

Supervisión de la degradación de ovoproducto mediante diodos emisores de luz.

Correa Hernando, E.C.^{1,2}(P), Diaz-Barcos, V.¹, Barreiro Elorza, P.^{2,3}, González Chamorro, M.C.⁴ Fuentes-Pila Estrada, J⁵

Resumen

La extrema sensibilidad de los ovoproductos al deterioro microbiano hace necesaria la aplicación de un tratamiento térmico que asegure su inocuidad. El hecho de que el tratamiento térmico no asegure la completa erradicación de la flora microbiana junto con la falta de mantenimiento de la cadena de frío a lo largo de la distribución y/o conservación del mismo limita y acorta la vida útil del producto. La degradación microbiana del ovoproducto afecta a ciertas propiedades físicas del mismo cuya alteración puede ser objeto de supervisión mediante técnicas ópticas siendo el objetivo de este trabajo la realización de un estudio preliminar para la supervisión de la degradación de ovoproducto mediante LED con el objeto de hacer una propuesta de implantación en laboratorios de calidad en la industria. Los resultados muestran que en clara líquida pasteurizada el aumento del contenido microbiano a lo largo del tiempo de almacenamiento se correlaciona (con valores de hasta $r = 0.97$) con el incremento en el nivel de intensidad lumínica detectado en las muestras. En la yema a partir de niveles altos de concentración de microorganismos los fenómenos de turbidez y gelificación se identifican con una disminución en los valores de los parámetros ópticos considerados.

Heat-treatment of ovoproducts is often required to ensure microbial safety. However, it has been shown that in most microbial species slow heating, or heat shocks may induce a higher heat resistance, that means that it is not possible to remove the microbial flora completely. These microorganisms produce ovoproducts spoilage especially when the cold chain is broken along the transport and/or storage. As result, the useful life for the product is shorten. The microbial activity in the product changes several physical properties which can be supervised using optical methods, so the goal of this work is to carry out a prospective study for the supervision of ovoproduct spoilage with scatter red LED light. For liquid and pasteurized white egg it has been found a correlation ($r=0.97$) between microorganism growth and grey level of LED light passing through the sample. In the case of yolk when the number of microorganisms reaches a very high level is detected an increase of the turbidity and coagulation of the sample and in the same way a decrease of the values corresponding to the optical parameters studied is registered.

Palabras Clave: Huevo líquido (liquid egg), pasteurización (pasteurization), diodo emisor de luz (light emitter diodes) degradación microbiana (microbial spoilage), dispersión (scattering).

1. INTRODUCCIÓN

La extrema sensibilidad de los ovoproductos al deterioro microbiano hace necesaria la aplicación de un tratamiento térmico que asegure su inocuidad. El tratamiento de pasteurización para la producción industrial de huevo entero, clara o yema líquidos consiste en un calentamiento a temperaturas entre 57 y 70°C durante un periodo de tiempo que oscila desde unos pocos segundos hasta 10 minutos, en función del equipo de pasteurización empleado, de la temperatura del tratamiento y del producto a pasteurizar. El tratamiento se diseña para inactivar microorganismos patógenos como Salmonella, sin dañar en la medida de lo posible ni las propiedades físico-químicas del ovoproducto ni las propiedades funcionales. Sin embargo dicho tratamiento no asegura la completa erradicación de la flora microbiana del producto (Guilmineau y Kulozik, 2007). Se ha descrito que tanto los calentamientos lentos como los choques térmicos (calentamientos a temperaturas elevadas durante un corto periodo de tiempo) favorecen

¹ Dpto. de Ciencia y Tecnología Aplicada (EUIT Agrícola, Universidad Politécnica de Madrid (UPM)). evacristina.correa@upm.es.

² Laboratorio de Propiedades Físicas y Técnicas Avanzadas en Agroalimentación

³ Dpto. de Ingeniería Rural (ETSI Agrónomos, UPM)

⁴ Dpto. de Tecnología de los Alimentos (ETSI Agrónomos, UPM)

⁵ Dpto. de Estadística y Métodos de Gestión Agraria (EUIT Agrícola, UPM)

la aparición de termorresistencia en algunos de los microorganismos (Mañas *et al.* 2003), que constituyen la flora alterante que limita la vida útil del producto.

El ovoproducto líquido pasteurizado para su correcta conservación requiere almacenamiento en condiciones de refrigeración a una temperatura máxima de 4°C, (Guilmineau y Kulozik, 2007) aunque los fabricantes recomiendan como temperatura óptima 2°C. Por ello, según las recomendaciones de la Agencia Española de Codificación Comercial para la Logística, este producto se clasifica como alimento refrigerado de Tipo 1: 0-5°C, temperatura que debe mantenerse a lo largo de toda la cadena de frío desde el productor al usuario final. El destinatario de este tipo de producto es la industria elaboradora secundaria y la hostelería. Los fabricantes han constatado que si bien las primeras, por lo general, aseguran el mantenimiento de la cadena de frío, no lo hacen así las cámaras de refrigeración de uso habitual en hostelería que registran temperaturas de almacenamiento entre 8 y 9 °C.

Desde el punto de vista microbiológico la determinación del crecimiento microbiano, se realiza por siembra en placa y posterior conteo de las unidades formadoras de colonia (ufc), método de referencia que por otro lado requiere: elevados consumos de tiempo en laboratorio, material fungible y personal especializado. Se han descrito los efectos que tratamientos térmicos y degradación microbiana ejercen sobre algunas propiedades físicas de los ovoproductos como color, turbidez y viscosidad (Hou *et al.* 1996), o coagulación (Coimbra *et al.* 2006), (Van der Plancken *et al.* 2006). Todas ellas se adaptan a la aplicación de técnicas ópticas para la supervisión del producto.

Actualmente existen algunos desarrollos en el mercado que emplean la tecnología de diodos emisores de luz (LED) para la supervisión de procesos de gelificación como es el del cuajado de la leche (Castillo *et al.* 2000). **Este trabajo presenta un estudio preliminar para la supervisión de la degradación de ovoproducto mediante LED con el objeto de hacer una propuesta de implantación en laboratorios de calidad en la industria.**

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El Estudio se llevó a cabo en la época de verano por ser la más desfavorable para la conservación de los productos perecederos. Tras la recepción, las muestras de ovoproducto líquido pasteurizado (yema y clara), fueron distribuidas en cámaras industriales a temperaturas de conservación de 2°C (control) y 9°C (favorecedora de la degradación). El seguimiento se realizó durante toda la vida comercial del producto, tal y como especifica su fecha de caducidad, que se incrementó hasta un tercio cuando el deterioro del producto lo permitió: 9 días a 9°C y 40 días a 2 °C en clara, 14 días a 9°C y 46 días a 2°C en yema.

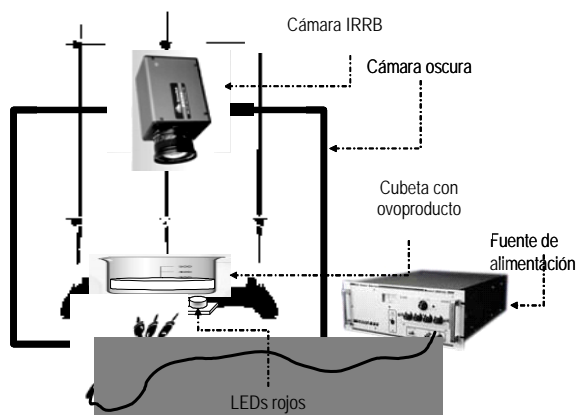


Figura 1: Esquema del dispositivo óptico desarrollado

La Figura 1 muestra el dispositivo experimental. En la parte inferior la matriz de 5 LED a 650 nm, y directamente apoyada sobre ella la muestra (1 cm de espesor) contenida en un recipiente transparente. Una cámara IRRB con una ventana de sensibilidad a 650nm de ± 20 nm recoge la radiación que atraviesa la muestra. De cada producto comercial se tomaron tres muestras sobre las que se realizaron los ensayos ópticos por triplicado (ver Tabla 1).

Tabla 1: Características de los ensayos realizados

Tipo de ensayo	Producto comercial pasteurizado	nº muestras por producto	nº repeticiones por muestra	Tª (°C) de conservación	Días de conservación	nº test
Óptico	Clara líquida	3	3	2→	3→	27
				9→	3→	27
	Yema líquida	3	3	2→	3→	27
				9→	3→	27
Conteo de ufc	Clara líquida	3	2	2→	8→	48
				9→	6→	36
	Yema líquida	3	2	2→	9→	54
				9→	7→	42

Para la caracterización de la microbiología del producto se determinó el número de microorganismos mesófilos totales empleando la técnica de investigación y recuento en medio sólido. El medio de aislamiento utilizado fue Agar Count Plate (PCA) (Oxoid LTD). Tras la siembra de las placas petri la incubación tuvo lugar a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48-72 horas. Los recuentos de las colonias de morfología típica, en aquellas placas que presentaron entre 30 y 300 colonias, se expresa como $\log(\text{u.f.c.})/\text{ml}$.

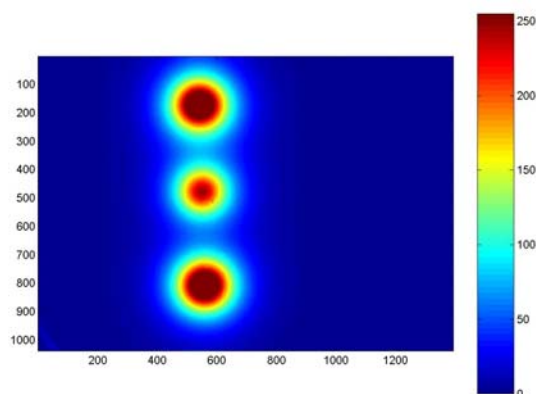


Figura 2: Imagen de la radiación emitida por tres LED al atravesar una muestra de yema, captada por la cámara IRRB y correspondiente al canal rojo (autoescalada)

Se ha desarrollado un programa en MATLAB® para el tratamiento de las imágenes obtenidas con la cámara IRRB y la extracción de los parámetros de interés.

El tratamiento de imagen consistió en la segmentación en blanco y negro de las imágenes originales (ver Figura 2) según dos niveles de segmentación: el primero por aplicación de un umbral de segmentación según un nivel de gris (NG 1), calculado por aplicación del método *Otsu*, que minimiza la varianza dentro de las clases

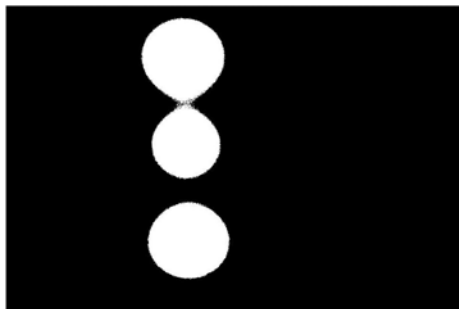


Figura 3: Segmentación de la imagen anterior al aplicar el nivel de segmentación 1

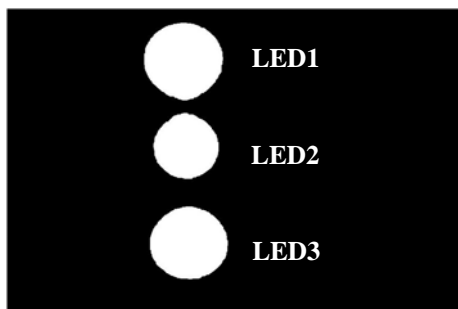


Figura 4: Individualización de los tres LED por eliminación de píxeles de áreas intermedias



Figura 5: Imagen global del área iluminada por los tres LED al aplicar el nivel de segmentación 2

formadas por los píxeles clasificados como blancos y como negros respectivamente sobre el histograma maximizando a la vez la diferencia entre ambas clases (ver Figura 4). El segundo (NG2) por aplicación del método Otsu pero esta vez sobre el histograma modificado de la imagen original por ajuste de los niveles de gris de menor intensidad (entre 1 y 51) a todo el rango de 256 niveles de gris, lo que permite seleccionar el área global iluminada por los tres diodos (ver Figura 5). El programa permite además eliminar píxeles aislados por desarrollo de operaciones morfológicas sobre la imagen binaria (ver Figura 3).

El NG1 permite identificar el área de máxima intensidad de iluminación para cada uno de los LED mientras que el NG2 incluye el efecto de dispersión de la radiación a través de la muestra. De cada una de estas imágenes segmentadas se extrajeron los siguientes parámetros: Área iluminada (nº de píxeles), nivel de gris medio (entre 1 y 256) y desviación típica del nivel de gris en el área iluminada.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una de las alteraciones más conocidas de la clara de huevo a lo largo de su conservación es su licuefacción (Thapon, 1994), lo que en este caso implica una mayor transparencia de la muestra a la radiación registrándose niveles crecientes de intensidad lumínica al aumentar el tiempo de almacenamiento (ver Figura 7).

El incremento del número de microorganismos con el tiempo de almacenamiento se ajusta a una función sigmoide (ver Figura 6) según la ecuación (1) donde *min* es el valor mínimo de la serie de datos, *rango* es el rango de variación de la serie de datos considerada y *a* y *b* son los parámetros de ajuste del modelo. Análogamente, se han ajustado los valores de la intensidad media del nivel de gris según la misma función (ver Figura 7) encontrándose una correlación de 0.86 y 0.97 entre la curva de ajuste del parámetro de imagen considerado y las curvas de crecimiento microbiano a 2°C y 9°C respectivamente.

$$y = \min + \text{rango} \cdot \frac{e^{a+bt}}{1 + e^{a+bt}} \quad (1)$$

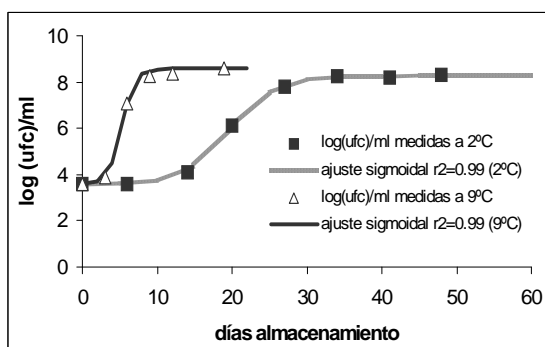


Figura 6: Evolución del crecimiento microbiano con el tiempo de almacenamiento (clara de huevo)

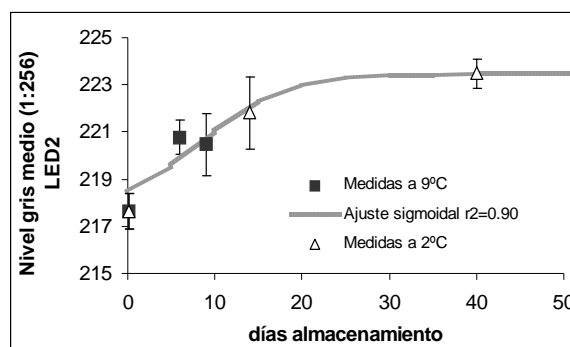


Figura 7: Evolución del incremento del nivel de gris en el LED n°2 con el tiempo de almacenamiento (clara de huevo)

El análisis de varianza de la Tabla 2 muestra que el factor tiempo de almacenamiento tiene un efecto significativo no sólo sobre el parámetro nivel de gris medio ($F_{LED2\ 2^{\circ}C}=74.98$) sino que influye de forma especialmente significativa sobre el parámetro área iluminada ($F_{LED2\ 2^{\circ}C}=255.5$). A lo largo del almacenamiento los microorganismos van a desnaturalizar las proteínas que constituyen el 10% de la composición de la clara lo que unido a su alto contenido en agua (85%) produce una disminución de su viscosidad (Thapon, 1994) y un aumento de la transparencia del ovoproducto a la radiación implicando no sólo un aumento del nivel de gris sino también un incremento del área iluminada por cada LED (ver Figura 9).

Tabla 2: Resultado del análisis de varianza ANOVA con indicación de los valores de la F de Fisher (F significativa para $p < 0.05$)

Factor tiempo de almacenamiento	Área iluminada		Nivel de gris medio	
	LED2	LED3	LED2	LED3
Clara (2°C)	255.50	136.75	74.98	52.83
Clara (9°C)	67.02	67.85	11.91	31.39
Yema (2°C)	22.99	61.59	5.372	6.520
Yema (9°C)	19.65	108.76	ns	4.29

La yema debido a las grandes diferencias en composición con respecto a la clara, con sólo un 50% de agua, 15% de proteínas y un 35% de lípidos, es un producto mucho más viscoso, con elevada concentración de compuestos en suspensión que aumentan la opacidad del producto a la radiación, así el área iluminada por un LED es aproximadamente la mitad del área de iluminación de un LED en una muestra de clara de huevo.

Lorient y Matringe, 1994 describen que, al igual que la clara, la viscosidad aparente de la yema y el índice de consistencia de la misma disminuyen a lo largo del almacenamiento, efecto que en este caso explica el incremento del nivel de gris medio y del área iluminada por los LED (ver Figura 8) de 0 a 7 días de almacenamiento a 9°C y de 0 a 14 días de almacenamiento a 2°C.

Al aumentar el tiempo de almacenamiento hasta los valores máximos considerados (14 y 46 días a 9°C y 2°C respectivamente), la acumulación de metabolitos de la actividad microbiana así como del número de unidades formadoras de colonias provoca un incremento de la turbidez de la muestra. La Figura 8 muestra en este caso, una disminución tanto de las áreas iluminadas como de los niveles de gris registrados. Este efecto es especialmente importante en las muestras almacenadas a 2°C, puesto que a estas temperaturas el 35% de los ácidos grasos saturados que constituyen la fracción lipídica de la yema estarán más solidificados, describiendo la literatura (Lorient y

Matringe, 1994) aumentos de la viscosidad de la yema debidos a procesos de gelificación que afectan a las proteínas que son tanto más drásticos cuanto menor es la temperatura de almacenamiento.

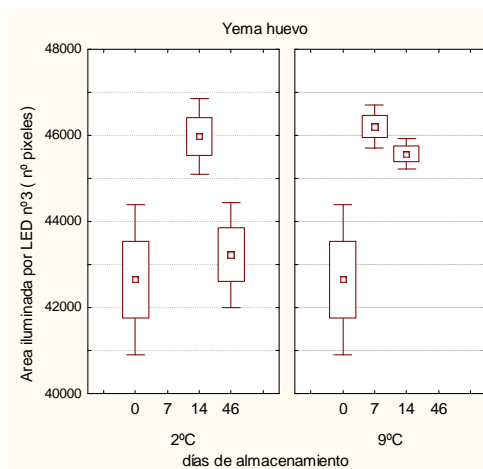


Figura 8: Variación del parámetro área iluminada con el tiempo de almacenamiento y temperatura de conservación de la yema

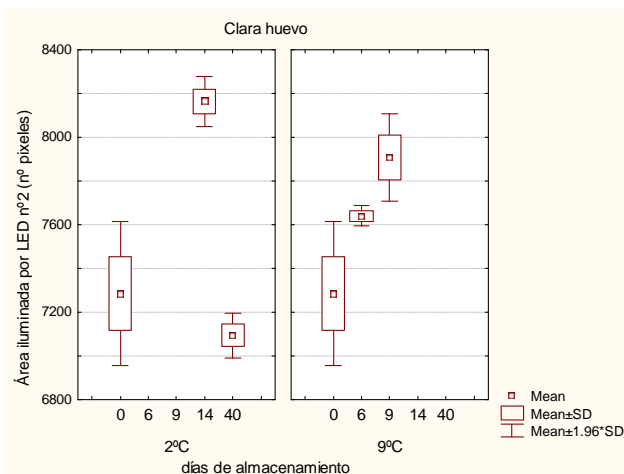


Figura 9: Variación del parámetro área iluminada con el tiempo de almacenamiento y temperatura de conservación de la clara

4 CONCLUSIONES

El presente estudio permite concluir que el empleo de diodos emisores de luz es potencialmente aplicable a la supervisión rápida y no destructiva, del crecimiento microbiano en ovoproducto líquido pasteurizado. En el caso de la clara el aumento en el contenido microbiano de las muestras a lo largo del tiempo de almacenamiento se correlaciona (con valores de hasta $r = 0.97$) con el incremento en el nivel de intensidad lumínica detectado en las muestras. En la yema a partir de niveles altos de concentración de microorganismos los fenómenos de turbidez y gelificación se identifican con una disminución de los parámetros de intensidad de luz y de área iluminada.

En trabajos posteriores se plantea la realización de un modelo que contemple de forma conjunta las cinéticas de crecimiento microbiano y de modificación de los componentes bioquímicos de los ovoproductos.

Es así mismo interesante destacar que se ha detectado en el empleo de LEDs ciertas dificultades derivadas fundamentalmente de la variabilidad intralote en la intensidad lumínica que generan y la deriva de la misma con el tiempo de uso, lo que obligará en futuros desarrollos al diseño de una electrónica robusta que incluya microcontroladores PIC (Programmable Interrupt Controller), que aseguren entre otros aspectos, una luminosidad constante y homogénea de todos los LED.

5. REFERENCIAS

- Castillo, M., F. A. Payne, C. L. Hicks, and M. B. Lopez. 2000. Predicting cutting and clotting time of coagulating goat's milk using diffuse reflectance: effect of pH, temperature and enzyme concentration. *International Dairy Journal* 10, no. 8: 551-62.
- Coimbra, Jane S. R., Ana L. Gabas, Luis A. Minim, Edwin E. Garcia Rojas, Vania R. N. Telis, and Javier Telis-Romero. 2006. Density, heat capacity and thermal

- conductivity of liquid egg products. *Journal of Food Engineering* 74, no. 2: 186-90.
- Guilmineau, F., and U. Kulozik. 2007. Influence of a thermal treatment on the functionality of hens egg yolk in mayonnaise. *Journal of Food Engineering*, no. 78: 648-54.
- Hou, H., R. K. Singh, P. M. Muriana, and W. J. Stadelma. 1996. Pasteurization of intact shell eggs. *Food Microbiology*, no. 13: 93-101.
- Lorient, D., and E. Matringe. 1994. Propriétés Fonctionelles. *L'oeuf et les ovoproduits*. J. L. Thapon, and C. M. Bourgeois, 222-48. Paris: Technique et Documentation.
- Mañas, P., R. Paglan, I. Alvarez, and S. Condón. 2003. Survival of *Salmonella senftenberg* 775W to current liquid whole egg pasteurization treatments. *Food Microbiology*, no. 20: 593-600.
- Thapon, J. L. 1994. Évolution de l'oeuf au cours de la conservation de l'oeuf. *L'oeuf et les ovoproduits*. J. L. Thapon, and C. M. Bourgeois, 84-95. Paris: Technique et Documentation.
- Van der Plancken, I., A. Van Loey, and M. E. Hendrickx. 2006. Effect of heat-treatment on the physico-chemical properties of egg white proteins: A kinetic study. *Journal of Food Engineering*, no. 75: 316-26.

6. AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo se ha realizado con la financiación de la Universidad Politécnica de Madrid, TAGRALIA-CM y CAL 03-018-C3-1.