representación de \ln (UFC/g) frente al tiempo para el gel de yema de huevo/ κ -carragenato del 1% (p/v) según el ajuste de la ecuación de primer orden indicada en el texto. Los datos de recuento UFC/g son medias de triplicados en la fase exponencial de crecimiento.

Tabla 6. Datos de μ_{max} obtenidos a partir del ajuste de los datos de crecimiento en la fase exponencial a la ecuación cinética de primer orden indicada en el texto.

κ -carragenato (%)	μ_{max} (h ⁻¹)	r ²
0	0.1320	0.901
0.75	0.1712	0.905
1	0.1669	0.958
1.25	0.1601	0.935
1.5	0.1519	0.981
1.75	0.1501	0.981
2	0.1440	0.913

Aunque como era de esperar, los valores obtenidos de μ_{max} son todos del mismo orden sin que existan grandes diferencias, se puede realizar algunas observaciones. En primer lugar, se puede ver que la presencia del κ -carragenato mejora el crecimiento de *S. warneri*, ya que en todos los casos μ_{max} es mayor en medio sólido que en líquido. Sanchez *et al.* 2019 describió valores de μ_{max} en medio líquido de huevo superiores a los obtenidos en medio sólido para una temperatura de incubación similar, si bien hay que destacar que se trataba de un medio sólido que simulaba una tortilla de patatas muy distinto al gel aquí analizado. De la misma forma, Aspridou *et al.*, 2014 encontró que *Listeria monocytogenes* crecía mejor en medio líquido que en geles de gelatina y alginato. Asimismo, Verheyen *et al.* (2018) encontró para el mismo microorganismo un mayor crecimiento en medio líquido que en geles (un gel acuoso y emulsión de gel). Sin embargo, cabe destacar que este mismo autor observó un crecimiento mayor de *L. monocytogenes* en un medio suplementado con goma de Xanthana que en medio líquido. Sin embargo, el crecimiento en cada sistema a 4°C era similar. Las razones que da este autor para estas diferencias son la diferente disponibilidad de oxígeno en cada sistema, ya que la incubación se hizo en condiciones estáticas en ambos casos. Las diferencias observadas en el presente trabajo entre los valores de μ_{max} obtenidos para medio líquido y sólido podrían deberse a que, durante el proceso de preparación del gel, se agita con fuerza la disolución para mezclar los componentes, lo que favorece la entrada de aire en el interior. Como tras agitar la mezcla ésta se solidifica rápido, podría ocurrir que el aire quedase secuestrado en el interior del gel, lo que se confirma por la presencia de cavidades

en la estructura observadas por SEM (apartado 4.1.3). De esta forma, el microorganismo tendría mayor disponibilidad de oxígeno en los sistemas con presencia de κ -carragenato que en medio líquido, ya que, al ser incubado en reposo, los componentes de la yema se separan en fases; observándose claramente una fase superior de naturaleza lipoproteica que dificultaría la difusión de oxígeno desde la superficie a las capas inferiores del sistema. *S. warneri* es un microorganismo aerobio facultativo que crece mejor en presencia de oxígeno (Sanchez *et al.* 2019), por lo que la escasa disponibilidad de oxígeno en el medio líquido podría explicar la menor tasa de crecimiento específico observada. En estudios anteriores (Hooijmans *et al.* 1990, Noriega *et al.* 2008, Verheyen *et al.* 2018), se destacó la importancia de la difusión de oxígeno y nutrientes en sistemas sólidos y su relación con el crecimiento microbiano. Concretamente, Hooijmans *et al.* (1990) evaluó los perfiles de oxígeno a lo largo de dos geometrías diferentes de geles de κ -carragenato y como esto influía en la μ_{max} de *E. coli*. Lo que vio es que se producía una difusión de oxígeno desde la superficie del gel hacia el interior y, a medida que avanzaba el tiempo, la profundidad a la que llegaba el oxígeno en el gel disminuía hasta alcanzar los 100 μm de profundidad, donde se estabilizaba. Según el autor, el establecimiento de estos perfiles de oxígeno se relacionaba con el crecimiento *E. coli*. Además, recalcó influencia de la geometría y concentración del gel en esta difusión del oxígeno.

La siguiente observación que se puede extraer de los valores de μ_{max} recogidos en la **Tabla 6** es que existe un ligero descenso en la velocidad de crecimiento del microorganismo al incrementarse la concentración de κ -carragenato. De hecho, como se muestra en la **Figura 41**, existe una relación lineal inversamente proporcional entre los valores de μ_{max} y la concentración de κ -carragenato ($r^2=0.9817$). Este resultado podría deberse a que las restricciones mecánicas que ofrece el polímero dificulten ligeramente el crecimiento de *S. warneri* ya que, como se mencionó en el apartado 3.1.2., se asume que el microorganismo únicamente se nutre de los componentes de la yema de huevo, que pueden presentar conformaciones distintas a través de la estructura del gel. Como se ha visto en el apartado 4.1.3, las posibles células se encuentran rodeadas por una matriz de κ -carragenato, que se vuelve mucho más compacta al aumentar la concentración del polímero, lo que podría indicar un mayor estrés mecánico para el microorganismo que se relacionaría con el descenso en los valores de μ_{max} observados. Además, es necesario tener en cuenta que el propio entorno del microorganismo puede modificar su capacidad para desarrollarse (Noriega *et al.*, 2010). Aunque en este caso se ha observado una

relación lineal entre μ_{max} y la concentración de κ -carragenato, en la bibliografía se han encontrado otros trabajos donde no lo es. Antwi *et al.* (2006) vio que al aumentar la concentración de gelatina hasta un determinado valor los valores de μ_{max} en *Listeria innocua* disminuían, aunque a concentraciones superiores se mantenía estable hasta alcanzar una determinada concentración donde disminuía de nuevo. Este mismo resultado también se observó en un trabajo de Bracklehurst *et al.* (1997) para *Salmonella typhimurium*. Sin embargo, Aspidou *et al.* (2014), encontró una relación lineal entre la concentración de gelatina y el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. De manera similar a la observado en este trabajo, parece claro que el tipo de comportamiento depende de diversas variables que interfieren entre si tales como el tipo de microorganismo y la composición y estructura del medio.

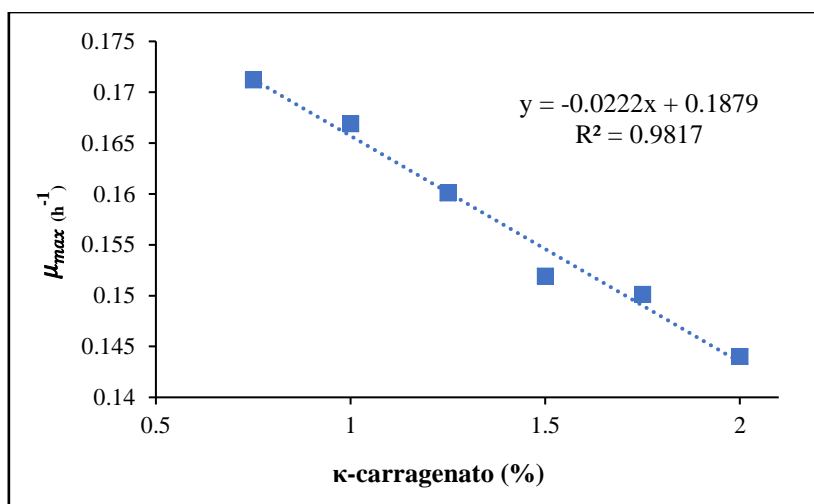


Figura 41. Ajuste lineal entre la concentración de κ -carragenato frente a μ_{max} para los seis geles de yema de huevo/ κ - carragenato.

4.3. Análisis del efecto de la estructura de la matriz alimentaria sobre el crecimiento de *S. warneri*

En un estudio anterior se evaluó el efecto de la microestructura de un alimento en el desarrollo de *Listeria monocytogenes* (Aspidou *et al.*, 2014). En dicho estudio se menciona como la microestructura de un alimento puede influir en el crecimiento microbiano, mediante una limitación en la difusión de nutrientes o la bajada de pH por acumulación de determinados metabolitos, lo que unido a la microestructura del alimento dará lugar a entornos diferentes que pueden influir significativamente sobre la capacidad

para desarrollarse de los microorganismos. En este trabajo, el empleo de geles con distintas concentraciones de κ -carragenato pero con la misma composición nutricional (yema de huevo) ha permitido evaluar el efecto de la estructura sobre el crecimiento. Como se ha comentado en el apartado anterior, se ha observado una dependencia entre los valores de μ_{max} y la concentración de κ -carragenato. Distintas concentraciones de κ -carragenato propician geles con distintas propiedades reológicas y estructurales, luego es lógico pensar en la existencia de una dependencia de la velocidad de crecimiento en función de los parámetros que describen estas propiedades. Así, se analizó la relación entre el módulo G' y la fuerza "Bloom" del gel con el crecimiento de *S. warneri* para los seis geles de yema de huevo/ κ -carragenato. Los resultados se muestran en la **Figura 42** y **Figura 43** respectivamente. De la misma forma a la observada por Aspidou *et al.* (2014) para *L. monocitogenes*, se encontró una relación inversamente proporcional entre el módulo G' y μ_{max} ($r^2=0.9944$), ver **Figura 42**. Además, se observó también una relación lineal inversa para la fuerza "Bloom" y la velocidad de crecimiento de *S. warneri* ($r^2=0.9448$), ver **Figura 43**. Se observa por tanto que la velocidad de crecimiento se reduce a medida que aumenta la elasticidad y la firmeza de los geles, lo que coincide con una mayor concentración de κ -carragenato. Este comportamiento podría estar relacionado con las restricciones mecánicas que ofrece el κ -carragenato en presencia de yema al crecimiento del microorganismo, de tal manera que la estructura del sistema podría ofrecer un estrés adicional que haga que el microorganismo no sea capaz de destinar la misma energía para la multiplicación celular a concentraciones de κ -carragenato mayores. Sin embargo, se deberían considerar otros factores que también influyen, como la difusión del oxígeno comentada anteriormente, el pH, la temperatura o la acumulación de metabolitos. Varios autores han indicado que la temperatura puede tener un efecto sinérgico en disminuir el crecimiento celular junto con las restricciones mecánicas de un alimento estructurado (Robins & Wilson 1994; Wilson *et al.* 2002; Aspidou *et al.* 2014). A la vista de los resultados, resultaría interesante profundizar en la influencia de estos parámetros en el crecimiento de microorganismos patógenos en este y otros sistemas estructurados.

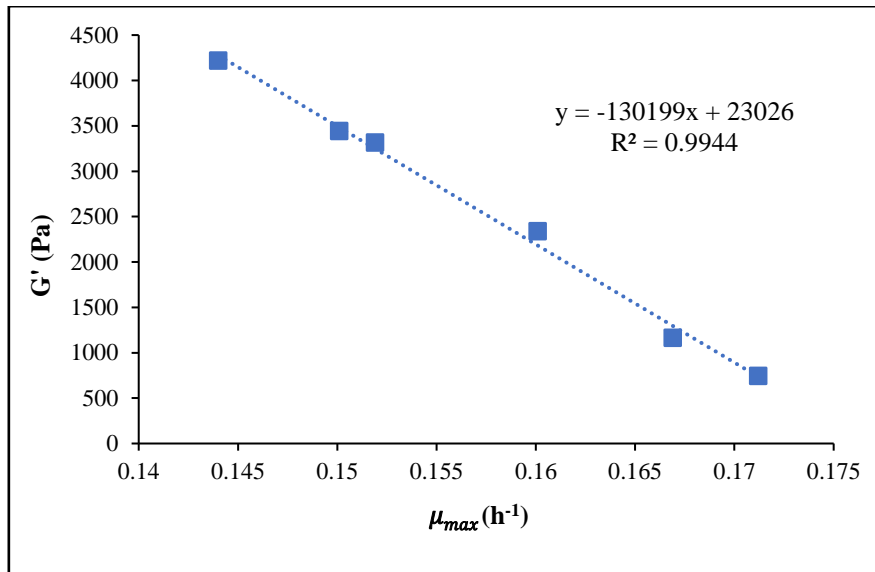


Figura 42. Relación lineal entre la μ_{max} obtenida del recuento del microorganismo frente al módulo elástico (G') obtenido de los ensayos de reometría

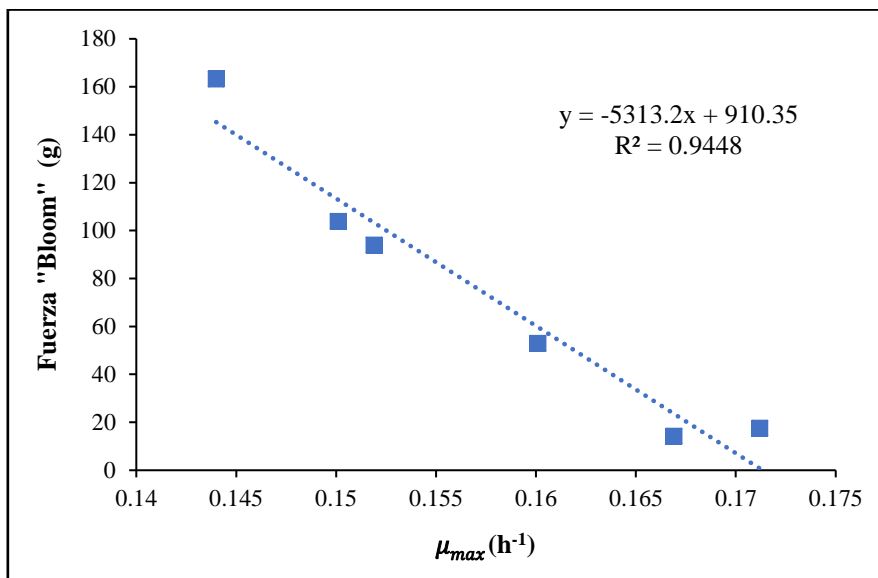


Figura 43. Relación lineal entre la μ_{max} obtenida del recuento del microorganismo frente a la fuerza "Bloom" obtenida en los ensayos de texturometría

5. CONCLUSIONES

1. Los ensayos reológicos muestran que el incremento de la concentración de κ -carragenato aumenta el carácter pseudoplástico del sistema alimentario ($n < 1$), el punto de coagulación de los geles, así como el valor del módulo elástico y la fuerza de interacción entre las unidades reológicas de la red tridimensional (A). Los valores de $\tan \delta$ revelan un comportamiento de gel “débil” ($\tan \delta > 0.1$) para concentraciones de κ -carragenato inferiores a 1.5%, mientras que por encima de dicha concentración se comportan como gel verdadero ($\tan \delta < 0.1$).
2. El ensayo de textura muestra que a medida que se incrementa la concentración de κ -carragenato también lo hace la dureza de los geles (fuerza “Bloom”). Esto es corroborado por las imágenes al SEM, ya que se observa una estructura más compacta para los geles con mayores concentraciones de κ -carragenato.
3. La presencia de κ -carragenato mejora el desarrollo de *S. warneri* en comparación con el medio líquido. Esto posiblemente es debido a una mayor disponibilidad de oxígeno en el medio sólido que quedaría atrapado en las cavidades observadas en la microestructura de los geles, mientras que en el medio líquido esta disponibilidad de oxígeno puede verse comprometida debido a la formación de fases, al separarse los componentes de la yema, generadas por las condiciones estáticas de incubación. Sin embargo, el incremento de la concentración del polímero reduce ligeramente la velocidad específica de crecimiento de la bacteria, lo que probablemente se deba a las restricciones mecánicas que ofrece la estructura del gel al desarrollo del microorganismo.
4. Existe una relación lineal inversamente proporcional entre el módulo elástico y la fuerza “Bloom” con los valores de μ_{max} . Esto refleja que un incremento en las restricciones mecánicas del medio sólido, junto con otros factores, reduce la velocidad específica de crecimiento de *S. warneri*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abín, R., Laca, A., Laca, A., & Díaz, M. (2018). Environmental assessment of intensive egg production: A Spanish case study. *Journal of Cleaner Production*, *179*, 160–168.
- Agoda-Tandjawa, G., Le Garnec, C., Boulenguer, P., Gilles, M., & Langendorff, V. (2017). Rheological behavior of starch/carrageenan/milk proteins mixed systems: Role of each biopolymer type and chemical characteristics. *Food Hydrocolloids*, *73*, 300–312.
- Aguilar, J. M., Batista, A. P., Nunes, M. C., Cordobés, F., Raymundo, A., & Guerrero, A. (2011). From egg yolk/ κ -Carrageenan dispersions to gel systems: Linear viscoelasticity and texture analysis. *Food Hydrocolloids*, *25*(4), 654–658.
- Aguilar, J. M., Cordobés, F., Raymundo, A., & Guerrero, A. (2017). Thermal gelation of mixed egg yolk/kappa-carrageenan dispersions. *Carbohydrate Polymers*, *161*, 172–180.
- Alarzon P.M. (2018). Viabilidad y desarrollo de *Staphylococcus* en diferentes alimentos que contienen huevo. Trabajo fin de máster.
- Antwi, M., Geeraerd, A. H., Vereecken, K. M., Jenné, R., Bernaerts, K., & Van Impe, J. F. (2006). Influence of a gel microstructure as modified by gelatin concentration on *Listeria innocua* growth. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *7* (1–2), 124–131.
- Arana, I. (2012). Physical Properties of Foods: Novel Measurement Techniques and Applications. CRC Press.
- Aspidou, Z., Moschakis, T., Biliaderis, C. G., & Koutsoumanis, K. P. (2014). Effect of the substrate's microstructure on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Research International*, *64*, 683–691.
- Belitz, Hans-Dieter et al. (2008). Eggs. Food Chemistry. 546-561

- Bhaskar, S. V. (2017). *Chapter 1 - Foodborne diseases—disease burden. Food Safety in the 21st Century*. Elsevier Inc.
- Brocklehurst, T. F., Mitchell, G. A., & Smith, A. C. (1997). A model experimental gel surface for the growth of bacteria on foods. *Food Microbiology*, 14(4), 303–311.
- Callon, C., Retureau, E., Didienne, R., & Montel, M. C. (2014). Microbial biodiversity in cheese consortia and comparative *Listeria* growth on surfaces of uncooked pressed cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 98–109.
- Chauhan, P. S., & Saxena, A. (2016). Bacterial carrageenases: an overview of production and biotechnological applications. *3 Biotech*, 6 (2), 1–18.
- Chemaly, M., & Salvat, G. (2011). *Foodborne disease associated with eggs: Microbial hazards and Salmonella Enteritidis risk assessment. Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products* (Vol. 2). Woodhead Publishing Limited.
- Chen, J., Chen, W., Duan, F., Tang, Q., Li, X., Zeng, L., ... Gao, H. (2019). The synergistic gelation of okra polysaccharides with kappa-carrageenan and its influence on gel rheology, texture behaviour and microstructures. *Food Hydrocolloids*, 87, 425–435.
- Costello, K. M., Gutierrez-Merino, J., Bussemaker, M., Ramaioli, M., Baka, M., Van Impe, J. F., & Velliou, E. G. (2018). Modelling the microbial dynamics and antimicrobial resistance development of *Listeria* in viscoelastic food model systems of various structural complexities. *International Journal of Food Microbiology*, 286, 15–30.
- CPKelco. (2001). GENU® Carrageenan Book, 4–23.
- Danyluk, M. D., Friedrich, L. M., Dunn, L. L., Zhang, J., & Ritenour, M. A. (2019). Reduction of *Escherichia coli*, as a surrogate for *Salmonella* spp., on the surface of grapefruit during various packingline processes. *Food Microbiology*, 78, 188–193.
- Day, L., & Golding, M. (2016). *Food Structure, Rheology, and Texture. Encyclopedia of Food Chemistry*. Elsevier.

- Derkach, S. R., Ilyin, S. O., Maklakova, A. A., Kulichikhin, V. G., & Malkin, A. Y. (2015). The rheology of gelatin hydrogels modified by κ -carrageenan. *LWT - Food Science and Technology*, 63 (1), 612–619.
- Diañez, I., Gallegos, C., Brito-de la Fuente, E., Martínez, I., Valencia, C., Sánchez, M. C., ... Franco, J. M. (2019). 3D printing in situ gelification of κ -carrageenan solutions: Effect of printing variables on the rheological response. *Food Hydrocolloids*, 87, 321–330.
- Dos Santos, A. (2007). Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. *Universidad Autonoma de Barcelona*, 1–282.
- Doyle P. M. & Beuchat R. L. (2007). *Food Microbiology*. Center for Food Safety, University of Georgia. ASM PRESS.
- Fang, T., & Huang, L. (2014). Growth and survival kinetics of *Listeria monocytogenes* in cooked egg whites. *Food Control*, 36(1), 191–198.
- Food Drug Administration (FDA) (Junio, 2019). www.fda.gov.
- Gabrielle, D., Cindio, B. & D'Antona, P. (2001). A weak gel model for foods. *Rheol Acta*, 40, 120-127.
- Gallegos C., & Franco J.M. (1999). Rheology of food and emulsions. *Rheology series*. 8, 78-118.
- Gross, S., Johne, A., Adolphs, J., Schlichting, D., Stingl, K., Müller-Graf, C., ... Käsbohrer, A. (2015). Salmonella in table eggs from farm to retail - When is cooling required? *Food Control*, 47, 254–263.
- Hariram, U., & Labbé, R. G. (2016). Growth and inhibition by spices of growth from spores of enterotoxigenic *Bacillus cereus* in cooked rice. *Food Control*, 64, 60–64.
- Hartman, G. (2012). *Bad Bug Book Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Introduction*. *Book*, 1, 259.

- Hennekinne, J. A., De Buyser, M. L., & Dragacci, S. (2012). Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 815–836.
- Hooijmans, C. M., Briasco, C. A., Huang, J., Geraats, B. G. M., Barbotin, J. N., Thomas, D., & Luyben, K. C. A. M. (1990). Measurement of oxygen concentration gradients in gel-immobilized recombinant Escherichia coli. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 33(6), 611–618.
- Hwang, D., White, E., Purohit, A., Mohan, A., & Mishra, A. (2019). Survival of Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes in an acidified low-fat mayonnaise based hibachi sauce. *Lwt*, 108, 297–300.
- Ikeda, S., & Nishinari, K. (2001). “Weak gel”-type rheological properties of aqueous dispersions of nonaggregated κ -carrageenan helices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4436–4441.
- Instituto Estudios del Huevo (IEH) (2009). El gran libro del huevo. Madrid, Ed. EVEREST.
- Instituto Estudios del Huevo (IEH) (junio, 2019). www.institutohuevo.com.
- Joyner, H. S. (2018). Explaining food texture through rheology. *Current Opinion in Food Science*, 21, 7–14.
- Juneja, V. K., Golden, C. E., Mishra, A., Harrison, M. A., Mohr, T., & Silverman, M. (2019). Predictive model for growth of Bacillus cereus during cooling of cooked rice. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 49–58.
- Kadariya, J., Smith, T. C., & Thapaliya, D. (2014). Staphylococcus aureus and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *BioMed Research International*, 2014.
- Laca, A., Paredes, B., & Díaz, M. (2010). A method of egg yolk fractionation. Characterization of fractions. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 434–443.

- Le, X. T., Rioux, L. E., & Turgeon, S. L. (2017). Formation and functional properties of protein–polysaccharide electrostatic hydrogels in comparison to protein or polysaccharide hydrogels. *Advances in Colloid and Interface Science*, 239, 127–135.
- Liu, Y. C., Chen, T. H., Wu, Y. C., Lee, Y. C., & Tan, F. J. (2016). Effects of egg washing and storage temperature on the quality of eggshell cuticle and eggs. *Food Chemistry*, 211, 687–693.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock biology of microorganisms* (14^a edición). Boston: Pearson.
- Mancini, F., Montanari, L., Peressini, D., & Fantozzi, P. (2002). Influence of alginate concentration and molecular weight on functional properties of mayonnaise. *LWT - Food Science and Technology*, 35(6), 517–525.
- Manuhara, G.J., Praseptianga, D. & Riyanto R. A. (2016). Extraction and characterization of refined k-carrageenan of red algae [*Kappaphycus alvarezii* (Doty ex P.C. Silva, 1996)] Originated from Karimun Jawa Islands. *Aquatic Procedia*. 7, 106-111.
- Noriega, E., Laca, A., & Díaz, M. (2008). Modelling of diffusion-limited growth to predict *Listeria* distribution in structured model foods. *Journal of Food Engineering*, 87(2), 247–256.
- Noriega, E., Laca, A., & Díaz, M. (2010). Development of a structure-based model for the competitive growth of *Listeria innocua* in minced chicken breasts. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1–2), 44–52.
- Núñez-Santiago, M. del C., & Tecante, A. (2007). Rheological and calorimetric study of the sol-gel transition of κ -carrageenan. *Carbohydrate Polymers*, 69(4), 763–773.
- Organización mundial de la salud (OMS) (2007). Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos.
- Organización mundial de la salud (OMS) (junio, 2019). www.who.int.

- Raspoet, R., Gantois, I., Devloo, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. (2011). *Internal contamination of eggs by Salmonella Enteritidis. Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products* (Vol. 2). Woodhead Publishing Limited.
- Redemann, M. A., Brar, J., Niebuhr, S. E., Lucia, L. M., Acuff, G. R., Dickson, J. S., & Singh, M. (2018). Evaluation of thermal process lethality for non-pathogenic *Escherichia coli* as a surrogate for *Salmonella* in ground beef. *LWT - Food Science and Technology*, *90*, 290–296.
- Rivoal, K., Fablet, A., Courtillon, C., Bougeard, S., Chemaly, M., & Protais, J. (2013). Detection of *Listeria* spp. in liquid egg products and in the egg breaking plants environment and tracking of *Listeria monocytogenes* by PFGE. *International Journal of Food Microbiology*, *166*(1), 109–116.
- Robins, M. M., & Wilson, P. D. G. (1994). Food structure and microbial-growth. *Trends in Food Science & Technology*, *5*(9), 289–293.
- Saha, D., & Bhattacharya, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: A critical review. *Journal of Food Science and Technology*, *47*(6), 587–597.
- Samiullah, Chousalkar, K. K., Roberts, J. R., Sexton, M., May, D., & Kiermeier, A. (2013). Effects of egg shell quality and washing on *Salmonella* *Infantis* penetration. *International Journal of Food Microbiology*, *165*(2), 77–83.
- Sánchez, M., Neira, C., Laca, A., Laca, A., & Díaz, M. (2019). Survival and development of *Staphylococcus* in egg products. *Lwt*, *101*, 685–693.
- Schramm, G. (2004). *A practical approach to Rheology and Rheometry*.
- Sinclair R.G., Rose J.B., Hasham S.A., Gerba, C.P., Haas, C.N. (2012). Criteria for selection of surrogates used to study the fate and control of pathogens in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 1969-1977.
- Steffee, J.F. (1996). *Rheological methods in food processing*. Freeman Press, East Lansing, MI (USA).

- Szczesniak, A.S. (2002). Texture is a sensory property. *Food Quality and Preference*, 13 (4): 215- 225.
- Taylor, R. H., Dunn, M. L., Ogden, L. V., Jefferies, L. K., Eggett, D. L., & Steele, F. M. (2013). Conditions associated with *Clostridium sporogenes* growth as a surrogate for *Clostridium botulinum* in nonthermally processed canned butter. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 2754–2764.
- Theys, T. E., Geeraerd, A. H., Verhulst, A., Poot, K., Van Bree, I., Devlieghere, F., ... Van Impe, J. F. (2008). Effect of pH, water activity and gel micro-structure, including oxygen profiles and rheological characterization, on the growth kinetics of *Salmonella Typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 128(1), 67–77.
- Thompson, S., Miller, K., López, A., & Camu N. (2013). *Cocoa and Coffee Food Microbiology. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers Food*.
- Tunick, M.H. (2011). Food Texture Analysis in the 21st Century. *J. Agric. Food Chem.* 59, 1477–1480.
- Turquois, T., Rochas, C., & Taravel, F. R. (1992). Rheological studies of synergistic kappa carrageenan-carob galactomannan gels. *Carbohydrate Polymers*, 17(4), 263–268.
- Valverde, D., Laca, A., Estrada, L. N., Paredes, B., Rendueles, M., & Díaz, M. (2016). Egg yolk and egg yolk fractions as key ingredient for the development of a new type of gels. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 3, 30–37.
- Verheyen, D., Bolívar, A., Pérez-Rodríguez, F., Baka, M., Skåra, T., & Van Impe, J. F. (2018). Effect of food microstructure on growth dynamics of *Listeria monocytogenes* in fish-based model systems. *International Journal of Food Microbiology*, 283, 7–13.
- Wilson, P. D. G., Brocklehurst, T. F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J. W. T., & Van Impe, J. F. (2002). Modelling microbial

- growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology*, 73(2–3), 275–289.
- Winter, H. H., & Chambon, F. (1986). Analysis of Linear Viscoelasticity of a Crosslinking Polymer at the Gel Point. *Journal of Rheology*, 30(2), 367–382.
- Yang, S. E., Yu, R. C., & Chou, C. C. (2001). Influence of holding temperature on the growth and survival of *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* and the production of staphylococcal enterotoxin in egg products. *International Journal of Food Microbiology*, 63(1–2), 99–107.
- Yang, Z., Yang, H., & Yang, H. (2018). Effects of sucrose addition on the rheology and microstructure of κ -carrageenan gel. *Food Hydrocolloids*, 75, 164–173.
- Zhang, M., Li, J., Chang, C., Wang, C., Li, X., Su, Y., & Yang, Y. (2019). Effect of egg yolk on the textural, rheology and structural properties of egg gels. *Journal of Food Engineering*, 246, 1–6.
- Zhou, M., Hu, Q., Wang, T., Xue, J., & Luo, Y. (2016). Effects of different polysaccharides on the formation of egg yolk LDL complex nanogels for nutrient delivery. *Carbohydrate Polymers*, 153, 336–344.