



**UNIVERSIDAD DEL AZUAY**

**DEPARTAMENTO DE POSGRADOS**

**MAESTRÍA EN GESTIÓN DE CALIDAD Y SEGURIDAD**

**ALIMENTARIA II**

**Validación de la penetración de calor en la pasteurización de helado  
de chocolate y vainilla producidos industrialmente, en un  
pasteurizador Pasto 180 Telme de la Fabrica Tutto Freddo.**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÁSTER DE  
GESTIÓN DE CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA**

**AUTOR:**

**Franklin Santiago Pacheco Vanegas**

**DIRECTOR:**

**Claudio Sánchez Jáuregui**

**CUENCA, ECUADOR 2016**

## **DEDICATORIA**

Dedico esta tesis a Dios y a la Virgen Dolorosa, quienes inspiraron mi espíritu para la conclusión de esta meta personal y profesional. A mis padres quienes me dieron vida, educación, apoyo y amor incondicional a lo largo de toda mi vida. A mis hermanas que sin duda son el pilar fundamental del hogar, demás familiares, amigos, compañeros y muy especialmente a mi abuela, persona fundamental para la decisión de plantear esta meta profesional y que se, hoy está en el cielo feliz y orgullosa de haberme guiado hasta la culminación de la misma. A todos ellos se los agradezco desde el fondo de mi alma. Para todos los que confiaron en mí, hago esta dedicatoria

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar doy infinitamente gracias a Dios y a la Virgen Dolorosa, por haberme dado fuerza y valor para culminar otra etapa estudiantil de mi vida.

Agradezco la confianza y el apoyo brindado por parte de mi madre, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida me ha demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos.

A mi padre, que con su ejemplo me ha demostrado que se deben afrontar y superar los retos que se presentan a lo largo de la vida.

A mi hermana Jacky, que siempre la he sentido presente en mi vida. Y que es el testimonio fiel de amor y pureza, ejemplo de superación y sencillez. A mi hermana Doris, colega y amiga, persona fundamental en la culminación y redacción de este proyecto, quien me ha demostrado su apoyo personal y profesional incondicionalmente.

Agradezco especialmente a mis guías Ing. Claudio Sánchez, Ing. Fernanda Rosales, Ing. Monica Tinoco y la Ing. Jhoana Tacuri, por toda la colaboración brindar a lo largo de esta tesis.

A mi amigo Ing. Jose Sarmiento y Fabrica de Helados Tutto Freddo, por las facilidades confiadas para alcanzar las metas propuestas.

A todos mis amigos, compañeros de trabajo y personas especiales que han demostrado su comprensión y motivación a lo largo de mis estudios y culminación de este proyecto.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDOS	pág.
DEDICATORIA .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	iv
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	V
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	VI
<b>INDICE DE ANEXOS</b> .....	IX
<b>CAPITULO 1</b> .....	4
1.1 Pasteurización .....	4
<b>1.2 Salmonella.</b> .....	5
<b>1.3 Listeria monocytogenes</b> .....	6
<b>1.4 Termorresistencia de las bacterias</b> .....	7
<b>1.5 Penetración de calor</b> .....	7
<b>1.6 Predicción de la inactivación térmica</b> .....	8
<b>1.6.1 Sistema ComBase</b> .....	9
<b>1.6.2. Tiempo de reducción decimal o valor D</b> .....	9
<b>CAPITULO 2</b> .....	11
<b>2.1 Datos generales de la empresa</b> .....	11
<b>2.2 Generalidades del estudio</b> .....	11

2.3	Localización .....	11
2.4	Recursos .....	12
2.4.1	Recursos institucionales .....	12
2.4.2	Recursos materiales.....	12
2.5	Universo y Muestra.....	12
2.6	Procedimiento de la toma de muestras .....	12
2.7	Análisis Microbiológicos.....	13
2.8	Procedimiento para la siembra de muestras.....	13
2.9	<b>Procedimiento para el análisis e interpretación de datos .....</b>	<b>13</b>
<b>CAPITULO 3 .....</b>		<b>14</b>
<b>RESULTADOS .....</b>		<b>14</b>
<b>3.1 INTERPRETACIÓN DE DATOS .....</b>		<b>14</b>
3.2	Determinación del tiempo de reducción decimal o valor D. ...	26
3.3	Interpretación de datos con el software Combase.....	27
3.4	Discusión. ....	31
<b>CONCLUSIONES .....</b>		<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>		<b>35</b>
<b>ANEXOS .....</b>		<b>36</b>

### INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Prueba para salmonela en helado de vainilla .....	14
Tabla 2	Prueba para Listeria en helado de vainilla .....	17

Tabla 3 Prueba para salmonela en helado de chocolate.....	20
Tabla 4 Prueba para Listeria en helado de chocolate.....	23
Tabla 5 determinación de valor D.....	26
Tabla 6 Comparación de valor D por formula y mediante ComBase.....	31

### **INDICE DE FIGURAS**

Figura 1 Modelo del predictivo ComBase.....	9
Figura 2 Factor D, células supervivientes vs el tiempo. ....	10

Figura 3 Curva del crecimiento de Salmonella con respecto al tiempo y temperatura en helado de vainilla..... 15

Figura 4 Curva de la reducción microbiana de Salmonella para el helado de vainilla. .... 15

Figura 5 Reducción microbiana con los valores más significativos de Salmonella para helado de vainilla. .... 16

Figura 6 Curva del crecimiento de Listeria con respecto al tiempo y temperatura en helado de vainilla. .... 18

Figura 7 Curva de la reducción microbiana de Listeria para el helado de vainilla... 18

Figura 8 Reducción microbiana con los valores más significativos de Listeria para helado de vainilla. .... 19

Figura 9 Curva del crecimiento de Salmonella con respecto al tiempo y temperatura en helado de chocolate. .... 21

Figura 10 Curva de la reducción microbiana de Salmonella para el helado de chocolate. .... 21

Figura 11 Reducción microbiana con los valores más significativos de Salmonella para helado de chocolate. .... 22

Figura 12 Curva del crecimiento de Listeria con respecto al tiempo y temperatura en helado de chocolate. .... 24

Figura 13 Curva de la reducción microbiana de Listeria para el helado de chocolate. .... 24

Figura 14 Reducción microbiana con los valores más significativos de Listeria para helado de chocolate. .... 25

Figura 15 Determinación del valor D en el predictor Combase para Salmonella en helado de vainilla. ....	27
Figura 16 Curva del modelo de inactivación térmica de Salmonella en helado de vainilla. ....	27
Figura 17 Determinación del valor D en el predictor Combase para Listeria en helado de vainilla. ....	28
Figura 18 Curva del modelo de inactivación térmica de Listeria en helado de vainilla. ....	28
Figura 19 Determinación del valor D en el predictor Combase de Salmonella en helado de chocolate. ....	29
Figura 20 Curva del modelo de inactivación térmica de Salmonella en helado de chocolate. ....	29
Figura 21 Determinación del valor D en el predictor Combase de Listeria en helado de chocolate. ....	30
Figura 22 Curva del modelo de inactivación térmica de Listeria en helado de chocolate. ....	30

## **INDICE DE ANEXOS**

Anexo 1 KIT RAPIDO DE DETECCION DE SALMONELLA .....	36
Anexo 2 KIT RAPIDO DE DETECCION DE LISTERIA .....	37
Anexo 3 NORMA INEN DEL HELADO .....	38
Anexo 4 GRÁFICOS .....	40

**VALIDACIÓN DE LA PENETRACIÓN DE CALOR EN LA  
PASTEURIZACIÓN DE HELADO DE CHOCOLATE Y  
VAINILLA PRODUCIDOS INDUSTRIALMENTE, EN UN  
PASTEURIZADOR PASTO 180 TELME DE LA FABRICA  
TUTTO FREDDO.**

**RESUMEN**

El presente estudio se realizó con el fin de validar la penetración de calor en los helados de chocolate y vainilla que son producidos industrialmente en la pasteurizadora de helado Pasto 180 Telme de la Fábrica de Helados Tutto Freddo de la ciudad de Cuenca, en dicha validación se realizó la inoculación de cantidades conocidas de cepas de *Salmonella* y *Listeria Monocytogenes* en un lote de helado de chocolate y vainilla respectivamente, se llevó al pasteurizador y durante el proceso de pasteurización se tomaron 20 muestras de cada lote, se comprobó la disminución logarítmica de la carga bacteriana inoculada inicialmente, hasta finalmente comprobar que no se presenciaba estos patógenos. Los resultados obtenidos demuestran que el proceso de pasteurización de los helados, en el equipo Pasto 180 Telme es apropiado y garantiza la eliminación de estos patógenos al final del proceso de pasteurización.

**PALABRAS CLAVES**

Helado, pasteurización, validación, *Salmonella*, *Listeria Monocytogenes*

**VALIDATION OF HEAT PENETRATION FACTOR IN THE  
PASTEURIZATION PROCESS OF INDUSTRIALLY PRODUCED VANILLA  
AND CHOCOLATE ICE CREAM IN A TELME PASTEURIZER PASTO 180  
AT TUTTO FREDDO ICE CREAM COMPANY.**

**ABSTRACT**

This study was conducted to validate the heat penetration factor in industrially produced chocolate and vanilla ice cream in a *Telme* pasteurizer Pasto 180 at *Tutto Freddo* Ice Cream Factory in the city of Cuenca. Throughout the validation, the inoculation of known amounts of strains of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in a batch of chocolate ice cream and vanilla respectively, were performed in the pasteurizer. Twenty samples per lot were taken during the pasteurization process; the logarithmic decrease of the inoculated bacterial load is checked at the beginning of the process; to finally prove that there were no pathogens present. The results show that the ice cream pasteurization process done in Pasto 180 *Telme* equipment is appropriate and ensures the elimination of these pathogens at the end of the pasteurization process.

**KEYWORDS:** Ice Cream, Pasteurization, Validation, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*



Translated by   
Lic. Lourdes Crespo



Franklin Santiago Pacheco Vanegas

TRABAJO DE GRADUACIÓN

Ing. Claudio Sánchez Jáuregui

Junio, 2016

**“Validación de la penetración de calor en la pasteurización de helado de chocolate y vainilla producidos industrialmente, en un pasteurizador Pasto 180 Telme de la Fabrica Tutto Freddo”**

**INTRODUCCIÓN**

Por las propiedades propias y por aportar gran cantidad de proteínas, carbohidratos, lípidos y minerales, el helado de base de leche es apetecido y considerado como uno de los derivados lácteos de mayor consumo. Sin embargo, por las mismas condiciones y propiedades estos pueden ser agentes de contaminación y transportadores de microorganismos sobretodo de microorganismos patógenos en el caso que sean procesados en condiciones no higiénicas.

En diferentes décadas se han reportado brotes epidémicos en los que han estado involucrados los helados, entre los que destacan como agentes etiológicos: Salmonella, Campylobacter, Listeria, Yersinia y Staphylococcus aureus, entre otros. Así mismo, diversos estudios han detectado la presencia de estos patógenos en el producto que ha sido pasteurizado y que se encuentra en estado de congelación.

Aun cuando, comparados con otros alimentos, los helados de elaboración industrial están menos vinculados con brotes epidémicos, por el perfeccionamiento de las técnicas de fabricación, los riesgos de contaminación microbiológica siempre están presentes, motivos de existir una alta carga microbiana de los ingredientes y de las

condiciones operativas en las diferentes fases de su elaboración, además de poseer las características bromatológicas adecuadas para esta proliferación. A pesar de que los microorganismos no son capaces de crecer en el helado que es almacenado en adecuadas condiciones de congelación, pueden sobrevivir durante mucho tiempo en el producto.

Tomando en cuenta las características de elaboración del helado y considerando que su materia prima y producto final es pasteurizado antes de su almacenamiento y expendio, el estudio está basado en la determinación de la presencia y carga cuantitativa de los patógenos *Salmonella* y *Listeria*, debido a que estos dos son los más probables a existir por la materia prima usada en la producción, además que podrían sobrevivir a las condiciones de pasteurización.

La *Salmonella spp.* es una bacteria anaeróbica facultativa, que puede en ocasiones sobrevivir en bajas condiciones de oxígeno, produce ácido a partir de glucosa, maltosa y sorbitol, sin la producción de gas; pero no fermenta la lactosa, sacarosa, la ramnosa y otros azúcares. Produce nitrito a partir de nitrato y también produce ácido sulfhídrico. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. La *Salmonella* causa la fiebre tifoidea en humanos, quienes son sus únicos hospedantes (Brenner, 1984)

La *Listeria Monocytogenes* es una bacteria que se encuentra en el suelo, tierra, agua, alcantarillados, que tiene la facilidad de trasladarse por las vías intestinales de personas y animales. Se transmite por ingestión en cualquier fase de la cadena alimentaria y tiene la peculiaridad de sobrevivir a temperaturas de refrigeración de 3°C e incluso menos. (Stachi, 2007).

Por esas razones podemos encontrarla en los lácteos y por tanto en helados, aunque muere en la pasteurización de la leche cuando esta se hierve a 70°C.

El propósito de este tema es garantizar un producto seguro para el consumidor, mediante la validación del pasteurizado del producto, a más de aportar con información del comportamiento y reducción logarítmica de dos bacterias patógenas como son la *Listeria* y *Salmonella* en el proceso de pasteurización del helado,

disminuyendo los riesgos inherentes que puedan estar presente con la presencia de estas dos bacterias en el helado que se elabora y expende en la planta procesadora de helados Tutto Freddo.

# CAPITULO 1

## MARCO TEORICO

### 1.1 Pasteurización

La importancia de la pasteurización del helado está basada en la destrucción de los microorganismos principalmente patógenos que pueden estar presentes en el producto final debido a la mezcla de sus ingredientes a un nivel aceptable o tolerable para su consumo, por lo cual es importante confirmar que el tratamiento térmico de la mezcla de todos los ingredientes del helado, en las temperaturas alcanzadas y por el tiempo expuesto permitan eliminar los microorganismos que comprometan la inocuidad del producto.

Durante la pasteurización se lograra además inactivar las enzimas y microorganismos responsables de generar no deseables cambios en el color y sabor del helado durante el almacenamiento del mismo. De la misma manera el tratamiento térmico permite la homogenización y disolución completa de la mezcla de los ingredientes.

Con el proceso de pasteurización se logra también el aumento de la retención de agua por parte de las proteínas, presumiblemente porque los puntos de reactivos de las cadenas polipeptídicas quedan mucho más accesibles o debido también a la polimerización de las proteínas.

Se debe escoger la pasteurización cuando los tratamientos térmicos más intensos perjudiquen la calidad del alimento como es el caso de leche y derivados de la leche, cuando la única finalidad es destruir microorganismos patógenos, cuando los microorganismos a destruir no son muy termoresistentes, cuando por haber quedado algún microorganismo capaz de alterar las condiciones del alimento necesite otros procedimientos como la refrigeración y congelación como es el caso de los helados y cuando se tenga que introducir microorganismos competitivos para producir fermentación.

Los métodos de conservación necesarios después de haber dado un tratamiento térmico de pasteurización a los alimentos son: la refrigeración, el envasado generalmente en recipientes cerrados para evitar contaminación, el mantenimiento de anaerobiosis, la adición de elevadas concentraciones de azúcar y finalmente la adición de conservantes químicos como ácidos orgánicos.

La mezcla para la fabricación de helado se pasteuriza a diversas temperaturas durante tiempos diferentes, sometiéndola generalmente a un tratamiento térmico de mayor intensidad que el usado para la leche comercial, pudiendo ser por ejemplo: un calentamiento a 71,1°C durante 30 minutos o a 82,2°C, durante un tiempo de 16 a 20 segundos.

## **1.2 Salmonella.**

Pertenece a la familia de las enterobacteriaceae, es un bacilo Gram negativo móvil, que no forma endoesporas, puede metabolizar nutrientes por metabolismo o también por fermentación. Se adapta con gran facilidad en humanos y en animales, el intestino de estos puede colonizar la bacteria, por lo cual es responsable de infecciones, de la misma manera, puede llegar a un equilibrio con otros tipos de microorganismos intestinales donde sobrevivirá y se multiplicará contaminando otro tipo de alimentos que pasan por el tubo digestivo.

Al ser un Gram negativo se caracteriza por tener la típica pared celular estratiforme rica en lípidos. La capa externa contiene lipopolisacárido (LPS) responsable de la mayoría de las propiedades tóxicas y biológicas de este microorganismo. Unido al lipopolisacárido se encuentran las complejas cadenas de oligosacáridos que determinan especificidad antigénica en las cepas. El peptidoglucano forma una capa definida en la pared celular entre el lipopolisacárido y la membrana citoplasmática. *Salmonella* spp posee además un 10% de lipoproteínas encargadas de la asociación LPS – peptidoglucano (Hirsh, 1999)

La *Salmonella* crece en rangos de temperatura de 5.5 y 45°C, sin embargo fácilmente crece a temperaturas de  $\leq 54^{\circ}\text{C}$  y también en condiciones psicotróficas puede crecer en alimentos almacenados entre 2 y 4°C.

Por otra parte, Salmonellas no se caracteriza por ser una bacteria que presente elevada termorresistencia en comparación con otras cepas como *S. senftenbergo* *S. typhimurium* (Doyle & Mazzotta, 2000). No obstante, estudios de resistencia térmica bacteriana en alimentos y medios de cultivo han demostrado que *Salmonella* spp. es capaz de generar factores de termorresistencia como proteínas de membrana alternas que le confieren una mayor protección al calor (Humpheson et al., 1998).

El intervalo de pH para el crecimiento de *Salmonella* es de 4,1 a 9, la actividad acuosa idónea para el crecimiento es de 0,93 a 0,95, de acuerdo al serotipo del alimento los valores D 60°C varía desde 0,06 a 11, 3 minutos.

### **1.3 Listeria monocytogenes**

Un basilo grampositivo, tiene movilidad extra celular e intercelular, es una bacteria ácido-tolerante, halotolerante y anaeróbica facultativa. Esta bacteria no crece a temperaturas superiores a los 45°C y la temperatura mínima para su desarrollo es de 1.1, una pasteurización convencional (15 segundos a 72°C) puede provocar de 10a 250 reducciones decimales, en la leche, tanto la pasteurización baja (62-68°C por 30 minutos) como la pasteurización alta (71-77°C por 15 segundos) destruyen al microorganismo, sin embargo en una pasteurización alta se debe tener menos margen de seguridad ya que si la carga celular inicial es alta podría haber una posible supervivencia de la batería. (Madigan, 2003).

*L. monocytogenes* puede sobrevivir y reproducirse a temperaturas de refrigeración, es decir de 1 a 8°C, por ejemplo el límite inferior de crecimiento para alimentos con un pH neutro y un elevado contenido de nutrientes fue de aproximadamente 0°C. El organismo resiste bien durante varias semanas a -18°C en varios sustratos alimenticios y es posible que el almacenamiento en congelación (-18°C a -198°C) durante un mes destruya muy pocas *Listerias* (ICMSF 5, 1998).

La resistencia de *L. monocytogenes* a los tratamientos térmicos es variable y depende de factores como la cepa involucrada, la fase de crecimiento, las condiciones del medio (contenido de NaCl, temperatura, pH, aw, presencia de inhibidores), velocidad de cocción y el estrés (choque térmico, choque ácido,

exposición a sales y otros solutos). La resistencia térmica puede disminuir o aumentar en dependencia de estos

El pH de crecimiento para *L. monocytogenes* se encuentra en un rango de 4.39-9.4, su pH óptimo es de 7. Sin embargo, algunas cepas pueden resistir rangos desde 3 a 12, de todas formas, el pH mínimo de crecimiento dependerá de la temperatura de incubación, composición general de nutrientes del sustrato de crecimiento, actividad de agua y de la presencia de NaCl o cualquier inhibidor.

*L. monocytogenes* tiene un límite inferior de  $a_w$  de crecimiento de aproximadamente 0.90 a 30 ° C cuando se utiliza glicerol para controlar dicha actividad. A su vez, se han citado límites de 0.92 y 0.93 utilizando NaCl y sacarosa, respectivamente (ICMSF 5, 1998). Estos datos evidencian que éste microorganismo sigue a los estafilococos como patógeno de origen alimentario capaz de crecer a valores de  $a_w$  <0.93 (Jay 2009).

#### **1.4 Termorresistencia de las bacterias**

Se expresa como tiempo de muerte térmica, es el tiempo necesario para destruir una determinada temperatura, un determinado número de microorganismos bajo condiciones específicas.

La termorresistencia de las células vegetativas de las bacterias varía desde las poco patógenas que son destruidas con facilidad, hasta las termófilas que requieren temperaturas entre 80 y 90°C para su destrucción. En cuanto a la termorresistencia de la células vegetativas podemos determinar lo siguiente: cuanto más elevadas son las temperaturas optima y máxima de crecimiento, mayor será el grado de termorresistencia que presente, las bacterias que forman grupos o forman capsulas presentan mayor termorresistencia, las células con mayor contenido de lípido son más difíciles de destruir.

#### **1.5 Penetración de calor**

Es necesario calcular el tratamiento térmico para conservar un alimento para eso, se debe conocer la velocidad con que penetra el calor ese alimento. El alimento debe recibir un tratamiento térmico apropiado para evitar alteraciones del mismo, la parte

que se calienta con mayor lentitud es la más conflictiva, generalmente es el centro del producto. La penetración del calor puede darse por conducción, donde el calor se transmite de molécula a molécula, por convección, en el cual el calor se transmite por desplazamiento de gases o líquidos, o como suele suceder en la mayoría de los casos sucede por una combinación de los dos métodos.

Si en el líquido calentado existen partículas sólidas en suspensión, las partículas se calientan por conducción, mientras que el líquido se calienta por convección. Algunos líquidos cambian su consistencia durante el calentamiento, generalmente en jarabes azucarados, en productos en salmuera, en sopas y algunos zumos, en este caso la curva de calentamiento que se obtiene, es una curva interrumpida. Los factores que intervienen en el calentamiento correcto de un alimento son los siguientes:

- Temperatura inicial del alimento. Un alimento con una temperatura inicial baja se calienta más rápido que un alimento con una temperatura inicial más alta. Sin embargo, el alimento cuya temperatura inicial es alta permanece más tiempo en la temperatura letal para los microorganismos, por lo cual, la temperatura media es más elevada que la temperatura media del alimento con temperatura inicial menor.
- Temperatura del calentador. Los alimentos que se calientan en calderas con temperaturas más altas, el calentamiento será más rápido, por lo tanto, el alimento alcanzara antes las temperaturas letales.
- Consistencia del contenido. La velocidad de penetración de calor disminuye conforme aumenta la concentración de azúcar, aunque este efecto es contrarrestado en parte por la importante disminución de la viscosidad de las soluciones de azúcar incluso de las concentradas, cuando aumenta la temperatura.
- Rotación y agitación. La velocidad de penetración de calor es más elevada cuando existe rotación y agitación, aunque en algunos alimentos puede ocasionar modificaciones físicas no deseables.

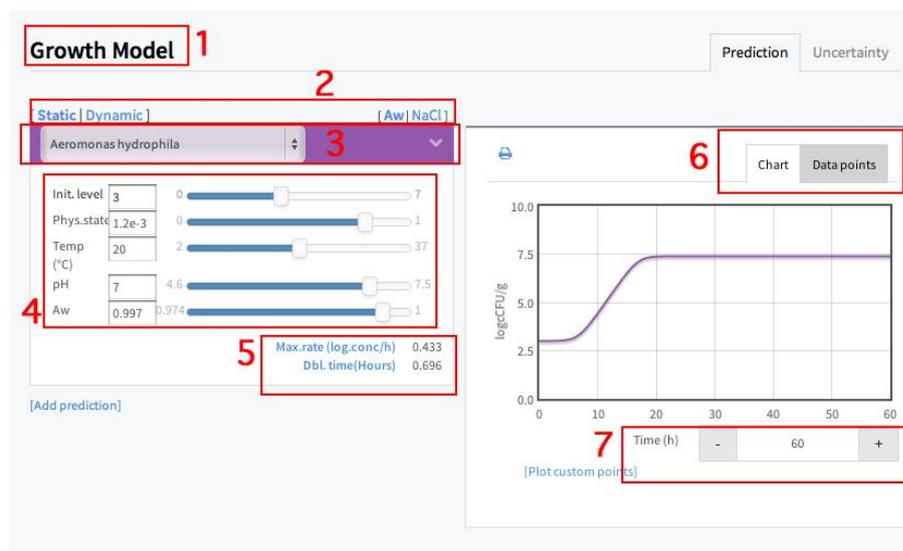
## **1.6 Predicción de la inactivación térmica**

### 1.6.1 Sistema ComBase

El software ComBase contiene miles de curvas microbianas de crecimiento y supervivencia que describen el efecto de las distintas condiciones de procesamiento y almacenamiento de alimentos en el crecimiento bacteriano, y ofrecen información sobre cómo las bacterias responden a los cambios de temperatura, pH, actividad de agua y otros factores en distintos ambientes alimenticios.

Los modelos matemáticos y software predictivo hacen uso de esta información para predecir el crecimiento de éstas bacterias en distintas condiciones ambientales.

**Figura 1** Modelo del predictivo ComBase

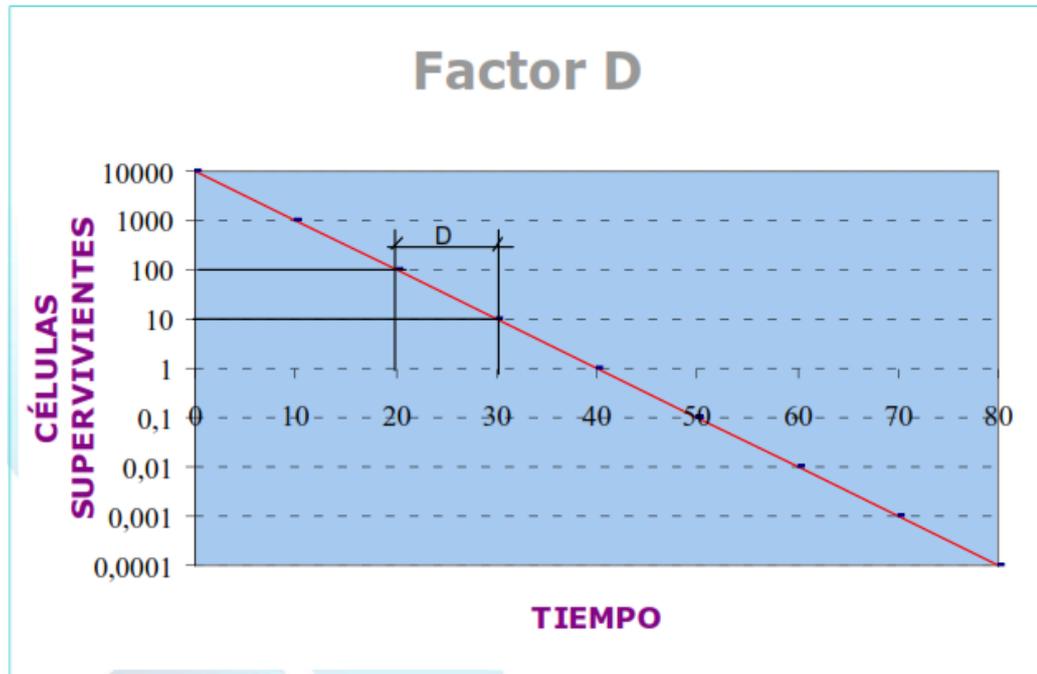


Fuente: (Combase, 2016)

### 1.6.2. Tiempo de reducción decimal o valor D

El valor D es el tiempo necesario, a una determinada temperatura, para disminuir la población de microorganismos al 10%. El Tiempo de Reducción Decimal, mejor conocido como "valor D", se define como el tiempo que se requiere para reducir en un 90% la población microbiana de un microorganismo determinado a una temperatura específica (Orrego, 2003).

**Figura 2** Factor D, células supervivientes vs el tiempo.



Fuente: (Combase, 2016)

Para determinar el tiempo de reducción decimal se aplica la siguiente fórmula:

$$DT = \frac{\Delta t}{\log N_0 - \log N}$$

De donde: fuente

$N_0$ = población de microorganismos inicial

$N$ = número de microorganismos vivos en cada momento

$\Delta t$ = minutos a una determinada temperatura

## **CAPITULO 2**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1 Datos generales de la empresa**

Tutto Freddo S.A. es una planta de elaboración cuencana, su principal actividad es la elaboración de helados, de donde el 90% de estos productos, corresponde a derivados lácteos.

Actualmente la planta produce aproximadamente 30 toneladas de helado mensual, cantidad que es repartida a nivel nacional en sus cerca de 60 establecimientos propios y franquiciados, los sabores más representativos y de mayor aceptación son los helados de vainilla y chocolate, razón por la cual estos dos sabores son producidos en mayor cantidad.

La empresa de Helados Tutto Freddo, está comprometida en brindar productos de calidad e inocuos, actualmente posee certificación BPM, misma que incentiva a seguir superando, mejorando e innovando la calidad y asepsia de sus productos y procesos de elaboración de estos.

#### **2.2 Generalidades del estudio**

Se inoculo cepas de las bacterias de Listeria y Salmonella en lotes de helado de vainilla y chocolate, se procedió con la pasteurización normal del helado, tal como se hace en la planta de producción. Se tomaron muestras mientras la temperatura fue subiendo y en el laboratorio se comprobó la reducción logarítmica de la carga microbiana inoculada, hasta finalmente comprobar la muerte de las bacterias patógenas con kits de detección, para cada una de ellas.

#### **2.3 Localización**

El presente estudio se realizó en los laboratorios de Lácteos de la Universidad del Azuay, las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de microbiología del mismo establecimiento, que se encuentra ubicado en las calles Hernán Malo y Av. 24 de Mayo. Perteneciente a la parroquia Huaynacapac.

La materia prima fue obtenida de la planta de producción principal de helado, que está ubicada en la Av. de las Américas 7-70 y Guillermo Medina Cuenca – Ecuador.

## **2.4 Recursos**

### **2.4.1 Recursos institucionales**

Laboratorio de Lácteos y Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay, heladerías Tutto Freddo.

### **2.4.2 Recursos materiales**

La materia prima para la elaboración de los helados fue proporcionada por la Fábrica de Helados Tutto Freddo, de la misma manera que los reactivos, cajas de análisis y demás implementos para el procesamiento de las muestras.

## **2.5 Universo y Muestra**

El universo estuvo conformado por 80 muestras en total, se tomaron 20 muestras de cada lote de helado, tanto para los sabores de vainilla como de chocolate, se realizó el mismo procedimiento con las dos cepas de bacterias diferentes (Salmonella y Listeria).

## **2.6 Procedimiento de la toma de muestras**

El muestreo se realizó en los laboratorios de lácteos de la facultad de ciencia y tecnología de la Universidad del Azuay, se utilizaron dos lotes diferentes de base de chocolate y vainilla para cada bacteria. El proceso no se realizó en las instalaciones de heladerías Tutto Freddo por el peligro de usar bacterias vegetativas vivas, por una posible contaminación con el uso de estas.

- 1) Se realizaron los análisis para comprobar la carga microbiana inicial del helado resultante de la pasteurización.
- 2) Se inoculó cepas aisladas de Salmonella y Listeria respectivamente en lotes de helado de chocolate y vainilla.

- 3) Se tomaron muestras de helado, conforme al aumento de la temperatura y tiempo de pasteurización, para comprobar la disminución de la carga microbiana.
- 4) Se tomaron muestras conforme al aumento de temperatura y se comprobó la presencia de los dos patógenos con kits de detección rápido a determinadas temperaturas.

## **2.7 Análisis Microbiológicos**

Para la determinación de Salmonella y Listeria se utilizó:

- Compac Dry para coliformes totales TC.

Para la validación del pasteurizado se utilizó pruebas de detección cualitativas:

- REVEAL 2.0 ListeriaTest Sistem. ANEXO 2
- REVEAL 2.0 para Salmonella. ANEXO 1

## **2.8 Procedimiento para la siembra de muestras.**

- a) Se prepararon frascos con agua peptonada.
- b) Se inoculo y activo las cepas de las bacterias Listerias y Salmonella, usando como sustrato leche a temperatura de 37°C.
- c) Se realizaron 4 a 7 diluciones respectivamente para cada una de las muestras, de acuerdo a la temperatura y carga microbiana.
- d) Se realizó la siembra en placas petrifilm Compac Dry.
- e) Se incubo las placas a 37°C +/- 1°C.

## **2.9 Procedimiento para el análisis e interpretación de datos**

- Se realizó el conteo de las placas.
- Se graficó las curvas de comportamiento y reducción decimal de las bacterias.
- Se determinó el tiempo de termo destrucción (*D*) del proceso, a la temperatura en la cual se evidencia la reducción de los patógenos.
- Se determinó el valor *D* en el sistema de predicción de la inactivación térmica, y se compara con *D* del proceso

### CAPITULO 3

### RESULTADOS

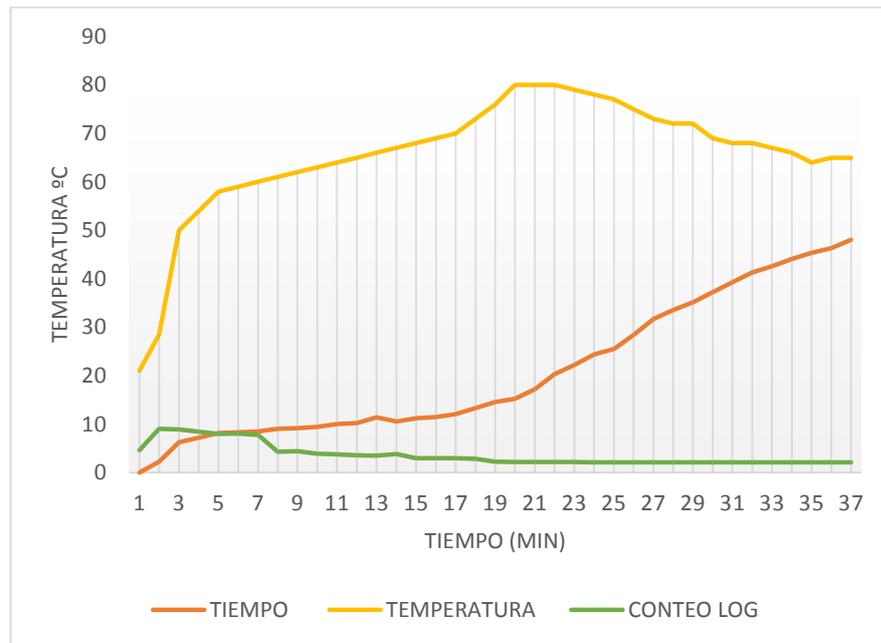
#### 3.1 Interpretación de datos

Luego de haber incubado las muestras se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 1** Prueba para Salmonela en helado de vainilla

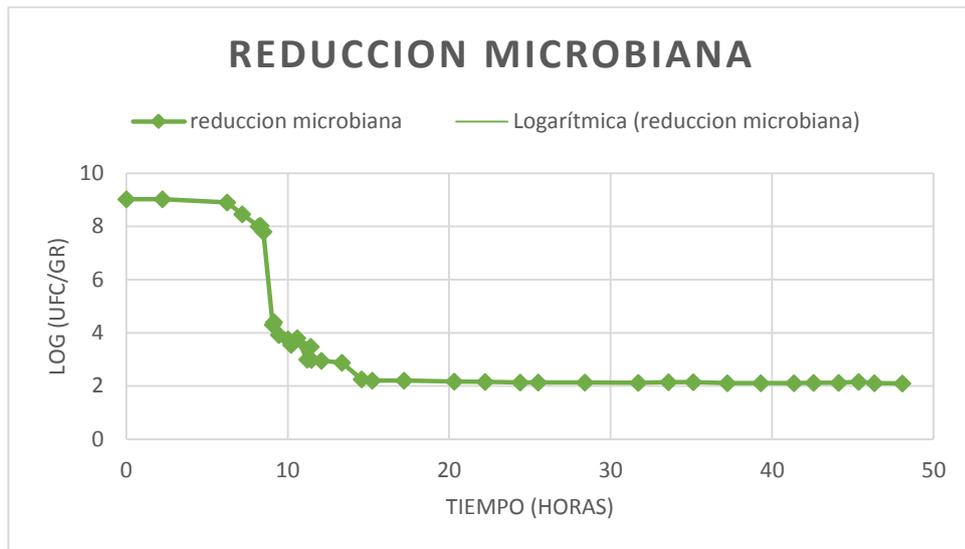
MUESTRA	TIEMPO MIN	TEMPERATURA ° C	CONTAJE Base 10 UFC/gr	CONTAJE LOG UFC/gr	PRUEBA SALMONELLA
1	0	21	1040000000	9,01703334	POSITIVA
2	2,25	28,5	1040000000	9,01703334	POSITIVA
3	6,25	50	808000000	8,90741136	
4	7,18	54	284000000	8,45331834	
5	8,2	58	101000000	8,00432137	
6	8,32	59	106000000	8,02530587	POSITIVA
7	8,5	60	63000000	7,79934055	
8	9,07	61	20000	4,30103	
9	9,16	62	25200	4,40140054	
10	9,45	63	8300	3,91907809	
11	10	64	5760	3,76042248	NEGATIVA
12	10,2	65	3600	3,5563025	
13	11,42	66	3000	3,47712125	
14	10,59	67	6440	3,80888587	
15	11,2	68	1000	3	
16	11,46	69	960	2,98227123	
17	12,09	70	900	2,95424251	
18	13,35	73	750	2,87506126	
19	14,57	76	180	2,25527251	NEGATIVA
20	15,22	80	160	2,20411998	
21	17,21	80	160	2,20411998	
22	20,3	80	150	2,17609126	
23	22,23	79	145	2,161368	
24	24,4	78	135	2,13033377	
25	25,5	77	135	2,13033377	
26	28,4	75	136	2,13353891	
27	31,7	73	134	2,1271048	
28	33,58	72	140	2,14612804	
29	35,12	72	142	2,15228834	
30	37,22	69	130	2,11394335	
31	39,3	68	128	2,10720997	
32	41,34	68	128	2,10720997	
33	42,56	67	131	2,1172713	
34	44,11	66	134	2,1271048	
35	45,35	64	143	2,15533604	
36	46,32	65	128	2,10720997	
37	48,05	65	126	2,10037055	

**Figura 3** Curva del crecimiento de *Salmonella* con respecto al tiempo y temperatura en helado de vainilla.



En la figura 3 se observa el crecimiento de la *Salmonella* mediante el conteo que se realizó en el helado de la vainilla, con respecto al tiempo y la temperatura. Para ello se realizó la pasteurización a 80°C, se observa que la cantidad de carga microbiana desciende con respecto al incremento de tiempo y temperatura.

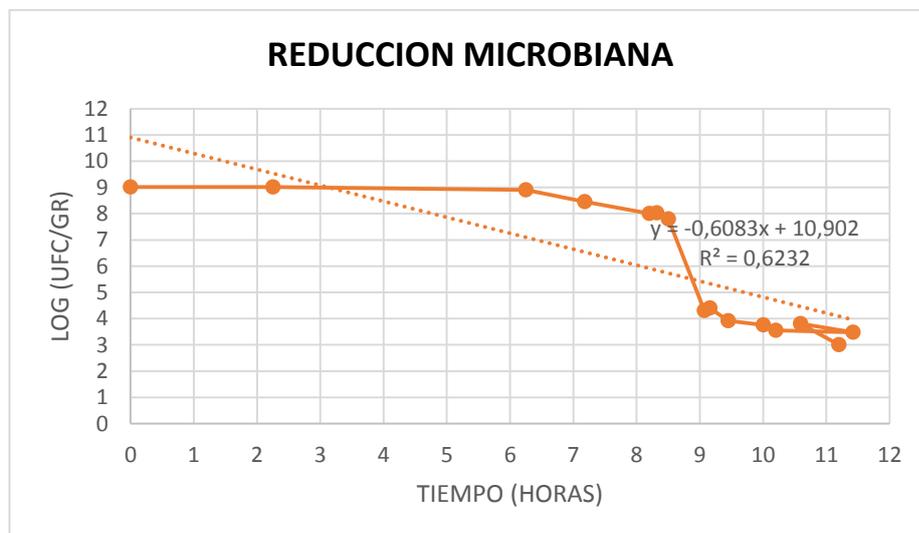
**Figura 4** Curva de la reducción microbiana de *Salmonella* para el helado de vainilla.



En la figura 4 se observa la reducción microbiana con respecto al tiempo, para el helado de vainilla.

Se presume que la cantidad microbiana que sigue quedando después del punto de inflexión del crecimiento de las bacterias, pertenece a las células vegetativas de mayor termorresistencia que irán disminuyendo conforme la temperatura sube, hasta llegar al punto de retención y su posterior enfriamiento hasta los 65°C. Finalmente se tiene una cantidad de 2.10 log de coliformes totales.

**Figura 5** Reducción microbiana con los valores más significativos de Salmonella para helado de vainilla.



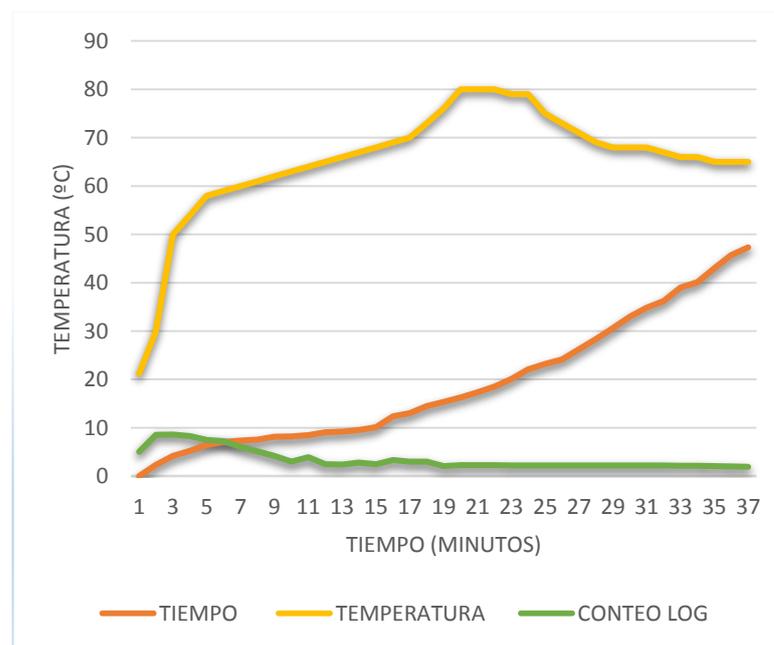
En la figura 5 se observa la caída que presenta la reducción microbiana con los valores más representativos que se obtuvieron.

**Tabla 2** Prueba para *Listeria* en helado de vainilla

MUESTRA	TIEMPO MIN	TEMPERATURA ° C	CONTAJE Base 10 UFC/gr	CONTAJE LOG UFC/gr	PRUEBA LISTERIA
1	0	21,2	348000000	8,541579244	POSITIVO
2	2,35	30	348000000	8,541579244	POSITIVO
3	4,17	50	384000000	8,584331224	
4	5,25	54	188000000	8,274157849	
5	6,45	58	29200000	7,465382851	
6	7,1	59	15600000	7,193124598	POSITIVO
7	7,32	60	1000000	6	
8	7,53	61	120000	5,079181246	
9	8,12	62	16000	4,204119983	
10	8,23	63	1040	3,017033339	
11	8,45	64	8800	3,944482672	NEGATIVO
12	9,06	65	292	2,465382851	
13	9,23	66	252	2,401400541	
14	9,55	67	630	2,799340549	
15	10,15	68	270	2,431363764	
16	12,37	69	1980	3,29666519	
17	13,06	70	940	2,973127854	
18	14,47	73	1020	3,008600172	
19	15,35	76	120	2,079181246	NEGATIVO
20	16,25	80	180	2,255272505	
21	17,31	80	180	2,255272505	
22	18,51	80	175	2,243038049	
23	20,12	79	167	2,222716471	
24	22,1	79	164	2,214843848	

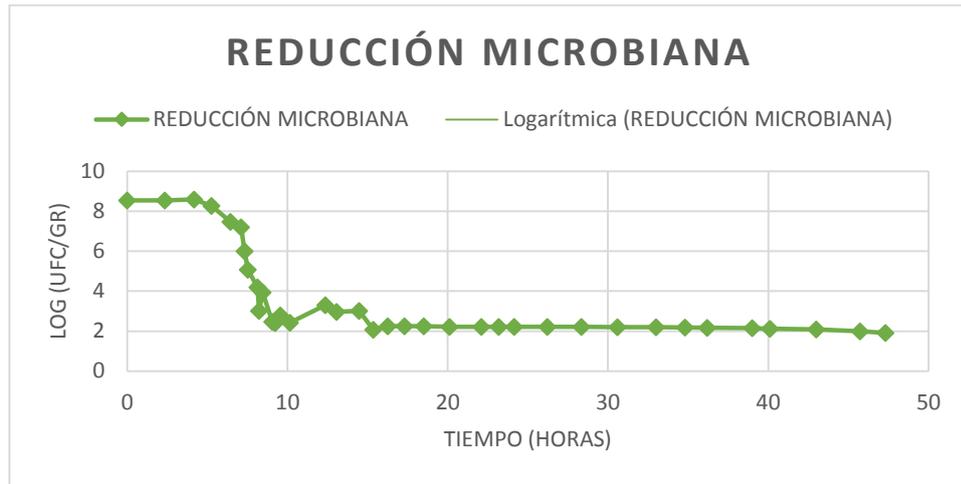
25	23,19	75	163	2,212187604
26	24,15	73	164	2,214843848
27	26,22	71	162	2,209515015
28	28,35	69	162	2,209515015
29	30,6	68	161	2,206825876
30	33	68	157	2,195899652
31	34,8	68	155	2,190331698
32	36,2	67	150	2,176091259
33	39	66	143	2,155336037
34	40,1	66	132	2,120573931
35	43	65	121	2,08278537
36	45,72	65	100	2
37	47,31	65	82	1,913813852

**Figura 6** Curva del crecimiento de *Listeria* con respecto al tiempo y temperatura en helado de vainilla.



Durante la pasteurización del helado se alcanzó una temperatura de 80° C, se observa que conforme el tiempo y la temperatura aumentan, existe la reducción de los microorganismos para *Listeria* en helado de vainilla.

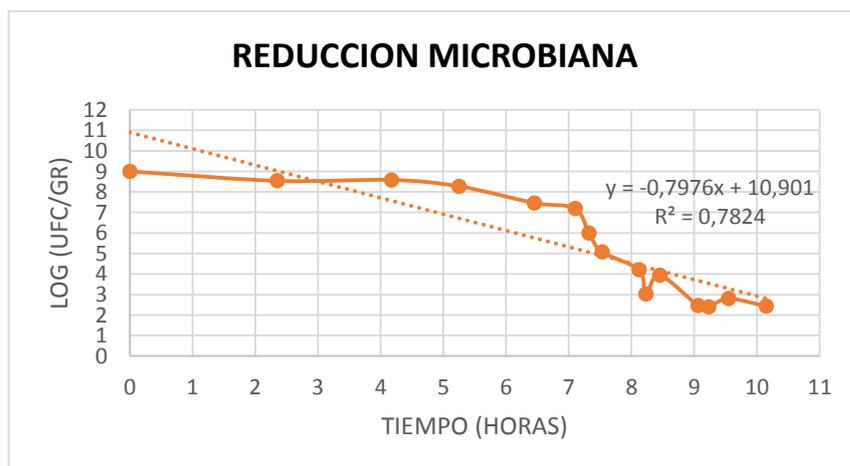
**Figura 7** Curva de la reducción microbiana de *Listeria* para el helado de vainilla.



En la figura 7 se observa la reducción microbiana con respecto al tiempo, para el helado de vainilla.

Se presume que la cantidad microbiana que sigue quedando después del punto de inflexión del crecimiento de las bacterias, pertenece a las células vegetativas de mayor termorresistencia que irán disminuyendo conforme la temperatura sube, hasta llegar al punto de retención y su posterior enfriamiento hasta los 65°C. Finalmente se tiene una cantidad de 1,91 log de coliformes totales.

**Figura 8** Reducción microbiana con los valores más significativos de *Listeria* para helado de vainilla.



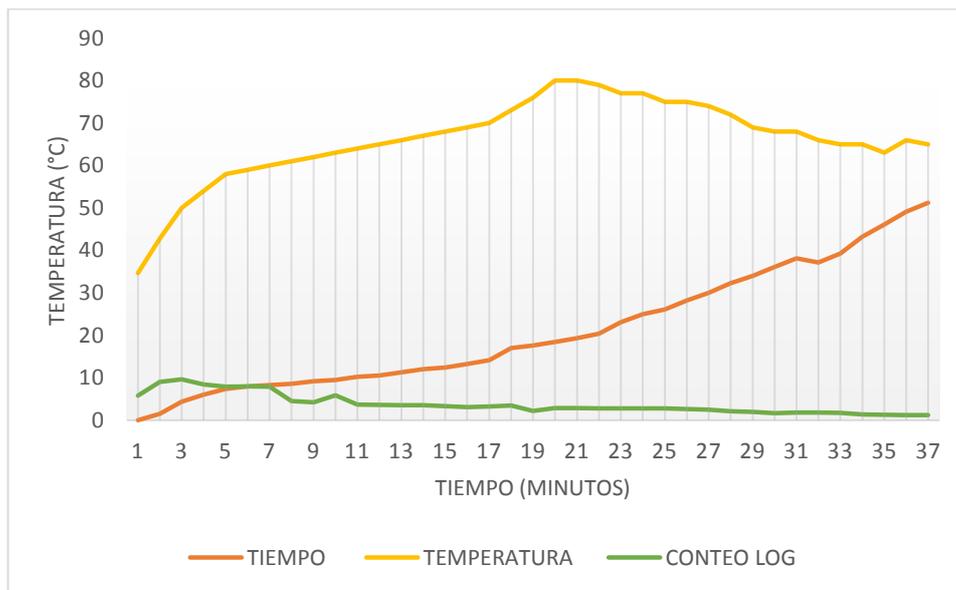
En la figura 8 se observa los valores más representativos en donde existe una mayor muerte de las bacterias con relación al tiempo.

**Tabla 3** Prueba para salmonela en helado de chocolate

MUESTRA	TIEMPO MIN	TEMPERATURA ° C	CONTAJE Base 10 UFC/gr	CONTAJE LOG UFC/gr	PRUEBA SALMONELLA
1	0	34,7	980000000	8,99122608	POSITIVO
2	1,53	42,8	980000000	8,99122608	POSITIVO
3	4,4	50	4100000000	9,61278386	
4	6,03	54	261000000	8,41664051	
5	7,35	58	84000000	7,92427929	
6	8	59	96000000	7,98227123	POSITIVO
7	8,25	60	75000000	7,87506126	
8	8,56	61	31000	4,49136169	
9	9,2	62	16100	4,20682588	
10	9,5	63	740000	5,86923172	
11	10,2	64	4660	3,66838592	NEGATIVO
12	10,53	65	4300	3,63346846	
13	11,26	66	3500	3,54406804	
14	12,02	67	3200	3,50514998	
15	12,43	68	2200	3,34242268	
16	13,27	69	1200	3,07918125	
17	14,11	70	1800	3,25527251	
18	17,02	73	3000	3,47712125	
19	17,58	76	140	2,14612804	NEGATIVO
20	18,42	80	700	2,84509804	
21	19,31	80	680	2,83250891	
22	20,4	79	660	2,81954394	
23	23,11	77	630	2,79934055	
24	25,01	77	660	2,81954394	
25	26,1	75	589	2,77011529	
26	28,23	75	432	2,63548375	

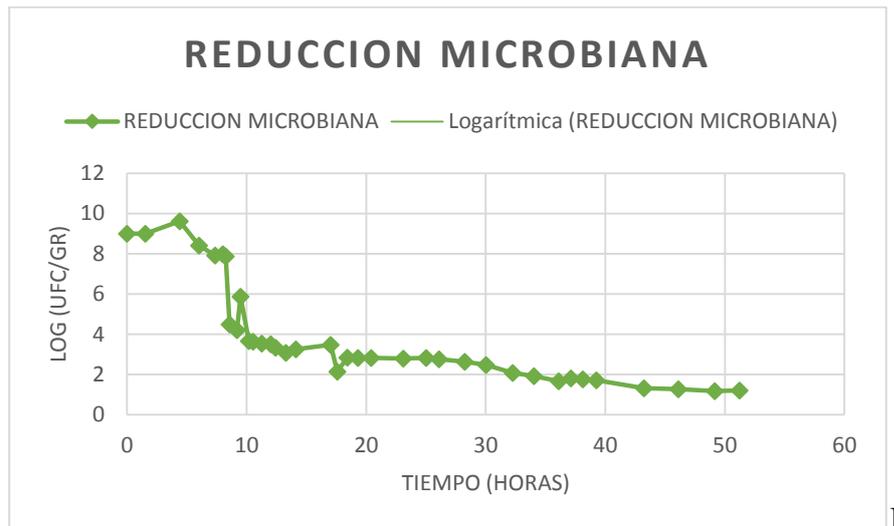
27	30,01	74	300	2,47712125
28	32,24	72	120	2,07918125
29	34,02	69	85	1,92941893
30	36,11	68	47	1,67209786
31	38,11	68	59	1,77085201
32	37,12	66	64	1,80617997
33	39,24	65	52	1,71600334
34	43,23	65	21	1,32221929
35	46,11	63	19	1,2787536
36	49,15	66	15	1,17609126
37	51,21	65	16	1,20411998

**Figura 9** Curva del crecimiento de *Salmonella* con respecto al tiempo y temperatura en helado de chocolate.



Se observa en la figura 9 la relación que existe al aumentar el tiempo y temperatura, se produce una disminución de la carga microbiana.

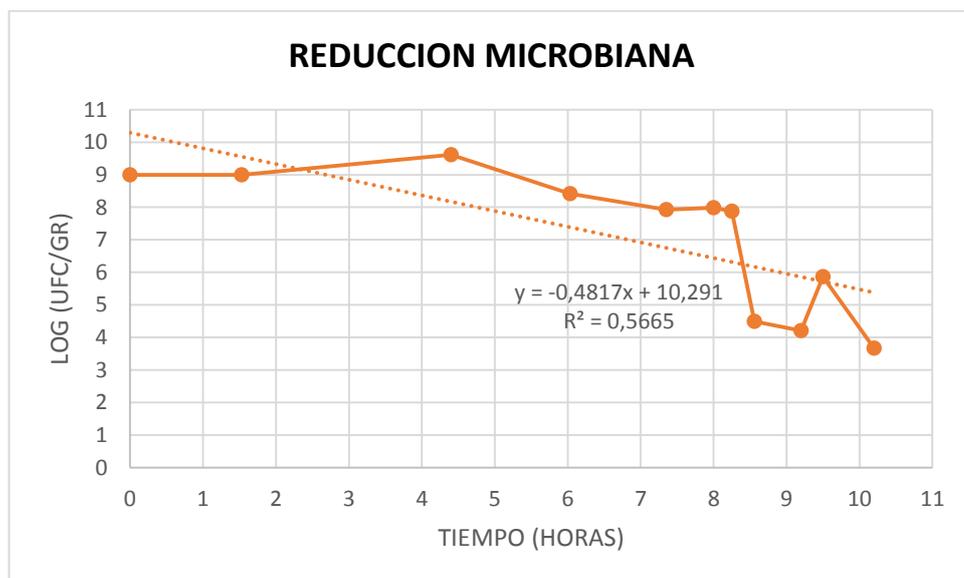
**Figura 10** Curva de la reducción microbiana de *Salmonella* para el helado de chocolate.



En la figura 10 se observa la reducción microbiana con respecto al tiempo, para el helado de chocolate.

Se presume que la cantidad microbiana que sigue quedando después del punto de inflexión del crecimiento de las bacterias, pertenece a las células vegetativas de mayor termorresistencia que irán disminuyendo conforme la temperatura sube, hasta llegar al punto de retención y su posterior enfriamiento hasta los 65°C. Finalmente se tiene una cantidad de 1,20 log de coliformes totales.

**Figura 11** Reducción microbiana con los valores más significativos de *Salmonella* para helado de chocolate.



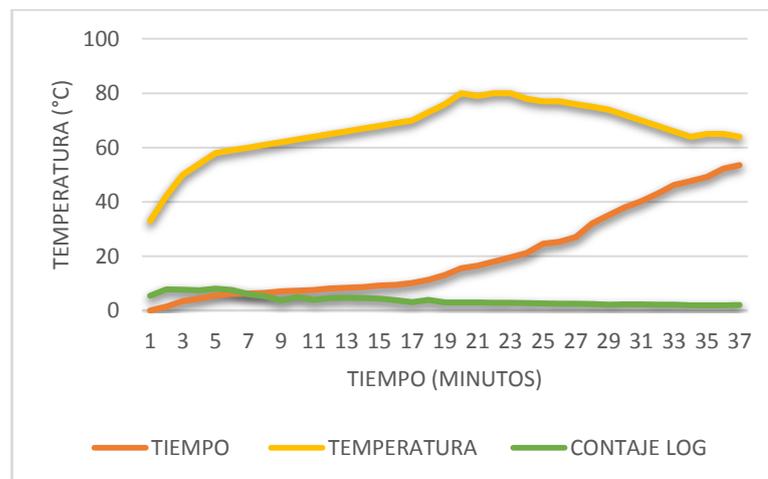
En la figura 11 se observa los valores más representativos en donde existe una mayor muerte de las bacterias con relación al tiempo.

**Tabla 4 Prueba para Listeria en helado de chocolate**

MUESTRA	TIEMPO MIN	TEMPERATURA ° C	CONTAJE Base 10 UFC/gr	CONTAJE LOG UFC/gr	PRUEBA LISTERIA
1	0	33	56000000	7,74818803	POSITIVO
2	1,39	42,2	56000000	7,74818803	POSITIVO
3	3,42	50	45600000	7,65896484	
4	4,42	54	28260000	7,45117216	
5	5,56	58	110000000	8,04139269	
6	6,15	59	34000000	7,53147892	POSITIVO
7	6,29	60	1000000	6	
8	6,52	61	180000	5,25527251	
9	7,13	62	4200	3,62324929	
10	7,31	63	99000	4,99563519	
11	7,5	64	7000	3,84509804	NEGATIVO
12	8,1	65	43000	4,63346846	
13	8,32	66	60000	4,77815125	
14	8,56	67	44000	4,64345268	
15	9,16	68	22000	4,34242268	
16	9,41	69	6400	3,80617997	
17	10,11	70	1230	3,08990511	
18	11,34	73	8200	3,91381385	
19	13,1	76	850	2,92941893	NEGATIVO
20	15,53	80	800	2,90308999	
21	16,53	79	920	2,96378783	
22	18,01	80	760	2,88081359	
23	19,54	80	730	2,86332286	

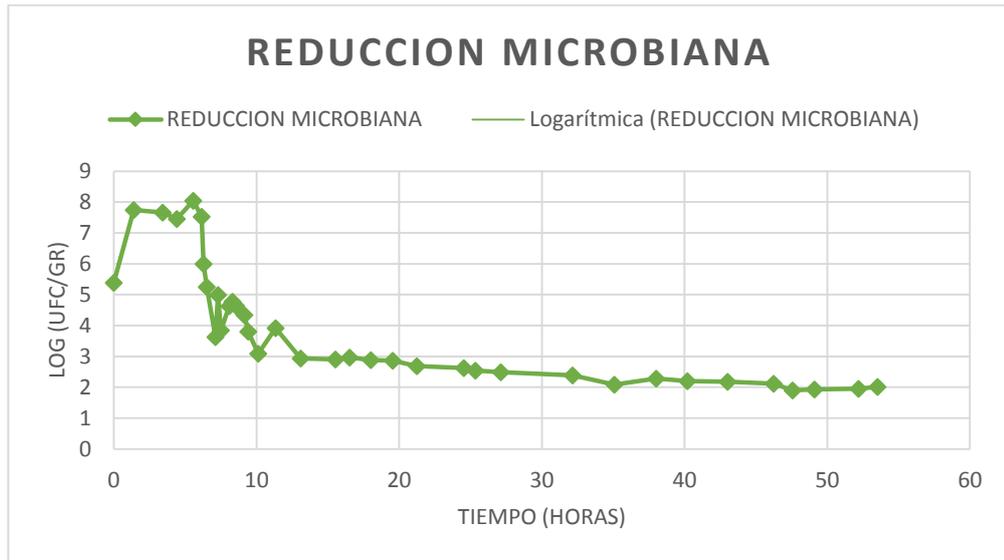
24	21,23	78	490	2,69019608
25	24,53	77	420	2,62324929
26	25,34	77	350	2,54406804
27	27,11	76	310	2,49136169
28	32,14	75	243	2,38560627
29	35,09	74	121	2,08278537
30	38,01	72	190	2,2787536
31	40,21	70	160	2,20411998
32	43,01	68	150	2,17609126
33	46,25	66	130	2,11394335
34	47,57	64	80	1,90308999
35	49,11	65	85	1,92941893
36	52,19	65	90	1,95424251
37	53,53	64	102	2,00860017

**Figura 12** Curva del crecimiento de *Listeria* con respecto al tiempo y temperatura en helado de chocolate.



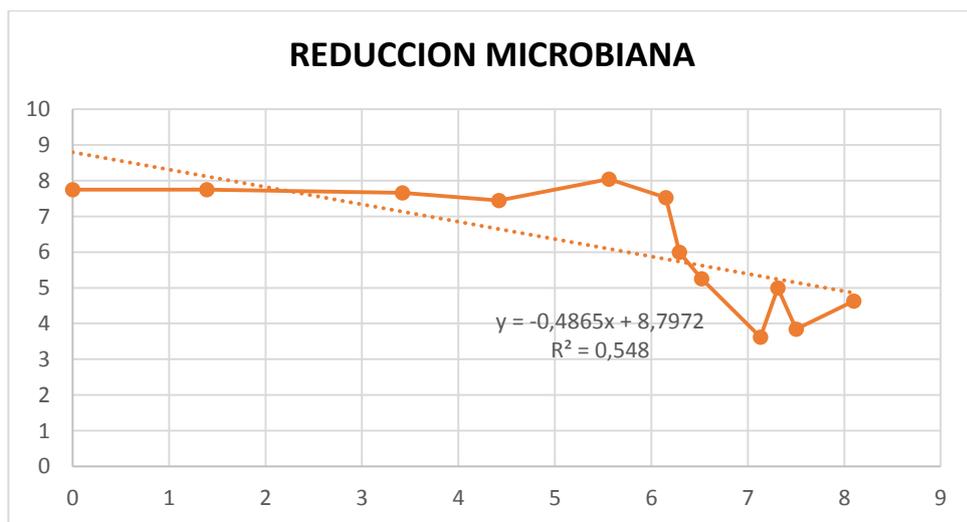
Al realizar la pasteurización del helado de chocolate se alcanzó una temperatura de 80° C, se observa en la figura12 que conforme el tiempo y la temperatura aumentan, existe la reducción de los microorganismos.

**Figura 13** Curva de la reducción microbiana de *Listeria* para el helado de chocolate.



En la figura 13 se observa la reducción microbiana con respecto al tiempo, para el helado de chocolate. Se presume que la cantidad microbiana que sigue quedando después del punto de inflexión del crecimiento de las bacterias, pertenece a las células vegetativas de mayor termorresistencia que irán disminuyendo conforme la temperatura sube, hasta llegar al punto de retención y su posterior enfriamiento hasta los 64°C. Finalmente se tiene una cantidad de 2.0 log de coliformes totales.

**Figura 14** Reducción microbiana con los valores más significativos de *Listeria* para helado de chocolate.



En la figura 14 se observa los valores más representativos en donde existe una mayor muerte de las bacterias con relación al tiempo.

### 3.2 Determinación del tiempo de reducción decimal o valor D.

Los valores de D en el proceso, son los siguientes para todos los valores obtenidos:

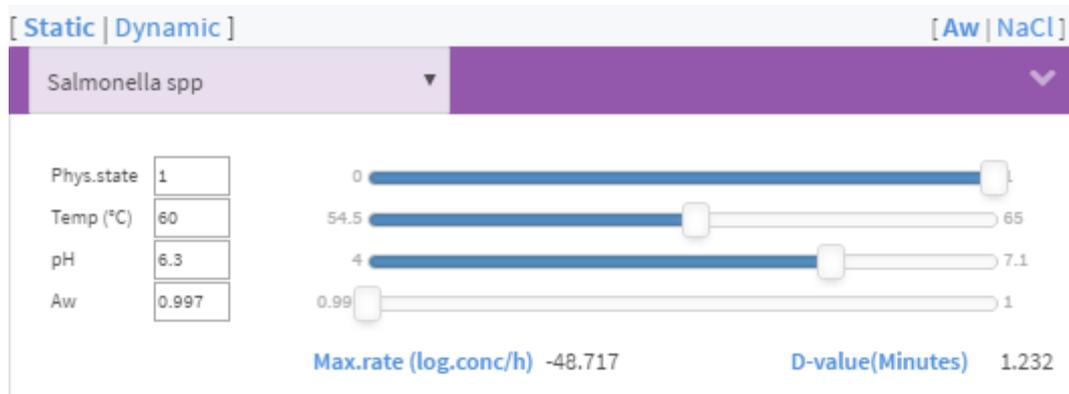
$$DT = \frac{\Delta t}{\log N_0 - \log N}$$

**Tabla 5** Determinación de valor D

<b>SALMONELLA EN HELADO DE VAINILLA</b>	$DT = \frac{1}{6,8 - 6,0}$	$DT = 1.25 \text{ min}$
<b>LISTERIA EN HELADO DE VAINILLA</b>	$DT = \frac{1}{7,8 - 7,00}$	$DT = 1.25 \text{ min}$
<b>SALMONELLA EN HELADO DE CHOCOLATE</b>	$DT = \frac{1}{7.5 - 7}$	$DT = 2 \text{ min}$
<b>LISTERIA EN HELADO CHOCOLATE</b>	$DT = \frac{1}{5,8 - 5,3}$	$DT = 2 \text{ min}$

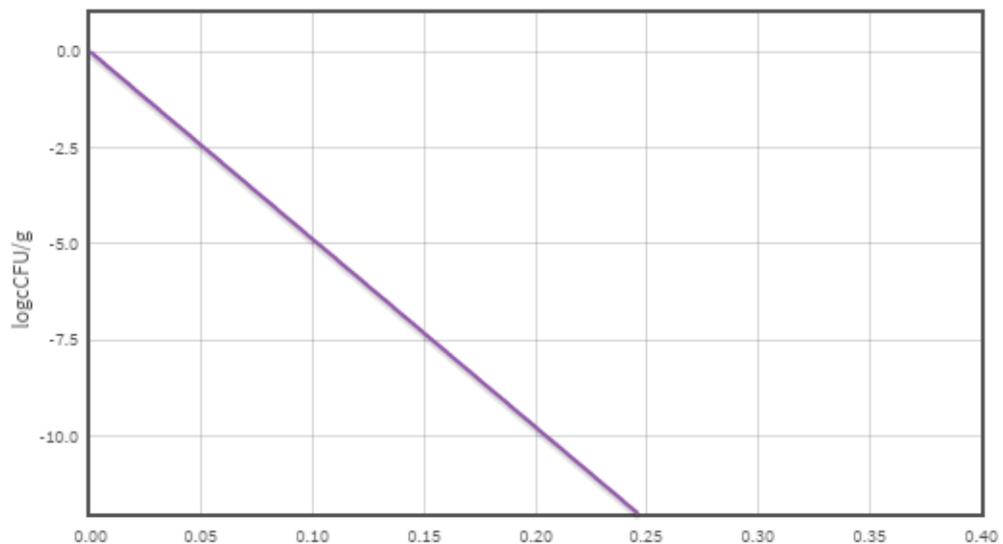
### 3.3 Interpretación de datos con el software Combase.

**Figura 15** Determinación del valor D en el predictor Combase para Salmonella en helado de vainilla

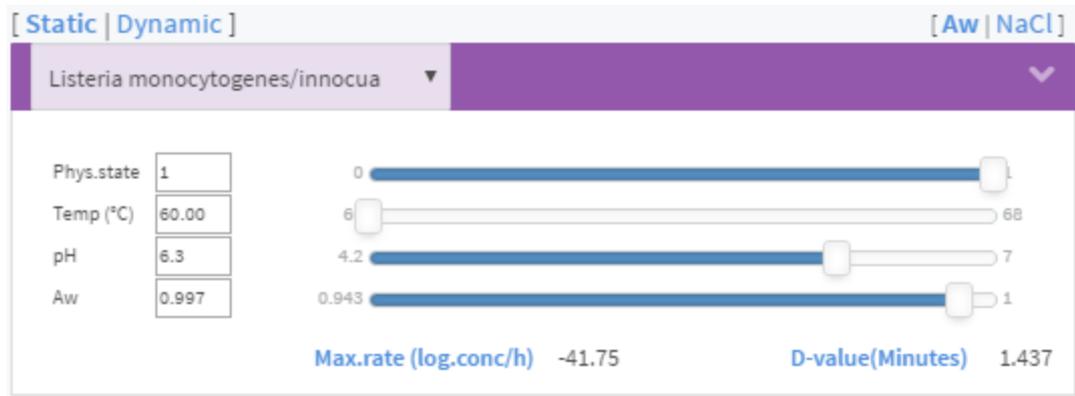


El valor calculado mediante el predictor Combase para la Salmonella en el helado de vainilla es 1.232 min, que representa el tiempo que se demora en la reducción de un logaritmo a 60 °C.

**Figura 16** Curva del modelo de inactivación térmica de Salmonella en helado de vainilla.

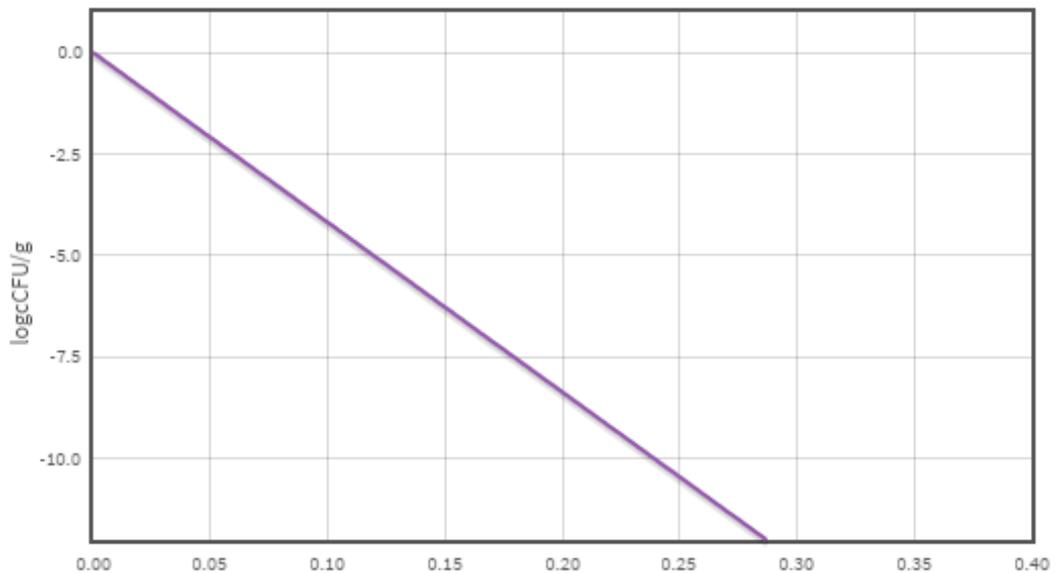


**Figura 17** Determinación del valor *D* en el predictor Combase para *Listeria* en helado de vainilla.

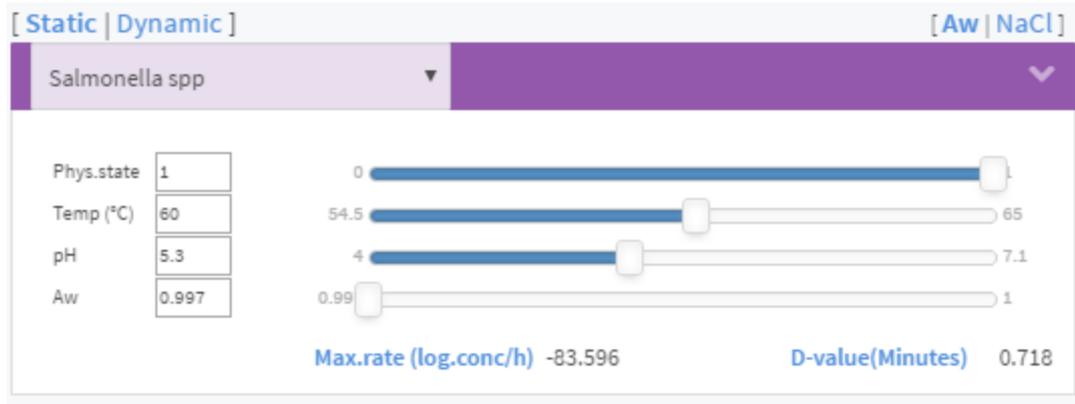


El valor calculado mediante el predictor Combase para *Listeria* en el helado de vainilla es 1.437 min, que representa el tiempo que se demora en la reducción de un logaritmo a 60 °C.

**Figura 18** Curva del modelo de inactivación térmica de *Listeria* en helado de vainilla.

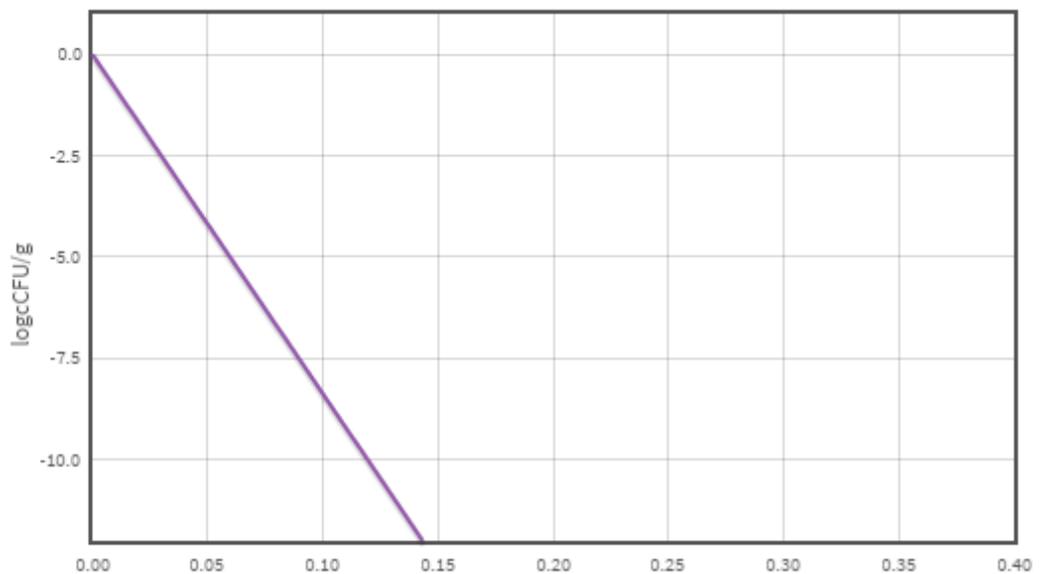


**Figura 19** Determinación del valor *D* en el predictor Combase de *Salmonella* en helado de chocolate

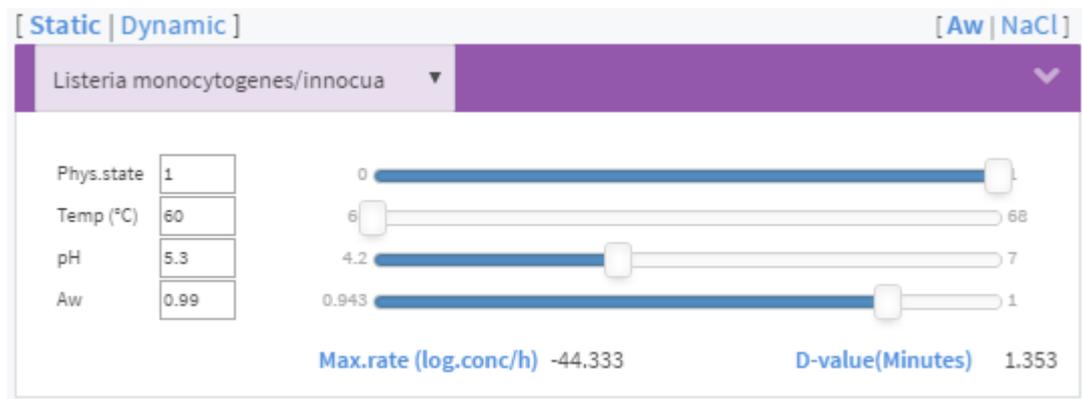


El valor calculado mediante el predictor Combase para la Salmonella en el helado de chocolate es 0.718 min, que representa el tiempo que se demora en la reducción de un logaritmo a 60 °C.

**Figura 20** Curva del modelo de inactivación térmica de Salmonella en helado de chocolate.

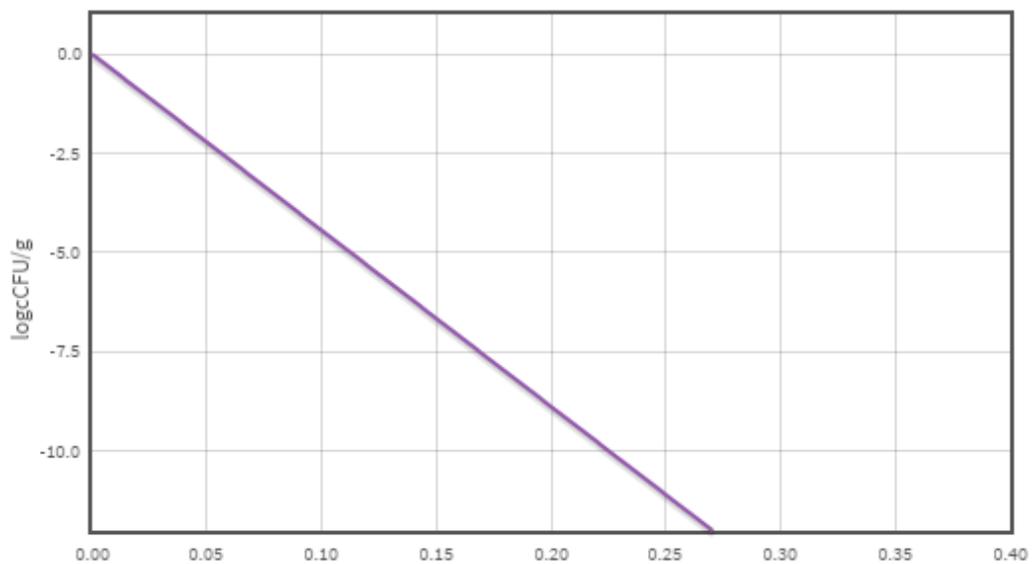


**Figura 21** Determinación del valor *D* en el predictor Combase de *Listeria* en helado de chocolate.



El valor calculado mediante el predictor Combase para la *Listeria* en el helado de chocolate es 1.353 min, que representa el tiempo que se demora en la reducción de un logaritmo a 60 °C.

**Figura 22** Curva del modelo de inactivación térmica de *Listeria* en helado de chocolate.



	<b>CALCULADO POR FORMULA</b>	<b>CALCULADO COMBASE</b>
<b>SALMONELLA EN HELADO DE VAINILLA</b>	1.25	1.232
<b>LISTERIA EN HELADO DE VAINILLA</b>	1.25	1.437
<b>SALMONELLA EN HELADO DE CHOCOLATE</b>	2	0.718
<b>LISTERIA EN HELADO CHOCOLATE</b>	2	1.353

**Tabla 6** Comparación de valor *D* por fórmula y mediante ComBase.

### 3.4 Discusión.

De acuerdo al sistema predictivo de inactivación microbiana ComBase, el valor de termodestrucción (*D*) a 60° C para los helados de vainilla es de 1.232 y 1.437 para las bacterias de Salmonella y Listeria respectivamente, en los helados de chocolate se obtuvo los valores de 0.718 para Salmonella y 1.353 para la Listeria, estos valores nos indican el tiempo que se demora para que exista la caída de un log, mientras que los valores de *D* calculados en el proceso de pasteurización por la fórmula fueron de 1,25 para las dos bacterias en el sabor de vainilla y 2,00 tanto en la Salmonella como en la Listeria en el helado de chocolate. Con los valores obtenidos tanto en el software ComBase y por la fórmula se demuestra que el valor del tiempo de

destrucción decimal para las bacterias Salmonella y Listeria son correctos, considerando las variaciones en el proceso D para las dos bacterias en el helado de chocolate aumenta, debido a la densidad y viscosidad que es mayor que el de vainilla.

## CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en la presente investigación: “Validación de la penetración de calor en la pasteurización de helado de chocolate y vainilla producidos industrialmente, en un pasteurizador Pasto 180 Telme de la Fabrica Tutto Freddo, se plantean las siguientes conclusiones:

Se realizó la toma de 20 muestras en cada uno de los lotes para las dos cepas inoculadas, en cada una se fue comprobando la disminución de la carga microbiana, según aumentó la temperatura y el tiempo.

Se realizó el análisis microbiológico de los helados de chocolate y vainilla procedente de la pasteurización de la pasteurizadora Telme 180 de la fábrica de Helados Tutto Freddo, se comprobó que las cargas microbianas de los helados cumplen con la norma NTE INEN 706: 2013 Helados Requisitos. **Anexo 3.**

Además se comprobó que el helado sabor chocolate tiene una carga microbiana más alta que el helado de vainilla.

Se inocularon las bacterias activadas en la mezcla de los ingredientes de helado, se realizó el contaje microbiológico para saber la carga que se inoculó y se comprobó la reducción logarítmica de estas según la temperatura y tiempo aumentaron.

Se realizó la toma de muestra a los 8,32 minutos que se alcanzó una temperatura de 60°C para Salmonella, en donde se comprobó que la bacteria a esa temperatura aún sigue presente en la mezcla, a los 10 minutos se llegó a una temperatura de 64°C, a esta temperatura se verifica que la bacteria ya no está presente, por lo cual se demuestra que esta temperatura es adecuada para la inactivación de esta.

En la caso de la Listeria se toma la muestra a los 7,10 minutos de iniciar el proceso de pasteurización, a este tiempo se alcanza una temperatura de 60°C, en estas condiciones la Listeria aún se encuentra presente en la mezcla de helado. De la misma manera, se tomó otra muestra a los 8,45 minutos, donde se alcanzó una temperatura de 64°C, donde el método de análisis demuestra que ya no existe presencia de la bacteria inoculada.

La validación con los métodos de análisis rápido para Listeria y Salmonella han demostrado que las temperaturas y tiempos usados para la pasteurización de los

helados de vainilla y Salmonella son adecuados, por lo cual para una posible contaminación de los productos con estas dos bacterias, el proceso de pasteurización que actualmente se realiza sería suficiente para garantizar la no presencia e inocuidad del producto final.

## BIBLIOGRAFIA

- Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria, Laboratorio del EBRO. Validación de procesos térmicos y requisitos técnicos para la exportación a EEUU. Recuperado el 18 Julio de 2015, de <http://www.cnta.es/servicios/catalogos.php>
- BADUI S, (2006). Química de los alimentos. 4ta. Edición. Editorial Pearson.
- BENÍTEZ R, Ibarz A, Pagan J. (2008) Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. ISSN 1851-6114 en línea.
- DOYLE, M. (2001). "Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.
- FRAZIER, W.C., Westhoff, D.C. (1993) Microbiología de los alimentos. 4a ed. Zaragoza, Acribia, 681 p
- Instituto Ecuatoriano de Normalización - INEN. (1999). NTE INEN 1529-2: 99: CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS TOMA, ENVÍO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO. Quito, Ecuador.
- MADIGAN, M.T (2003) Brock Biología de los microorganismos 10a ed. Madrid, PearsonPrentice Hall 1096p
- ORREGO C. (2003). Procesamiento de alimentos, 1era ed., Colombia 148p.
- PALACIOS A. (2011). "Evaluación y adecuación de un tanque con agitador y chaqueta de vapor de 0,9m para la pasteurización de 880 kg de pulpa de fruta". Guayaquil, Guayas, Ecuador.
- ROSALES Y, Díaz Cándida, (Julio-Septiembre 2006). Evaluación de la calidad Microbiológica de Helados Caseros. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- STACHI, N.O. (2007) Microbiología Veterinaria. Buenos Aires, Intermédica 571p
- ThermoequiposCA (2005) (On Line). Equipos de Transferencia de Calor [http://www.thermoequipos.com.ve/pdf/articulo\\_03/pdf](http://www.thermoequipos.com.ve/pdf/articulo_03/pdf)

## ANEXOS

### Anexo 1 *KIT RAPIDO DE DETECCION DE SALMONELLA*

#### #9803: Dos pasos de enriquecimiento (Revive y RV)

#### Reveal 2.0 for *Salmonella* Procedure

*Most Food Samples (using Revive/RV media)*



1. Rehydrate Revive® pre-enrichment media with 200 mL of sterile water pre-warmed to  $42 \pm 1^\circ\text{C}$ .



2. Add sample. Incubate at  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  for 4 hours.



3. Rehydrate 2x RV selective enrichment with 200 mL of sterile water pre-warmed to  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ .



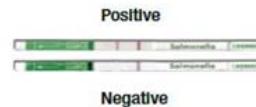
4. Add prepared 2x RV to pre-enriched sample. Incubate at  $42 \pm 1^\circ\text{C}$  for 16–24 hours.



5. Transfer 200  $\mu\text{L}$  or 8 drops to the Reveal sample cup.



6. Place Reveal device with sample arrows facing down into the sample cup.



7. Read and record results after 15 minutes.

Anexo 2 KIT RAPIDO DE DETECCION DE LISTERIA

**Reveal 2.0 for *Listeria* Procedure**  
*Environmental Samples*

**#9806: Para Muestras Ambientales**



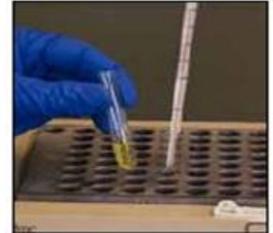
1. Rehydrate 7.8 g LESS media with 100 mL of sterile water.



2. Place environmental sample in rehydrated media and incubate 27–48 hours at  $30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .



3. Remove sample from incubator, mix well and transfer approximately 2 mL into small glass tube.



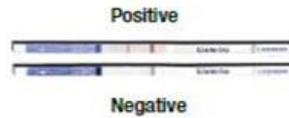
4. Place the glass tube in a water bath or heater block at  $80^{\circ}\text{C}$  for 20 minutes.



5. Transfer 200  $\mu\text{L}$  of heat-killed, enriched sample to the Reveal sample cups.



6. Place Reveal device with sample arrows facing down into sample cup and incubate at ambient temperature for 20 minutes.



7. Read and record results after 20 minutes.

**Anexo 3 NORMA INEN DEL HELADO**



Quito - Ecuador

---

**NORMA TÉCNICA ECUATORIANA**

**NTE INEN 706:2013**  
**Segunda revisión**

---

**HELADOS. REQUISITOS.**

**Primera edición**

ICE CREAM. REQUIREMENTS.

First edition

---

DESCRIPTORES: Tecnología de los alimentos, leche y productos lácteos, helados, requisitos.  
AL 03.01-430

**6.1.2 Requisitos microbiológicos.** Los helados y mezclas para helados concentrada o líquida deben cumplir con los requisitos microbiológicos indicados en la tabla 2.

**TABLA 2. Requisitos microbiológicos para helados y mezclas para helados concentrada o líquida**

Requisitos	n	m	M	c
Recuento de microorganismos mesófilos <sup>1)</sup> , ufc/g	5	10 000	100 000	2
Recuento de Coliformes, ufc/g	5	100	200	2
Recuento de E. Coli, NMP/g	5	<3	<10	0
Recuento de Staphylococcus coagulasa positiva, ufc/g	5	<10	<10	2
Detección de Salmonella/25g	5	Ausencia	Ausencia	0
Detección de Listeria monocytogenes/25g	5	Ausencia	Ausencia	0

<sup>1)</sup> El recuento de microorganismos mesófilos no se realiza en el helado de yogur.

Donde:

n= número de muestras por examinar  
 m = nivel de aceptación  
 M = nivel de rechazo  
 c = número de muestras defectuosas que se acepta

**6.1.2.1 Requisitos microbiológicos de las mezclas en polvo para helados.** Las mezclas en polvo para helados deben cumplir con los requisitos microbiológicos indicados en la tabla 3.

**TABLA 3. Requisitos microbiológicos para mezclas en polvo para helados**

Requisitos	n	m	M	c
Recuento de microorganismos mesófilos , ufc/g	5	10 000	100 000	2
Recuento de Coliformes, ufc/g	5	10	100	2
Recuento de E. Coli, NMP/g	5	Ausencia	Ausencia	0
Recuento de mohos y levaduras, upml /g	5	200	1000	2
Detección de Salmonella/25g	5	Ausencia	Ausencia	0
Bacillus cereus ufc/g	5	100	1 000	2

Donde:

n= número de muestras por examinar  
 m = nivel de aceptación  
 M = nivel de rechazo  
 c = número de muestras defectuosas que se acepta

## 6.2 Requisitos complementarios

### 6.2.1 Higiene

**6.2.1.1** Se recomienda que los productos contemplados en las disposiciones de la presente norma se preparen y manipulen de conformidad con lo establecido en la Legislación Nacional Vigente sobre Buenas Prácticas de Manufactura para Alimentos Procesados o en las secciones correspondientes del Código Internacional de Prácticas Recomendado de Principios Generales de Higiene de los Alimentos (CAC/RCP 1-1969, Rev. 3-1997), y en otros textos pertinentes del Codex Alimentarius.

Anexo 3 GRÁFICOS

