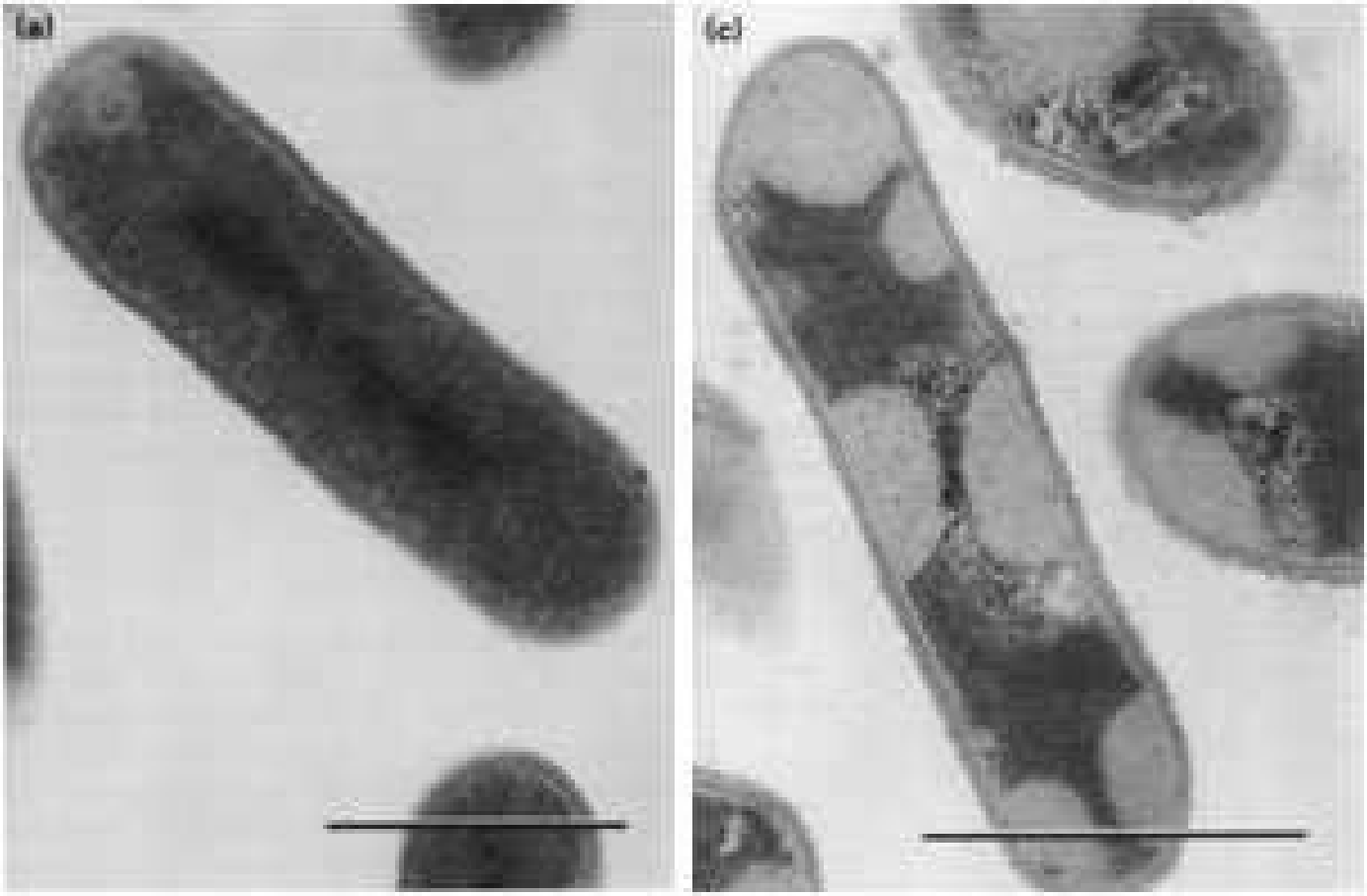
Aliments sota pressió



Estudi microbiològic del tractament en altes pressions del "Lacón"

ÍNDEX

0. Introducció..... 3

1. Objectius..... 6

2. Part teòrica..... 7

2.1 Microorganismes..... 7

2.1.1 Definició de bacteri..... 8

2.1.2 Tipus de bacteris.....9

2.1.3 Característiques dels bacteris estudiats..... 10

2.1.4 Medis de cultiu..... 14

2.2 Apartat fisiquicoquímic..... 17

2.3 Envasos utilitzats en altes pressions..... 19

2.4 Procés d'altes pressions (HPP)..... 20

3. Part pràctica.....27

3.1 Protocol.....27

3.2 Metodologia..... 28

3.2.1 Material..... 28

3.2.2 Reactius..... 28

3.2.3 Preparació de la mostra..... 29

3.2.4 Preparació i ús dels mètodes de cultiu..... 30

4. Resultats i valoració.....38

4.1 Resultats de l'estudi microbiològic del LHCM tractat en altes pressions..... 38

5. Conclusions..... 46

6. Bibliografia.....50

7. Agraïments.....52

0. INTRODUCCIÓ

El meu treball de recerca, sobre productes alimentaris d'origen carnienvasats sotmesos a altes pressions atmosfèriques, es basa en detectar si aquest tractament és capaç de reduir la seva flora bacteriana i si permet que l'aliment allargui el seu temps de vida útil mantenint les seves propietats organolèptiques i microbiològiques òptimes el màxim de temps possible. L'estudi es concreta en l'anàlisi microbiològica del producte "Lacón al horno cortado a mano" sense tractar en altes pressions i tractat durant 3, 4 i 6 minuts.

La idea d'aquest projecte ve del treball de recerca de batxillerat de Tomàs Boix Bonfill, el meu germà, realitzat durant el curs 2007-2008. En *Casolà o industrial? Estudi organolèptic i microbiològic de la vida útil del pernil cuit*, estudiava l'envàs més eficaç per mantenir les propietats organolèptiques i microbiològiques inicials del pernil cuit llescat durant el màxim de temps possible. A partir de les anàlisis microbiològiques i organolèptiques exposava, entre d'altres, les següents conclusions:

- El sistema de conservació més eficaç des del punt de vista microbiològic per a la conservació del pernil cuit llescat és l'envàs al buit tractat en altes pressions durant 6 minuts.

- El sistema de conservació més eficaç per mantenir les propietats organolèptiques i morfològiques del pernil cuit llescat és l'envàs al buit tractats en altes pressions durant 2, 4 i 6 minuts.

Quan en Tomàs va fer el seu treball explicava que el tractament d'aliments en altes pressions estava encara en fase experimental. Aleshores s'utilitzaven pressions de només 5500 Bars, en una màquina de cost molt elevat, que només servia, en el cas de l'estat espanyol, per poder exportar alguns productes (normalment pernil salat) a països llunyans. Els principals inconvenients d'aquest sistema eren, a part del seu alt cost, la poca resistència dels envasos a les altes pressions i la petita capacitat de la màquina.

En l'interval d'aquests quatre anys, aquesta tecnologia ha evolucionat molt i ha esdevingut un procés industrial normalitzat. En aquest punt, he concretat el meu treball.

Per a l'estudi he utilitzat el producte de l'empresa NOEL ALIMENTÀRIA, SAU "Lacón al horno cortado a mano", un aliment derivat del porc, que es comercialitza cuit i llescat manualment. NOEL no té aquest producte en el catàleg general de l'empresa perquè el produeix en exclusiva per a MERCADONA, una empresa de distribució dins del segment dels supermercats. És un aliment que en origen pertany a la mateixa gamma que el pernil cuit i que es produeix a la planta NOEL 1 de l'empresa, a Begudà. El producte està envasat al buit en atmosfera modificada, que és un procés mitjançant el qual s'extreu tot l'aire de dins l'envàs, s'hi introdueix una mescla de gasos i, tot seguit, es segella amb una altra capa de plàstic.

Imatge comercial del producte

L'aliment s'ha sotmès al tractament en altes pressions a lafàbrica Riera, a Sant Esteve d'en Bas. En aquesta fàbrica és on actualment està instal·lada la màquina d'altes pressions *Hiperbaric*, que utilitza l'empresa NOEL i altres empreses, que s'han unit per a la seva utilització i manteniment. El producte s'ha sotmès a les altes pressions durant 3, 4 i 6 minuts, després d'haver descartar el període de 2 minuts per inefectiu.

Posteriorment, s'ha analitzat el producte al laboratori, situat a la planta NOEL 1, en diferents intervals de temps fins a la data de consum preferent (35 dies).

S’han fet cultius,en mostres de control i en mostres del producte tractat 3, 4 i 6 minuts en altes pressions, de microorganismes que es troben a la carn i que poden provocar malalties a les persones: aerobis totals, enterobacteris, lactobacils, *Staphylococcus aureus*, Clostridis sulfit-reductors, Salmonel·la i *Listeria monocytogenes*.

Les anàlisis s’han fet amb la següent periodicitat:

Els dies 5, 13, 21, 27 i 34 després del tractament d’altes pressions, per tal d’abastar tot el temps de vida útil del producte.

Finalment, s’han comparat tots els resultats de les anàlisis per obtenir una conclusió final que ens indicarà si el tractament en altes pressions ha estat eficaç i, si és així, quin dels tres temps de tractament és més rendible, a nivell de cost del procés industrial i de reducció dels microorganismes.

He plantejat una**pregunta inicial**:

- És eficaç, des del punt de vista microbiològic, el tractament en altes pressions per allargar la vida útil dels aliments?

També he plantejat algunes **hipòtesis**:

- Els aliments no tractats en altes pressions presenten uns recomptes microbiològics molt més elevats que els aliments tractats en altes pressions.

- El tractament en altes pressions durant 6 minuts és el més rendible a nivell de reducció del cost industrial i a nivell de reducció de microorganismes.

1. OBJECTIUS

He plantejat, finalment, uns **objectius** per respondre les preguntes inicials, tenint en compte totes les variables que intervenen en aquest estudi:

- Conèixer i entendre el funcionament del tractament de productes alimentaris en altes pressions.

- Conèixer quines són les característiques que determinen que un producte és apte o no per ser tractat en altes pressions.

- Conèixer les característiques dels envasos adequats per al tractament de productes alimentaris en altes pressions.

- Conèixer els microorganismes que s’estudien, així com els medis i mètodes per tractar-los al laboratori.

- Aprendre a fer l’estudi microbiològic del “Lacon al horno cortado a mano”, durant el període d’estada a l’empresa (juny-juliol 2012).

- Analitzar l’evolució microbiològica de la vida útil del producte sotmès i no sotmès a altes pressions.

- Analitzar la presència i els recomptes de bacteris patògens en el producte sotmès i no sotmès a altes pressions.

- Analitzar quins bacteris queden més afectats per les altes pressions.

- Valorarquin dels tractaments (3, 4 i 6 minuts) és més eficaç en la reducció de microorganismes.

- Valorar quin dels tractaments (3, 4 i 6 minuts) dóna millor rendiment en la reducció del cost industrial i alhora de microorganismes.

Els resultats de l’estudi han de permetre contestar els objectius establerts i obtenir els aprenentatges proposats.

2. PART TEÒRICA

2.1 MICROORGANISMES

Els microorganismes són éssers vius que no poden ser observats a ull nu. És necessari utilitzar un microscopi òptic o electrònic per poder-los visualitzar, ja que són organismes unicel·lulars, és a dir, formats per una sola cèl·lula. Els microorganismes poden pertànyer a tres regnes diferents, segons les seves característiques: moneres, protoctists i fongs. I s'ha de tenir present que no tots els éssers vius que pertanyen als regnes dels protoctists i dels fongs són unicel·lulars.

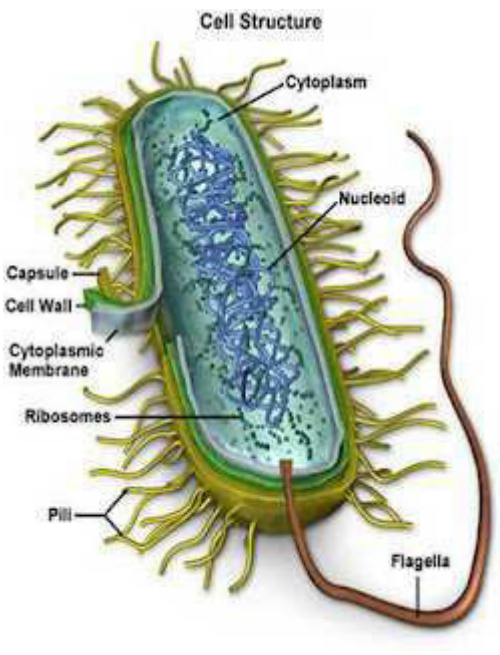
La presència dels microorganismes en el medi té una importància rellevant perquè, per una banda, poden tenir efectes negatius per a la salut ja que algunes espècies de microorganismes,els anomenats patògens, poden causar malalties com la malària, el còlera o la tuberculosi. Aquests bacteris patògens es poden trobar en els aliments, entre ells els càrnics, i poden contaminar-los i posteriorment, al ser ingerits, intoxicar al consumidor del producte. Però els microorganismes també poden ser molt beneficiosos per als humans en moltsaspectes, com en la producció d'antibiòtics com el fong *Penicillium*, en la depuració d'aigües o en processos de fermentació industrial com els de la fermentació de l'àcid làctic, de l'àcid acètic o de l'etanol, i també serveixen per fer controls microbiològics dels aliments.

Fong *Penicillium* en funció d'antibiòtic

Aquest treball es basa en l'estudi de la presència i en la quantitat de microorganismes que poden alterar o intoxicar la carn.Els microorganismes capaços de fer això formen part del regne de les moneres, i són els bacteris.

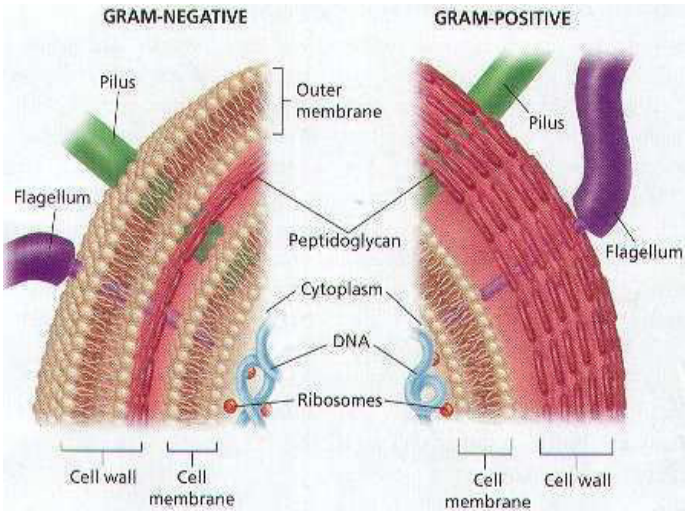
2.1.1 DEFINICIÓ DE BACTERI

Els bacteris són microorganismes del regne de les moneres, ja que tots són unicel·lulars i procariotes i tenen unes dimensions d'entre 1 i 3 micròmetres.Morfològicament poden ser bacils i vibrions(forma cilíndrica), cocs (forma esfèrica) i espirils (forma de tirabuixó). La cèl·lula procariota dels bacteris es diferencia d'una d'eucariota per la seva simplicitat i perquè l'ADN bicatenari circular dels bacteris no es localitza dins de cap nucli.



Estructura interna d'un bacteri

Tots els bacteris contenen paret cel·lular, que és la que dóna rigidesa a la cèl·lula procariota, i la que permet diferenciar els bacteris entre ells.Així, segons si tenen o no paret de peptidoglicà, els bacteris es podenclassificar en arqueobacteris o en eubacteris.



Parets cel·lulars dels eubacteris

Dins dels eubacteris, que tenen paret cel·lular de peptidoglicà, podem diferenciar els bacteris gram positiu, que tenen una sola capa gruixuda de peptidoglicà, dels bacteris gram negatiu, que tenen una capa externa de lípids i una capa fina de peptidoglicà. Així mateix, alguns bacteris contenen càpsula, especialment els bacteris patògens.

Fisiològicament, els bacteris són molt diversos i presenten diferents formes de nutrició. Poden ser fotoautòtrofs, fotoheteròtrofs, quimioautòtrofs, quimioheteròtrofs o fermentadors. Els bacteris es reprodueixen gràcies a la bipartició, que és un procés asexual que forma dues cèl·lules filles idèntiques entre elles.

Els bacteris es relacionen amb el medi a través de la mobilitat i també amb la formació d’espores, que consisteix en el desenvolupament d’estructures de resistència del bacteri per suportar condicions adverses del medi, com les altes temperatures. Les espores tenen la capacitat de germinar, és a dir, de crear nous bacteris i, a més, quan les condicions del medi milloren, el bacteri desfà l’espora.

La capacitat de formació d’espores que caracteritza els bacteris és molt important en la indústria alimentària perquè obliga a aplicar fortes mesures per eliminar les espores bacterianes dels productes que en poden estar contaminats i,també,per evitar-ne la germinació.

2.1.2TIPUS DE BACTERIS

En l’estudi microbiològic es tracten els bacteris que es poden trobar en els productes càrnics, en concret, en el producte cuit “Lacón al horno cortado a mano”. S’analitzenels bacteris més comuns i que més poden ajudar a conèixer l’estat i la contaminació del producte:

- Bacteris indicadors: aerobis totals, enterobacteris i lactobacils.

- Bacteris patògens: Clostridis sulfit-reductors, *Staphylococcus aureus*,Salmonel·lai *Listeria monocytogenes*.

2.1.3 CARACTERÍTIQUES DELS BACTERIS ESTUDIATS

Bacteris indicadors

Són els microorganismes que, després de ser estudiats i quantificats, aporten dades sobre les condicions del producte, sobre el seu grau d'acompliment de les normes de seguretat sanitària o sobre el grau d'higiene durant el seu procés de producció.Els bacteris indicadors estudiats i quantificats en aquest estudi són els següents:

Aerobis totals

Aquests tipus de bacteris indicadors s'obtenen fent un recompte del total dels microorganismes que creixen en presència d'oxigen en el medi. És un recompte inespecífic perquè no determina el tipus concret de microorganisme. La finalitat de la quantificació dels aerobis totalsés determinar l'estat en què es troba l'aliment i si el procés de producció i manipulació del producte ha estat higiènic.

Per ell mateix, aquest estudi no permet saber si el producte està contaminat o si conté bacteris patògens o toxines. Malgrat que hi hagi pocs aerobis en el medi, no podem assegurar que el producte no estigui contaminat i, en tot cas, uns valors iguals o superiors a 10^6 o 10^7 d'aerobis, assenyalen que l'aliment es troba en procés de descomposició.

Enterobacteris

El recompte d'enterobacteris s'utilitza per indicar la contaminació fecal del producte i, per tant, si la seva qualitat sanitària és l'adequada.La presència d'aquests tipus de bacteris assenyala, en general, si les condicions higièniques i de neteja en el procés de producció del producte han estat correctes. Aquesta mostra també és inespecífica, doncs no permet saber el tipus de bacteri fecal que hi ha crescut.

En el cas dels productes cuits, la presència d'enterobacteris significa que la cocció ha estat insuficient o que s'ha produït una contaminació posterior en el producte durant el canvi de bossa o en la superfície de llescat.

Lactobacils

El recompte de bacteris fermentadors de la lactosa a àcid làctic és inespecífic perquè no permet distingir-ne el tipus. Uns valors elevats de lactobacils indiquen que el procés de producció no ha estat correcte i provoquen acidesa en el producte així com una pèrdua de la seva qualitat òptima.

En els productes cuits la presència de lactobacils es deu a una cocció deficient o a una contaminació posterior a aquest procés.

Bacteris patògens

Són microorganismes que es troben en els aliments que ingerim i que tenen la capacitat de provocar malalties, bé per la seva presència, com en el cas de la Salmonel·la o la *Listeria monocytogenes*,o per la de les seves toxines, en el cas de *Staphylococcus aureus*.I, fins i tot,per toxines generades dins l'intestí unavegada ingerit l'aliment, en el cas dels Clostridis sulfit-reductors.

Clostridis sulfit-reductors

Bacteris del gènere *Clostridium*,del grup bacterià dels sulfit-reductors, grampositius i amb capacitat de formar espores i toxines. Una de les característiques principals d'aquests bacteris és que poden reduir els sulfits a sulfurs.

Aquets bacteris són presentsal sòl, a l'aigua i a la pols i sovint es troben a les superfícies dels canals digestius d'alguns animals acabats de sacrificar. Les seves espores, molt resistents a les condicions adverses, sobreviuen en cavitats de la carn de l'animal on no hi ha presència d'oxigen. En el procés de cocció reaccionen i s'activen i, si després es conserva la carn amb les espores a una temperatura inadequada,aquestes poden germinar i els Clostridis es

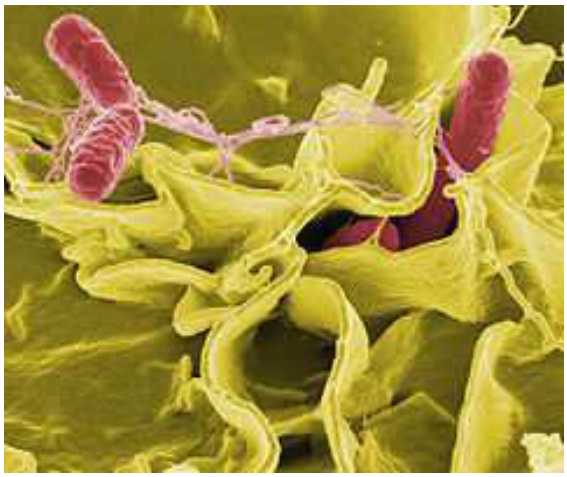
multipliquen. Per tant, el recompte dels Clostridis sulfit-reductors,indica la qualitat higiènica dels productes d'origen animal amb què es treballa.

Staphylococcus aureus

És un espècie bacteriana grampositiva de forma esfèrica, és a dir, és un coc que té una mida d'entre 0,8 i 1 µm. Aquets bacteris són immòbils, no formen espores però sí toxines i són poc resistents a les condicions adverses, com la calor i els desinfectants. Es troben en les mucoses nasals, en la gola i en la pell de les persones infectades.

Aquest bacteri apareix en els aliments en condicions de manca d'higiene en el procés de producció o en l'envasat, però en condicions de fred s'evita que el bacteri formi la toxina. L'*Staphylococcus aureus* provoca una de les intoxicacions d'origen alimentari més freqüents, que pot causar gastroenteritis, diverses infeccions menors a la pell i malalties que poden afectar greument la salut del consumidor que ha ingerit la toxina, com pneumònia i meningitis.

Salmonel·la



Salmonel·la observada des d'un MES

És una espècia bacteriana que pertany a la família de les *Enterobacteriaceae*.Té forma de bacil, és gramnegativa i no desenvolupa espores ni produeix toxines. És un bacteri anaerobi mòbil que es desplaça per flagels. És capaç de fermentar la glucosa però no la lactosa i a causa d'aquesta reacció es produeix un gas, el sulfur d'hidrogen(H_2S), que és tòxic.

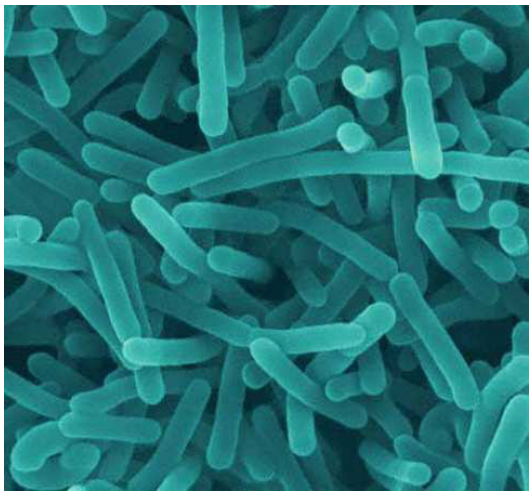
La Salmonel·la es troba fàcilment en productes alimentaris com els ous, la llet, la carn d'animal i la d'au. La seva presència està causada per una mala cocció de l'aliment d'origen animal o per la no cocció d'aquest, ja que les altes temperatures, com les que hi ha en la cocció dels productes cuits, eliminen les

salmonel·les. En aliments curats s’utilitzen mètodes bactericides, com l’assecatge o la fermentació de lactosa,que produeix àcid làctic, que fan baixar el pH de l’aliment i també eliminen les salmonel·les.

En cas d’ingerir Salmonel·la, el bacteri infecta el consumidor de l’aliment contaminat i li provoca salmonel·losi. Aquesta malaltia bacteriana pot produir mal de cap, febre, diarrea i mal abdominal durant un període llarg d’entre 1 i 8 setmanes, fins ques’eliminen les salmonel·les del cos.

Listeriamonocytogenes

Bacteris de la família de les *Listeriaceae*,són grampositius i tenen forma de bacil. L’espècie més important d’aquest tipus de bactèries és la *Listeria monocytogenes*, l’única capaç d’infectar els humans, causant la listeriosi. És un bacteri molt resistent a les altes temperatures, al pH àcid ia les altes condicions de sal i és capaç de reproduir-se ràpidament a temperaturesbaixes de refrigeració.



***L. monocytogenes* observada des d’un MES**

La infecció per listeriosi s’agafa a través del consum de productes contaminats amb *Listèria monocytogenes*. Sobretot productes d’origen animal com la llet, el formatge, la carn crua o mal cuita i l’embotit. Per evitar la contaminació amb*Listeria* és important una bona neteja i desinfecció del lloc de producció del producte i dels estris amb què es manipula així com la perfecta comprovació del seu grau de cocció. La malaltia provoca febre alta, mal de cap i grip i, en la seva manifestació més greu, meningitis.

2.1.4 MEDIS DE CULTIU

En l’estudi microbiològic, per analitzar si en el medi hi ha presència dels microorganismes que es volen estudiar, és imprescindible utilitzar per a cada tipus de bacteri el medi de cultiu necessari per a quèpuguin créixer i diferenciar-se elsuns dels altres. Els medis de cultius específics i el procediment que cal seguir en cada bacteri estudiat són:

- **Medi PCA(Plate Count Agar)**: es tracta d’un medi format pels components essencialsperquè hi puguin créixer tot tipus de bacteris, com la glucosa, l’extracte de llevat i la triptona. És un medi no selectiu ni diferencial, doncs només serveix per fer el recompte dels **aerobis totals** de la mostra que s’ha analitzat i no permet diferenciar les colònies dels diferents tipus d’aerobis que creixen en el medi. Un cop el medi està sembrat, s’ha de mantenir 48 hores a 30ºC per poder fer el recompte d’aerobis totals.

- **Medi VRBG (Vermell Bilis Violeta Glucosa Agar)**: es tracta d’un medi selectiu només per a **enterobacteris**, pel fet que conté sals biliars i cristall violeta. El medi no és diferencial ja que no es poden distingir les colònies d’enterobacteris específics. Una vegada sembrat, el medi s’ha d’incubar 24 hores a 37ºC abans de fer el recompte d’enterobacteris.

Medi VRBG

- **Medi MRS(Man, Rogosa, Sharpe Agar)**: és un medi selectiu per a **lactobacils**perquè conté components com el citrat d’amoni i l’acetat de sodi que només permeten el creixement d’aquests tipus de bacteris.No

és un medi diferencial ja que no es poden distingir entre elles les colònies que hi creixen. Quan s'ha sembrat, és necessari posar les plaques amb el medi dins d'una gerra d'anaerobiosis per tal d'eliminar l'oxigen del medi,doncs els lactobacils són bacteris anaerobis. Després, s'ha de posar a incubar a 30ºC entre 48 i 72 hores abans de fer el recompte de colònies de lactobacils.

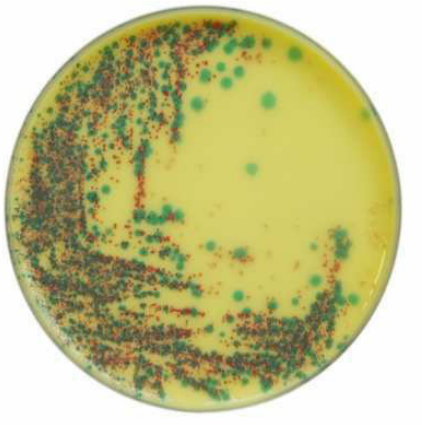
- **MediBP(Baird-ParkerAgar)**: és un medi selectiu per als ***Staphylococcusaureus***que permet identificar la seva presència. És selectiu perquè conté diversos compostos, com la sulfametazina, que no permeten el creixement de moltes varietats de bacteris. També és un medi diferencial perquè les colònies de*Staphylococcus* queden negres i amb uns halos transparents al voltant gràcies al tel·luri metàl·lic que conté el medi. El medi sembrat s'ha de posar a incubar 48 hores a 37ºC abans de fer el recompte de colònies.

- **Medi TSC (Tryptose Sulfite Cycloserine)**: es tracta d'un medi agar amb una certa selectivitat cap a alguns tipus de bacteris amb característiques fisiològiques semblants a les dels **Clostridis sulfit-reductors** i també diferencial perquè les colònies d'aquests bacteris queden de color negre. Aquest canvi de color de les colònies s'explica perquè el medi conté ions fèrrics que, al ser reduïts pelsClostridis, forma un precipitat de sulfur de ferro que és el que dóna el color negre a les colònies. En els tubs amb el medi TSC, una vegada sembrats,s'introdueix oli de vaselina que permet que el medi no estigui en contacte amb l'oxigen. El medi es posa a incubar 48 hores a 37ºC abans de

fer el recompte de colònies de Clostridis sulfit-reductors.

Medi TSC

- Per detectar la presència de **Salmonel·la** en una mostra, cal seguir diversos passos. Primer de tot,posara la mostra un **caldo d'aigua peptonada**, que és un medi que permet el creixement de molts tipus de bacteris, és a dir, que no és selectiu. La mostra amb aigua peptonada es posa a incubar 24hores a 42ºC i,passat aquest temps, es sembra en una placa de petri que conté**medi IBISA**, que és un medi no selectiu però que alhora és diferencial per Salmonel·la, perquè fa que les seves colònies quedin tenyides de color verd. El medi IBISA s'ha de posar a incubar 24 hores a 37ºC i després es pot avaluar si hi ha presència o absència de Salmonel·la en la mostra estudiada.



Medi IBISA

- Per a la detecció de la ***Listeria monocytogenes*** és necessari fer diversos passos abans de poder fer-ne el recompte. Primer de tot, es posa la mostra a analitzar en el **caldo de pre-enriquiment Half-Fraser,** un medi selectiu per a*Listeria* que permet la recuperació de les que poden haver patit danys en la seva estructura durant el procés de producció de la mostra. El caldo Half-Fraser es posa a incubar 24 hores a 30ºC. Passat aquest període, 1 ml de la mostra es posa en un tub que conté el **caldo Fraser**, que és el que permet el creixement de les *Listeries* en el medi. Aquest tub Frasers'ha de posar a incubar 24 hores a 37ºC i després s'introdueix en un aparell automàtic per a la detecció de patògens, anomenat **miniVIDAS** que, a través d'uns tubs amb antígens específics

per a*Listeriamonocytogenes*, assenyalasi n’ hi ha presència o absència en el medi. **Caldo Fraser**

2.2 APARTAT FISICOQUÍMIC

Per establir la qualitat dels aliments no es tenen en compte únicament la microbiologia, el recompte de microorganismes i la presència o no de patògens, sinó que també s’utilitzen altres mètodes que permeten saber si el producte està en l’estat òptim i si els diversos processos a què’s’ha sotmès han estat efectius. Per això, en aquest apartat es mesuren diversos paràmetres de qualitat del producte:

- Els paràmetres analitzats per un aparell anomenat NIR, que funciona amb un raig làser calibrat per uns espectres determinats segons el tipus de producte que s’estudia, permeten saber les quantitatsde:
    - Greixos
    - Sal
    - Proteïnes
    - Col·lagen
    - Humitat

  Els resultats obtinguts d’aquests paràmetres, en funció del producte concretque s’estudia, es comparen amb els paràmetres de normalitat del producte concret i el mateix aparell determina si en té les proporcions adequades.

- Altres paràmetres de qualitat que s’estudien són :
    - pH: és un paràmetre que estudia la quantitat d’ions d’hidrogen que conté una substància,fet que provoca que un producte sigui àcid, bàsic o neutre. Aquet paràmetre es descriu en una escala del’1 al 14, en la que 7 significa que un producte té un pH neutre, un nombre superior a 7 indica que la mostra que es mesura té un

pH alcalí i, si és inferior a 7, que la mostra té un pH àcid. Aquest paràmetre es mesura amb un pH-metre. **pH-metre**

- Activitat d’aigua(Aw): és una mesura que calcula la quantitat d’aigua lliure de l’estructura del producte, que és la que permet quehi puguin viure els microorganismes. Aquesta mesura es calcula sobre una escala que va de 0 a 1. És un paràmetre especialment important en els productes càrnics quese sotmeten a un procés d’assecatge, que justament es basa en reduir la quantitat d’aigua de l’estructura dels productes.

  En els productes cuits, que són els que s’estudien en aquest treball, no és necessari avaluar l’activitat d’aigua perquè no estansotmesos a cap procés d’assecatge. A més, els valor d’Awen productes cuits sempre són molt propers a 1.

- L’anàlisi organolèptica dels aliments també contribueix a determinar la seva qualitat i, a més, s’ha de tenir present que el consumidor del producte es basa precisament en els paràmetres de color, olor, textura i gust per triar quin compra.

Pernil cuit, en males condicions organolèptiques

2.3 ENVASOS UTILITZATS EN ALTES PRESSIONS

Per sotmetre els aliments a les altes pressions no tant sols s'han de tenir en compte les característiques del producte que es vol tractar, sinó que també és necessari que disposin d'un envàs adequat per resistir-les sense patir cap desperfecte.

Els envasos emprats en el procés industrial, que resisteixen les altes pressions, i que són utilitzats normalment són:

- **Envasat al buit:** és un sistema de conservació dels aliments que consisteix en extreure l'aire de l'envàs que conté el producte. Al treure l'aire també desapareix l'oxigen que conté i així s'evita l'oxidació i la descomposició del producte.

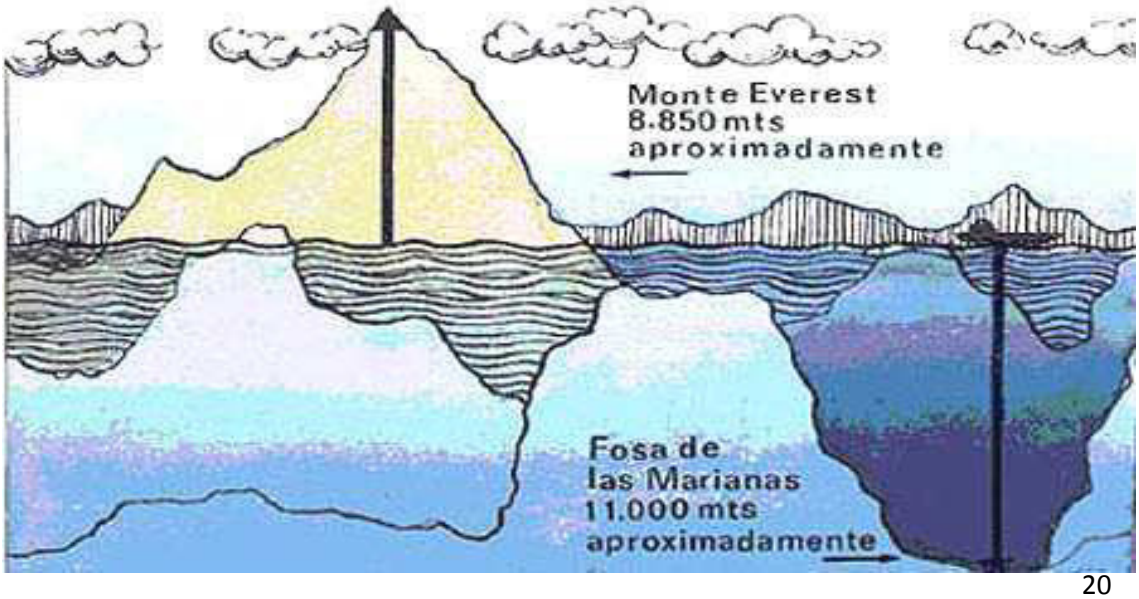
- **Envasat en atmosfera modificada**: és un sistema de conservació dels aliments que consisteix en canviar la composició dels gasos que conté l'aire de l'envàs. Normalment, es canvia l'oxigen per gasos com el nitrogen i el diòxid de carboni, en diferents proporcions segons el producte. Primeres fa el buit de l'envàs que conté el producte i després s'introdueix la mescla dels dos gasos, evitant l'oxidació i la descomposició de l'aliment.

Aquests dos tipus d'envasat són capaços de resistir les altes pressions perquè són envasos flexibles. La pressió s'aplica de la mateixa manera a tots els punts de l'envàs perquè aquest està envoltat d'aigua, que és el mitjà de transmissió de la pressió. Per això, les pressions aplicades en envasos flexibles es compensen entre elles i fan que aquests no es deteriorin.

2.4 PROCÉS D'ALTES PRESSIONS (HPP)

El procés d'altes pressions (HPP: High Pressure Processing) és un sistema industrial innovador per a la conservació d'aliments. Consisteix en tractar un producte alimentari (d'unes determinades característiques i amb un envasat adequat) en altes pressions atmosfèriques, durant un temps determinat, amb l'objectiu d'augmentar la seva vida útil. Aquest procés aconsegueix reduir el nombre de microorganismes del producte i, per tant, un alt percentatge de la petita contaminació que aquest pot presentar durant els primers dies d'envasat.

En parlar d'altes pressions, ens referim a una tecnologia detractamentdels aliments que els sotmet a una pressió atmosfèrica elevadíssima, d'uns 6000 Bars. És una pressió que no es troba present enlloc de la Terra, si prenem com a referència que en la fossa de les Mariannes, a 11 Km de profunditat sota el mar, el lloc amb més profunditat de la Terra i on hi ha més pressió atmosfèrica del planeta, només s'arriba a uns 1000 Bars de pressió. Això representa una sisena part de la pressió a què estan sotmesos els productes en aquest procés, i és comparable a la hipotètica pressió que hi hauria a 60 km sota l'aigua.



Representació gràfica de la profunditat de la fossa de les Mariannes

El sistema de les altes pressions ja s'aplica de fa uns anysa la industria, als EUA, i ara es comença a utilitzar a nivell europeu i mundial gràcies als bons resultats que està donant en les empreses que l'utilitzen.

Per a les empreses, aquest sistema comporta diversos avantatges:

- Els productes tractats en altes pressions tenen una vida útil més llarga, és a dir, disposen d'un marge de caducitat més llarg.Els aliments tenen una millor qualitat alimentària i es poden exportar a països més llunyans.

- El tractament en altes pressions dels aliments, no n'altera les qualitats organolèptiques.

- Les altes pressions garanteixen un control suplementari de la qualitat dels envasos dels aliments, atès que si no estan en perfecte estat, les altes pressions els deterioren.

Només alguns aliments són aptes per ser sotmesos a les altes pressions, perquè és imprescindible que estiguin dotats d'unes característiques determinades:

- La pressió es transmet als aliments a través de l'aigua i és necessari que, a més, tinguin aigua lliure en la seva estructura. Han de tenir una **activitat d'aigua superior a 0,850** (en l'escala que va de 0 a 1).

- Els aliments han d'estar envasats d'una manera determinada perquè l'envàs no es deteriori al ser tractat en altes pressions. Han de ser **envasos flexibles**, com les ampolles de plàstic o **envasos al buit** i **en atmosfera modificada**.

Aquests dos requisits permeten fer una distinció clara entre els aliments aptes i els no aptes per ser sotmesos a les altes pressions:

- **Aliments aptes per a les altes pressions**
  - Aliments sòlids amb alta activitat d'aigua
    - Productes càrnics cuits o curats
    - Formatges
    - Peix, marisc i productes marinats
    - Plats preparats i salses
    - Fruites i melmelades
    - Vegetals

  - Aliments líquids en ampolla de plàstic o envàs flexible
    - Productes làctics
    - Sucs de fruites i verdures
    - Begudes bioactives

- **Aliments no aptes per a les altes pressions**
  - Aliments sòlids amb aire a l'interior
    - Pa i pastissos

  - Aliments envasats en envasos completament rígids
    - Envasos de vidre
    - Aliments en llauna

  - Aliments amb baix contingut d'activitat d'aigua
    - Espècies
    - Fruits secs
    - Farines

Les altes pressions s'apliquen als aliments una vegada ha finalitzat el seu procés de producció, o pocs dies després, perquè és el moment en què el producte té una quantitat menor de microorganismes.Les altes pressions poden eliminar un gran percentatge de microorganismes i, el fet d'aplicar-les en aquest determinat moment, fa que es redueixi el creixement exponencial d'aquests i que l'aliment tardi més en presentar contaminació.

Quan ha acabat el procés de producció d'un determinat producte alimentari, apte per ser tractat en altes pressions, aquest s'envia a la sala o a la nau on hi ha la màquina d'altes pressions per tal d'iniciar el procés de tractament amb aquest sistema.

Màquina d'altes pressions de la marca *Hiperbaric*, ubicada a la fàbrica Riera de Sant Esteve d'en Bas, a la Garrotxa

Per aplicar les altes pressions als aliments, s'han de seguir els passos següents:

1. En arribar el producte a la sala, es posa dins d'uns barrils amb diverses obertures. La capacitat dels barrils varia segons les dimensions de la màquina. En aquest cas, la màquina d'altes pressions que s'ha observat està dotada de quatre barrils,de capacitat variable, segons la dimensió de l'envàs del producte.

2. Quan el producte és dins dels barrils, aquests es posen automàticament dins d'un tanc o bombona d'acer inoxidable de grans dimensions, capaç de resistir les condicions d'altes pressions que hi ha en els seu interior.El tanc es va omplint d'aigua, aparentment fins a la seva màxima capacitat, i després comencen a funcionar uns generadors que permeten que pugui entrar encara més aigua dins de la bombona i així fer augmentar molt la pressió atmosfèrica dins del tanc.

3. Quan la pressió arribaal 6000 Bars, es manté durant un període de temps determinat, segons el producte,d'entre 3 i 6 minuts.Aquestes condicions no deformen ni comprimeixen l'envàs perquè la pressió, que es transmet a través de l'aigua que envolta el producte, actua per igual en tota la seva superfície.Això vol dir que les pressions es compensen i el producte no es comprimeix,atès que la pressió resultant és zero. En canvi, com que les pressions també es transmeten al producte de l'interior de l'envàs,afecten els microorganismes que conté. Ataquen especialment la membrana i la paret cel·lular, i algunes proteïnes concretes imprescindibles per alseu metabolisme, a més de provocar canvis genètics.

***L.monocytogenes*abans i després de HPP**

4. Passat el període de temps establert en cada cas, es fa una descompressió de pocs segons i es treu el producte del tanc d’aigua.Una part de l’aigua utilitzada es reutilitza i una altra petita part es perd.

Barrils sortint de la màquina de HPP

5. Quan el producte acaba de sortir del tanc d’aigua presenta una curiositat:a l’envàs es poden veure diverses substàncies que s’han desprès de l’aliment. Es tracta de **proteïnes**, **greixos** i**líquid** que, passats uns minuts, el producte torna arecuperar. Finalment,l’aliment no presenta cap diferència respectedel seu estatabans de passar per les altes pressions.

6. Just al sortir de la màquina, es passa el producte per un assecador per tal de fer marxar l’aigua que queda al voltant de l’envàs.L’aliment està a punt de quedar dipositaten el palet corresponent i s’acaba així el procés de producció.

En primer terme, la màquina d’assecatge de l’envàs i, al darrere, la part posterior de la màquina de HPP

Un avantatge important de tractar els aliments envasats en altes pressions és que, al sotmetre’ls a 6000 Bars de pressió, s’identifiquen els envasos defectuosos.Els envasos que tenen petits porus, per on podria contaminar-se l’aliment, queden plens d’aigua i són fàcilment detectables. Aquest fet representa un control suplementari de la qualitat dels envasos dels aliments.

Envàs defectuós, amb porus, que s’ha omplert d’aigua en el HPP

Les altes pressions també suposen un valor afegiten alguns productes.En el casdels mariscsdotats d’esquelet extern, com les gambes i els escamarlans, les altes pressions desactiven una proteïna que permet que es pugui treure l’esquelet sense cap dificultat.Al Japó, per exemple,tracten en altes pressions aliments amb clova, com les ostres, perquè es puguin obrir més fàcilment.

Aquest treball es basa en els productes carnis que poden ser tractats en altes pressions, com els productes cuits o els curats. En concret, en un aliment cuit que produeix l’empresa NOEL ALIMENTARIA, SAU de Begudà, a Sant Joan les Fonts, que es comercialitza amb el nom de “Lacón al horno cortado a mano” i que, a partir d’ara, anomenaré amb l’abreviatura LHCM.

3. PART PRÀCTICA

3.1 PROTOCOL

S’estudia el producte LHCMdurant la seva vida útil (establerta per NOEL ALIMENTARIA, SAU en 35 dies), a través de l’anàlisi microbiològicad’unes mostres.

Les variables independents de l’estudi són:

- Si els productes han estat tractats o no en altes pressions (mostres de control).
- El temps que les mostres han estat tractades en 6000 Bars de pressió: 3, 4 i 6 minuts.

Les variable dependents de l’estudi són:

- La presència o absència de bacteris, en el cas de Salmonel·la i *Listeria monocytogenes*,que hi ha en cada mostra de producte.
- La quantitat dels altres bacteris que s’analitzeni que presenta cada mostra.

L’estudi, a més,es fa per duplicat per tal d’evitar possibles contaminacions d’algun producte durantles anàlisis i per tal d’obtenir una mostra més representativa.

Les variables controlades de l’estudi han de ser el màxim de semblants en totes les mostresdurant tota la seva vida útil. Per això, es trencarà la cadena de fred als 15 dies de finalitzat el procés de producció, per tal de fer una rèplica el més semblant possible de les condicions en què es trobael producte en el mercat. Així, el trencament de la cadena de fred farà que el producte, durantel primer terç de la seva vida útil, es trobi a 4ºC i que, durant els altres dos terços de vida útil, es trobi a 8ºC.

En l'estudi s'analitza si l'aplicació d'altes pressions ha eliminat la presència de bacteris patògens per al consumidor, com la *Listeria monocytogenes* o la Salmonel·la. També s'estudia la quantitat de microorganismes que es troben al producte i que poden afectar la seva qualitat,produint-li alteracions organolèptiques (lactobacils, enterobacteris i aerobis totals) o contaminant-lo (Clostridis sulfit-reductors i *Staphylococcus aureus*).

Totes les variables s'estudien en les mostres de control (no sotmeses a HPP) i en les sotmeses a altes pressions, i es comparen. També es comparen els resultats de les diverses mostres tractades 3, 4 i 6 minuts en altes pressions.

3.2 METODOLOGIA

L'estudi microbiològic del LHCMes desenvolupa en mostres d'aquest producte que repliquen els seus diversos estats durant els 35 dies de vida útil. I s'estableix, tant en mostres tractades en altes pressions durant 3, 4 i 6 minuts, com en mostres del producte que no hi han estat sotmeses; és a dir, en el que s'anomenen mostres de control.

3.2.1MATERIAL

Bosses estèrils amb filtre, bosses estèrils sense filtre, dil·lutor, bunsen, etanol, tisores, pinces, mastegador, cubilets, diferents medis de cultiu, plaques de petri, pipeta automàtica, tubs d'assaig, cambra frigorífica a 4ºC, nevera a 8ºC, autoclau, bany regulat a 50ºC, agitador de tubs, estufes a 30ºC, 37ºC i 42ºC**,** sembrador automàtic, ansa de Kole, aigua destil·lada, lleixiu i miniVIDAS.

3.2.2REACTIUS

Aigua peptonada, agar PCA (Plate Count), agar VRBG (Vermell Bilis Violeta Glucosa), agar MRS (Man, Rogosa, Sharpe), agar BP (Baird-Parker), agar IBISA, agar TSC (Tryptose Sulfite Cycloserine), caldo d'enriquiment Half-Fraser i reactius d'anticossos anti-*Listeriamonocytogenes* per al miniVIDAS.

3.2.3PREPARACIÓ DE LA MOSTRA

La producció del LHCMesdesenvolupa íntegrament a la planta NOEL 1 (a la seu de Begudà):es talla a mà i, tot seguit,s'envasa en envàs d'atmosfera modificada. El producte envasat es transporta, amb camions dotats de cambrafrigorífica, fins a la fàbrica Riera,a Sant Esteve d'en Bas,que és on està ubicada la màquina que tracta els productes en altes pressions.Una vegada allà,s'agafen 8 mostres abans de passar pel tractament, que corresponen a les mostres control. Després,es tracta el LHCMen altes pressions, a uns 6000 Bars, durant 3,4 i 6 minuts.Quan s'ha acabat el procés,s'agafen 10 mostres de cada un dels tractaments (3, 4 i 6 minuts); és a dir, 30 mostres, tenint en compte que les anàlisis es fan per duplicat.

Un cop agafades les mostres, es marquen amb els minuts de tractament à que han estat sotmesos els productes i també els controls. Tot seguit, es tornen, amb camions amb cambra frigorífica,a la planta NOEL 1. En aquesta planta de l'empresa és on hi ha les instal·lacions del laboratori, i ones guarden les mostres, en una cambrafrigorífica a una temperatura inferior a 4ºC.

Tot seguit,es comencen a fer els estudis microbiològics dels productes en les diverses fases del tractament i per duplicat. El primer estudi es fa en el període 1, que correspon al dia 5, és a dir, al cinquè dia de la vida útil del producte. Aquest estudi es varepetint cada setmana fins al final de la vida útil del producte i, per tant, les anàlisis microbiològiquess'han fet els dies 5, 13,21,27 i 34 del cicle de vida útil del LHCM.

Per fer la preparació de la mostra, es segueix el mètode següent:

Primer de tot, en dos dil·lutorss'obreuna bossa estèril en cadascun, una amb filtre i l'altra sense i, tot seguit,s'encén el bunsen. Les bosses s'identifiquen amb el codi del producte analitzat i, a continuació,es tara la mostra. Tot seguit, s'esterilitzen unes pinces i unes tisores amb etanol i es passen pel bunsen.Aleshores, s'obre l'envàs del producte i es fan talls del producte que corresponen a totes les parts de l'envàs,per tal d'obtenir una mostra més representativa. Després, es posenen el dil·lutor fins aconseguir un pes de 25

grams en cadascuna de les bosses. Un dels dil·lutors introdueix la quantitat de líquid corresponent d’aigua peptonada i l’altredel caldo d’enriquiment Half-Fraser(en la bossa en què s’analitzen les listèries) fins aconseguir una dilució decimal de la -1.Aquesta dilució consisteix en què per una part de producte li corresponen 9 parts de dilució; és a dir, que a25 grams de producte li corresponen 225 grams d’aigua peptonada o de Half-Fraser.

Dil·lutor

A continuació,es posen les bosses dins del mastegador, que és un aparell que fa que les partícules de la carn passin a estar en suspensió en el medi líquid. Un cop el mastegador ha acabat, s’identifiquen les plaques de petri necessàries per a l’estudi i en cadascuna s’hi anota el codi, la dilució i la quantitat de volum sembrat que es posa a la mostra.

3.2.4PREPARACIÓ I ÚS DELS MÈTODES DE CULTIU

Recompte d’aerobis totals

Per realitzar el cultiu en **agar PCA**, es segueix el procediment següent:

1. Es prepara la mostra(explicada anteriorment).
2. Es preparen una sèrie de dilucions decimals,segons el període de l’estudien què ens trobem. A mesura que passen dies de la vida útil del producte, més dilucions decimals s’han de fer per poder tenir un resultat en què es puguin comptar les colònies en les plaques de petri. En la placa s’identifica la mostra amb el seu codi corresponent, indicant-hi la

dilució decimal que li correspon i el tipus de medi en què ha estat sembrat.

3. S’introdueixa la placa de petri 1 ml de la dilució decimal preparada anteriorment i després s’hi afegeixen15 ml de PCA.
4. Es barreja el medi fent moviments circulars amb la placa per tal d’homogeneïtzar-lo. És important no impregnar la superfície de la tapa en contacte amb el cultiu, quan es fan els moviments circulars.
5. Es deixa solidificar l’agar en una superfície plana.
6. Un cop l’agar està solidificat es posen les plaques, de cap per avall, a l’estufa de 30ºC durant 48 hores.
7. Un cop han passat les hores d’incubació, es compten les UFC (unitats formadores de colònies) que s’han format a la placa, sempre que n’hi hagi un nombre inferior a 300. Per no cometre errors, cal marcar les colònies que ja han estat comptades amb un retolador. Els resultats s’introdueixen en uns fulls d’anàlisi on també s’anoten les condicions en què s’ha incubat la placa, el dia que es va sembrar i el producte que s’ha estudiat.
8. Les plaques incubades, fets els recomptes,s’esterilitzen a l’autoclau i s’eliminen.

Recompte d’enterobactèries

Per realitzar el cultiu en**VRBG**, es segueix el procediment següent:

1. Es prepara la mostra(explicada anteriorment).
2. Es preparen una sèrie de dilucions decimals, segons el període de l’estudien què ens trobem. A mesura que passen dies de la vida útil del producte, més dilucions decimals s’han de fer per poder tenir un resultat en què es puguin comptar les colònies en les plaques de petri. En la placa s’identifica la mostra amb el seu codi corresponent, indicant-hi la dilució decimal que li correspon i el tipus de medi en què ha estat sembrat.
3. S’introdueixa la placa de petri 1 ml de la dilució decimal preparada anteriorment i després s’hi afegeixen 15 ml de VRBG.

4. Es barreja el medi fent moviments circulars amb la placa per tal d'homogeneïtzar-lo. És important no impregnar la superfície de la tapa en contacte amb el cultiu, quan es fan els moviments circulars.
5. Es deixa solidificar l'agar en una superfície plana.
6. Un cop l'agar està solidificat es posen les plaques, de cap per avall, a l'estufa de 37ºC durant 24 hores.
7. Un cop han passat les hores d'incubació, es compten les UFC (unitats formadores de colònies) que s'han format a la placa, sempre que n'hi hagi un nombre inferior a 300. Per no cometre errors, cal marcar les colònies que ja han estat comptades amb un retolador. Els resultats s'introdueixen en uns fulls d'anàlisi on també s'anoten les condicions en què s'ha incubat la placa, el dia que es va sembrar i el producte que s'ha estudiat.
8. Les plaques incubades, fets els recomptes,s'esterilitzen a l'autoclau i s'eliminen.

Recompte de lactobacils

Per realitzar el cultiu en**MRS**, es segueix el procediment següent:

1. Es prepara la mostra(explicada anteriorment).
2. Es preparen una sèrie de dilucions decimals, segons el període de l'estudien què ens trobem. A mesura que passen dies de la vida útil del producte, més dilucions decimals s'han de fer per poder tenir un resultat en què es puguin comptar les colònies en les plaques de petri. En la placa s'identifica la mostra amb el seu codi corresponent, indicant-hi la dilució decimal que li correspon i el tipus de medi en què ha estat sembrat.
3. S'introdueix a la placa de petri 1 ml de la dilució decimal preparada anteriorment i després s'hi afegeixen15 ml de MRS.
4. Es barreja el medi fent moviments circulars amb la placa per tal d'homogeneïtzar-lo. És important no impregnar la superfície de la tapa en contacte amb el cultiu, quan es fan els moviments circulars.
5. Es deixa solidificar l'agar en una superfície plana.

6. Un cop l'agar està solidificat es posen les plaques dins d'una gerra d'anaerobiosi.
7. Es posa la gerra d'anaerobiosi amb les plaques a l'estufa de 30ºC durant 48-72 hores.
8. Un cop han passat les hores d'incubació, es compten les UFC (unitats formadores de colònies) que s'han format a la placa, sempre que n'hi hagi un nombre inferior a 300. Per no cometre errors, cal marcar les colònies que ja han estat comptades amb un retolador.Els resultats s'introdueixen en uns fulls d'anàlisi on també s'anoten les condicions en què s'ha incubat la placa, el dia que es va sembrar i el producte que s'ha estudiat.
9. Les plaques incubades, fets els recomptes, s'esterilitzen a l'autoclau i s'eliminen.

Gerra d'anaerobiosi

Recompte de *Staphylococcus aureus*

Per realitzar el cultiu en el medi **Baird-Parker**, que arriba al laboratori preparat en plaques de petri apunt per a la seva utilització, es segueixel procediment següent:

1. Es prepara la mostra(explicada anteriorment).
2. Per sembrar,es posa a la mostra la dilució decimal que li correspon. Després, la mostra es posa dins d'un cubilet estèril que s'introdueix en el lloc corresponent del sembrador automàtic, on una ansa automàtica agafa la quantitat corresponent de dilució, en aquest cas 100 microlitres. Es col·loca la placa de petri sembrada en Baird-Parker en el lloc corresponent delsembrador automàtic i aquest sembrala dilució per tota la placa.

3. Un cop sembrada la placa, s'indica al sembrador que inicií el seu procés de neteja durant el quall'ansa s'introdueix en lleixiu i, posteriorment, en aigua destil·lada per tal que el dil·lutor esdevingui estèril i no contamini les pròximes plaques que es sembren,seguint també aquest mateix procés.

Sembrador automàtic

4. La placa sembrada s'introdueix, de cap per avall, a l'estufa de 37ºC durant 48 hores.
5. Un cop han passat les hores d'incubació, es compten les UFC (unitats formadores de colònies) que s'han format a la placa, sempre que n'hi hagi un nombre inferior a 300. Les colònies de *Staphylococcus aureus* són colònies rodones i negres amb uns halos transparents al seu voltant. Per no cometre errors, cal marcar les colònies que ja han estat comptades amb un retolador. Els resultats s'introdueixen en uns fulls d'anàlisi on també s'anoten les condicions en què s'ha incubat la placa, el dia que es va sembrar i el producte que s'ha estudiat.
6. Les plaques incubades, fets els recomptes,s'esterilitzen a l'autoclau i s'eliminen.

Recompte de Clostridis sulfit-reductors

Per realitzar el cultiu en el medi **TSC**, que arriba al laboratori preparat en tubs apunt per a la seva utilització, es segueixel procediment següent:

1. Es prepara la mostra(explicada anteriorment).
2. Es preparen una sèrie de dilucions decimals, segons el període de l'estudi en què ens trobem. A mesura que passen dies de la vida útil del producte, més dilucions decimals s'han de fer per poder tenir un resultat en què es puguin comptar les colònies en les plaques de petri. En la

placa s'identifica la mostra amb el seu codi corresponent, indicant-hi la dilució decimal que li correspon i el tipus de medi en què ha estat sembrat.

3. Es disposen els tubs en el medi TSC amb l'agar fos i s'hi introdueix 1 ml de la dilució decimal preparada anteriorment.
4. Es deixa solidificar el tub.
5. S'afegeix a cada tub, de manera estèril, oli de vaselina fins aconseguir una capa d'entre 1 i 2 cm d'amplitud per tal d'obtenir un medi anaerobi.
7. S'incuba el cultiu a l'estufa de 37ºC durant 48 hores.
8. Un cop han passatles hores d'incubació, es compten les UFC (unitats formadores de colònies) que s'han format al tub, sempre que n'hi hagi un nombre inferior a 150. Per poder identificar les colònies de Clostridis sulfit-reductors, es compten les colònies que queden negres a l'agar. Per no cometre errors, cal marcar les colònies que ja han estat comptades amb un retolador. Els resultats s'introdueixen en uns fulls d'anàlisi on també s'anoten les condicions en què s'ha incubat la placa, el dia que es va sembrar i el producte que s'ha estudiat.
9. Els tubs incubats, fets els recomptes, s'esterilitzen a l'autoclau i s'eliminen.

Determinació de Salmonel·la

Per determinar si hi ha presència o absència de Salmonel·la en el producte,es fa un pre-enriquiment de la bossa d'**aigua peptonada** i després es cultiva la mostra del pre-enriquiment en el medi **IBISA**, que arriba al laboratori preparat en plaques de petri apunt per a la seva utilització. Es segueixel procediment següent:

1. Es prepara la mostra(explicada anteriorment).
2. S'incuben les bosses d'aigua peptonada, un cop passades pel mastegador, durant 24 hores a l'estufa de 42ºC.
3. Quan s'ha completat el temps d'incubació del caldo d'aigua peptonada, es sembra el contingut de la bossa, amb una ansa de Kole, en una placa de petri que conté el medi IBISA.

4. Es posen a incubar les plaques, de cap per avall, a l’estufa de 37ºC durant 24 hores.
5. Un cop han passat les hores d’incubació, es compten les UFC (unitats formadores de colònies) que s’han format a la placa. Per detectar si hi ha presència o no de colònies de Salmonel·la, només cal mirar si en la placa han crescut colònies de color verdós o blau clar. No cal fer recompte de les colònies perquè només s’estudia si hi ha presència o absència deSalmonel·la.
6. Les plaques incubades, un vegada s’ha determinat si hi ha presència o no de Salmonel·la, s’esterilitzen a l’autoclau i s’eliminen.

Determinació de *Listeria monocytogenes*

Per determinar si hi ha presència o absència de *Listeria monocytogenes* en el producte,es fa un pre-enriquiment de la bossa que conté el **caldo Half-Fraser** i després es passa el caldo pre-enriquit pel miniVIDAS. S’ha seguit el procediment següent:

1. Es prepara la mostra(explicada anteriorment).
2. S’incuben les bosses amb el contingut del caldo Half-Fraser, un cop passades pel mastegador, durant 24 hores a l’estufa de 30ºC.
3. Quan s’ha completat el temps d’incubació, s’introdueix, amb una pipeta automàtica, 1 ml del caldo en un tub que conté el medi del **caldo Fraser**. Un cop s’ha utilitzat la bossa amb el medi Half-Fraser, s’hiintrodueix lleixiu perquè quedi esterilitzada i s’elimina.
4. S’incuba el tub Fraser 24 hores a 37ºC.
5. Quan s’ha completat el temps d’incubació del tub Fraser, s’introdueix 1 ml del caldo Fraser dins d’un cartutx del miniVIDAS. El tub Fraser, un cop utilitzat,s’esterilitzaa l’autoclau i s’elimina.
6. Es prepara la màquina miniVIDAS, introduint el codi de les mostres per analitzar

7. Quan la màquina ha acabat el procés, dóna els resultats en negatiu si no ha detectat presència de *Listeria monocytogenes*i en positiu si n’ha trobat.
8. Elscartutxos utilitzats en el miniVIDAS, s’esterilitzen a l’autoclau i s’eliminen.

MiniVIDAS

4. RESULTATS I VALORACIÓ

4.1 RESULTATS DE L'ESTUDI MICROBIOLÒGIC DEL LHCM TRACTAT EN ALTES PRESSIONS

L'estudi microbiològic del LHCM analitza la contaminació que hi ha en el producte sense tractar (control) i en el tractat en altes pressions, en els diferents períodes d'estudi. Ho he fet per duplicat i per això hi ha dues dades de cada microorganisme.

LHCM SENSE TRACTAR EN ALTES PRESSIONS (CONTROL)																		
Dies	**Aerobis totals (UFC/g)**			**Enterobacteris (UFC/g)**			**Lactobacils (UFC/g)**			***S. aureus* (UFC/g)**		**Clostridis (UFC/g)**		**Salmonel·la (Pres/Abs)**		***Listeria* (Pres/Abs)**	
5	$1,1.10^4$	$1,2.10^4$	4,0	1.10^1	2.10^1	1,2	4.10^3	2.10^3	3,5	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
13	2.10^5	$1,7.10^5$	5,2	<10	<10	0	2.10^5	2.10^5	5,2	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
21	$3,6.10^8$	$2,3.10^8$	8,4	<10	<10	0	1.10^6	1.10^8	7,8	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
27	$3,9.10^9$	$2,7.10^9$	9,4	<10	<10	0	3.10^9	2.10^9	9,3	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.

Per llegir aquesta taula i les següents, s'ha de saber que la tercera columna dels bacteris indicadors, dels aerobis totals, dels enterobacteris i dels lactobacils, correspon al logaritme de la mitjana dels resultats de les dues columnes anteriors. Com en el següent exemple:

$(1,1\cdot10^4 + 1,2\cdot10^4)/2 = 1,15\cdot10^4$; $\mathrm{Log}(1,15\cdot10^4) = 4,06$

A la taula anterior es presenten els resultats de l'estudi microbiològic del **LHCM no tractat en altes pressions**; és a dir, del grup de mostres de control de l'estudi.

S’observen uns resultats elevats de bacteris indicadors, sobretot d’aerobis totals i de lactobacils, que també són aerobis; aquests són els principals bacteris que actuen en la descomposició del pernil cuit (i, en aquest cas, del LHCM). Per tant, és interessant analitzar per separat lactobacils i aerobis totals.

La contaminació inicial que indica l’alta presència d’aquests bacteris es pot explicar pel fet que hi pot haver un punt crític en el procés de producció del producte, que coincidiria amb el moment del tallat manual del LHCM. Tot i les rigoroses mesures higièniques del procés industrial, és gairebé impossible una flora baixa en bacteris indicadors.

El dia 21 de l’estudi, el LHCM ja presenta uns nivells molt elevats d’aerobis totals i de lactobacils, superiors a 10^8UFC/g. Són uns nivells a partir dels quals el producte ja està en estat de descomposició i no és apte per al consum humà. L’estudi, en aquest cas, s’acaba el dia 27 degut a l’alta contaminació d’aerobis totals i de lactobacils. En la resta de l’anàlisi, no hi ha cap resultat a destacar sobre els bacteris patògens, ja que no s’observa presència de Salmonel·la ni de *Listeria monocytogenes*, i tampoc nivells elevats de *Staphilococcusaureus* ni de Clostridis sulfit-reductors.

LHCM TRACTAT 3 MINUTS EN ALTES PRESSIONS																	
Dies	**Aerobis totals (UFC/g)**			**Enterobacteris (UFC/g)**			**Lactobacils (UFC/g)**			***S. aureus (UFC/g)***		**Clostridis (UFC/g)**		**Salmonel·la (Pres/Abs)**		***Listeria (Pres/Abs)***	
5	<10	<10	0	<10	<10	0	<10	<10	0	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
13	2.10^3	0	3,2	<10	<10	0	3.10^3	<10	3,2	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
21	5.10^5	$8,5.10^4$	5,3	<10	$2,2.10^2$	2,2	2.10^5	<10	5,2	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
27	$1,4.10^7$	1.10^6	6,9	2.10^3	<10	3,2	<10	<10	0	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
34	$3,8.10^5$	3.10^6	6,2	<10	<10	0	$4,6.10^3$	$3,6.10^4$	4,3	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.

En aquesta taula de resultats del **LHCM tractat 3 minuts en altes pressions**, s'observen uns recomptes inicials baixos d'aerobis totals i de lactobacils. A partir del dia 27 de vida útil del producte, creix el recompte d'aerobis totals però no tant el de lactobacils. Aquests nivells marquen l'inici de la pèrdua de les seves propietat organolèptiques i no és recomanable el seu consum perquè s'inicia la seva descomposició. És important destacar que en tota la vida útil del LHCM tractat 3 minuts en altes pressions, no s'ha trobat cap recompte elevat de bacteris patògens, ni presència de Salmonel·la o de*Listeria monocytogenes*.

LHCM TRACTAT 4 MINUTS EN ALTES PRESSIONS																		
Dies	**Aerobis totals (UFC/g)**			**Enterobacteris (UFC/g)**			**Lactobacils (UFC/g)**			***S. aureus* (UFC/g)**		**Clostridis (UFC/g)**		**Salmonel·la (Pres/Abs)**		***Listeria* (Pres/Abs)**	
5	<10	4.10^{1}	1,4	<10	<10	0	<10	<10	0	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
13	7.10^{1}	3.10^{1}	1,7	<10	<10	0	<10	<10	0	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
21	$1,2.10^{3}$	$1,4.10^{4}$	3,9	<10	<10	0	$2,8.10^{3}$	<10	3,1	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
27	7.10^{4}	4.10^{4}	4,7	<10	<10	0	<10	<10	0	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
34	$2,2.10^{4}$	$2,2.10^{3}$	4,1	<10	<10	0	$3,8.10^{3}$	$2,1.10^{4}$	4,1	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.

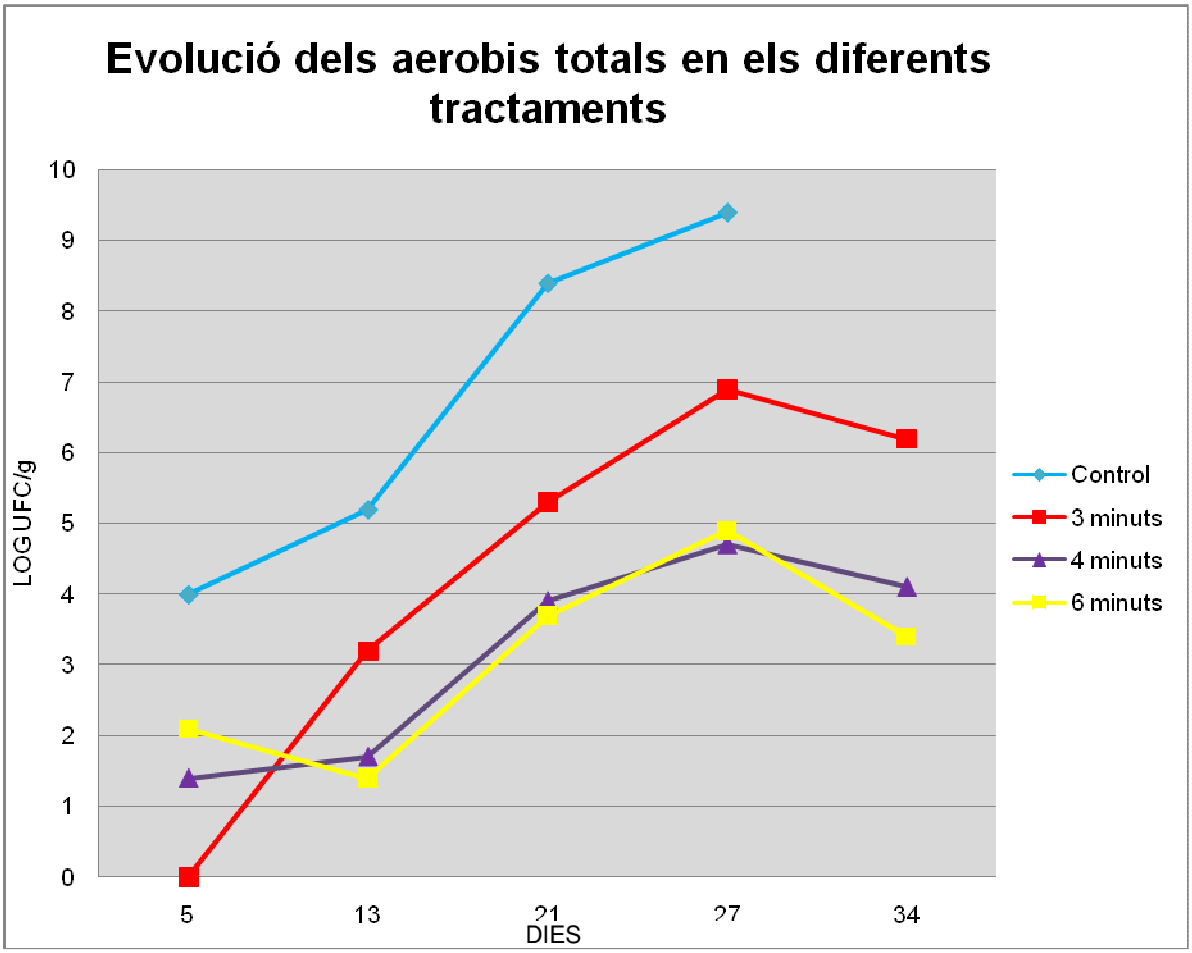
En la taula de resultats, que correspon al **LHCM tractat durant 4 minuts en altes pressions**, els recomptes inicials d'aerobis totals són molt baixos i els valors de lactobacils i d'enterobacteris són mínims. Si bé augmenten en el transcurs de la vida útil del producte, sempre es mantenen en uns recomptes inferiors a 10^5UFC/g. Uns valors tan baixos de lactobacils i d'enterobacteris detectats durant tota la vida útil del LHCM, indiquen que les altes pressions els afecten molt i n'eviten la proliferació. És important destacar que no s'han detectat colònies de *Staphylococcus aureus* ni de Clostridis sulfit-reductors, i tampoc presència de Salmonel·la ni de *Listeria monocytogenes*.

Els resultats d'aquest estudi assenyalen que el producte compleix els nivells de qualitat adequats per introduir-lo al mercat i ser consumit.

LHCM TRACTAT 6 MINUTS EN ALTES PRESSIONS																		
Dies	**Aerobis totals (UFC/g)**			**Enterobacteris (UFC/g)**			**Lactobacils (UFC/g)**			***S. aureus* (UFC/g)**		**Clostridis (UFC/g)**		**Salmonel·la (Pres/Abs)**		***Listeria* (Pres/Abs)**	
5	0	$2,6.10^{2}$	2,1	<10	<10	0	<10	<10	0	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
13	0	5.10^{1}	1,4	<10	<10	0	<10	<10	0	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
21	2.10^{2}	1.10^{4}	3,7	<10	<10	0	<10	$2,5.10^{3}$	3,1	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
27	$1,5.10^{5}$	0	4,9	<10	<10	0	<10	<10	0	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.
34	$2,4.10^{3}$	$2,4.10^{3}$	3,4	<10	<10	0	$3,8.10^{3}$	$2,1.10^{4}$	4,1	<100	<100	<10	<10	Abs.	Abs.	Abs.	Abs.

L'última taula és la dels resultats obtinguts de l'anàlisi del **LHCM tractat 6 minuts en altes pressions**. Els recomptes inicials d'aerobis totals són molt baixos i els de lactobacils i d'enterobacteris són mínims. Al llarg del temps de vida útil, els recomptes augmenten però es mantenen sempre en nivells inferiors a 10^{5}UFC/g, que corresponen a un producte que no es troba en procés de descomposició i que manté les seves qualitats organolèptiques. En la taula també s'aprecia que els recomptes de lactobacils són molt baixos durant tota la vida útil, igual que en el tractament de 4 minuts, i es pot concloure que les altes pressions afecten molt l'aparició de lactobacils. També els enterobacteris queden afectats per les altes pressions, doncs no se n'han detectat en tot el període de vida útil. Com en la resta de casos, no s'han detectat colònies de *Staphylococcus aureus* ni de Clostridis sulfit-reductors, i tampoc presència de Salmonel·la ni de *Listeria monocytogenes*.

Els resultats d'aquest tractament permeten que el producte compleixi els nivells de qualitat adequats per introduir-lo al mercat i ser consumit.

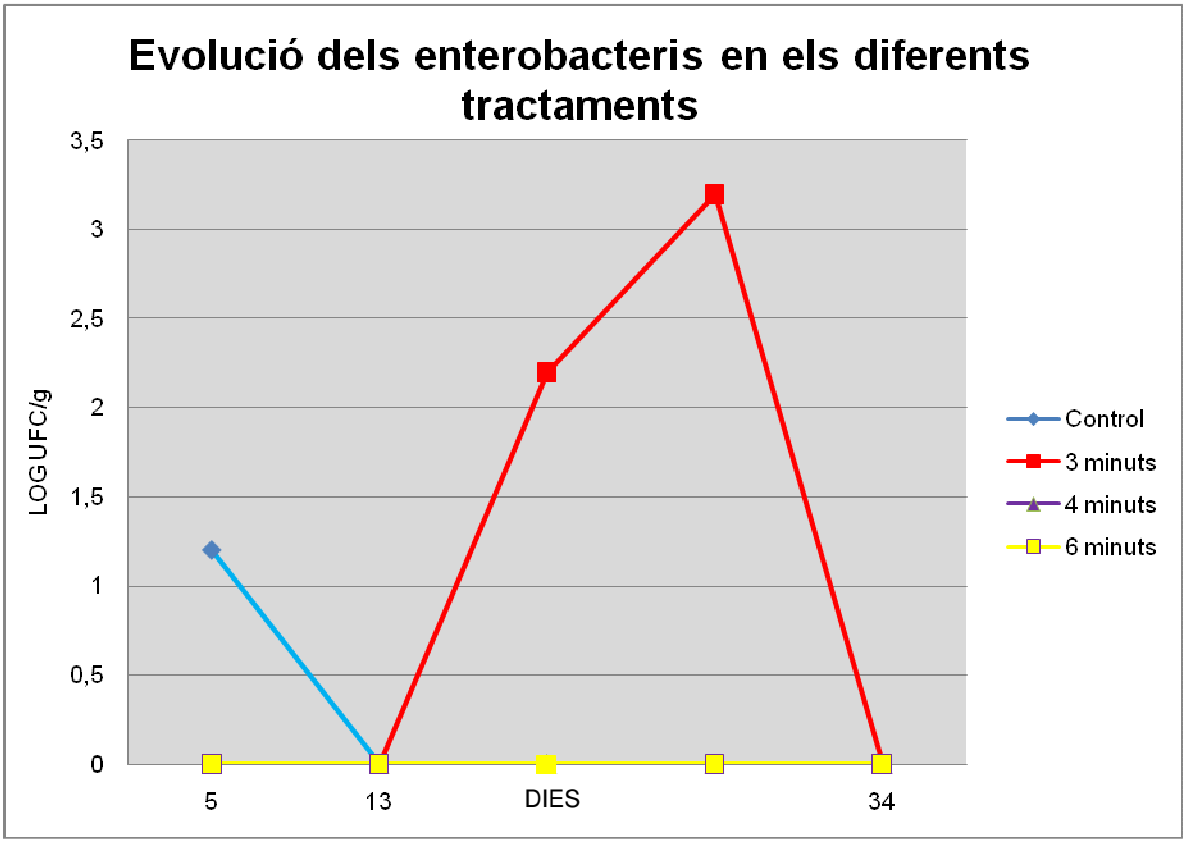


En aquest gràfic sobre els diferents temps de tractament del LHCM es presenten els aerobis totals en una escala logarítmica, que en aquest cas va de l'1 al 10,en diferents dies del tractament del producte.

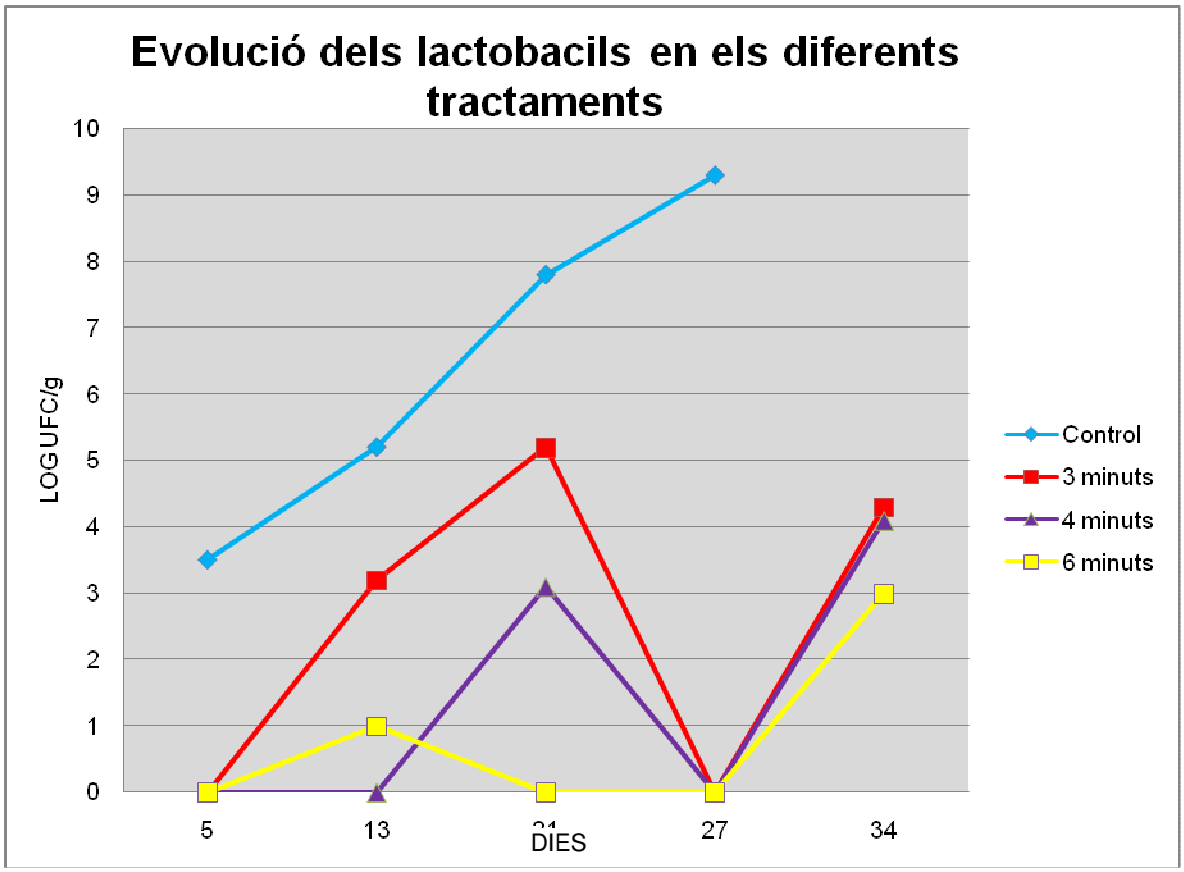
En el gràfic s'observa que el tractament més eficaçha estatl'aplicació d'altes pressions durant 6 minuts.Es tracta del producte que, al final de la seva vida útil,ha resultat menys contaminat, tot i que a uns nivells molt semblants als del LHCM tractat 4 minuts que, si bé presenta uns nivells inicials inferiors al producte tractat 6 minuts, al final de la seva vida útil en té més que el tractat 6 minuts. En tot cas, ambdós presenten uns bons recomptes d'aerobis totals.

Del producte tractat en altes pressions, el que hi ha estat 3 minuts és el que presenta uns nivells més alts d'aerobis totals al llarg de la seva vida útil,a partir del dia 27.És un producte que inicia el seu procés de descomposició i que perd les seves qualitats organolèptiques. Tot i que el tractament de 3 minuts no

éstan eficaç com els altres dos tractaments en altes pressions,els resultatssón molt millors que els obtinguts en els productes sense tractar, o grup de control. L'estudi del grup control, de fet, es va acabar el dia 27 per l'alta contaminació que presentaven els productes. Els nivells elevats d'aerobis mantinguts durant tot el temps de vida útilprovocaven que el LHCM presentés, ja en aquest període, un avançat procés dedescomposició.



En el gràfic s'observa que els nivells d'enterobacteris en els productes són baixos, segurament perquèen el procés de producció del producte s'han mantingut les condicions higièniques adequades. En els productes tractats 4 i 6 minuts en altes pressions, els nivells són molt més baixos que en el grup de control i que en el producte tractat durant 3 minuts. Aquest fetremarca que el tractament del LHCM en altes pressionscontribueix a la no proliferació d'enterobacteris.



En el gràfic de l'evolució dels lactobacils en el LHCM, s'observa que la quantitat de lactobacils del producte tractat durant 6 minuts en altes pressions es manté a uns nivells baixos durant tota la seva vida útil. En els tractament de 4 i 3 minuts,els nivells són superiors però es mantenen en la part baixa de la taula. Contràriament, els nivells del grup de control són molt elevats i molt semblants als nivells observats d'aerobis totals.

Els lactobacils també formen part del conjunt d'aerobis totals i, en el grup de control,s'observa que els nivells de lactobacils són semblants als d'aerobis totals del mateix grup. Això vol dir que la majoria d'aerobis totals del producte són, precisament, els lactobacils,culpables en bona part de la seva degradació (els lactobacils fermenten la lactosa a àcid làctic i provoquen acidesa en el producte). En canvi, en els productes tractats en altes pressions, els nivells de lactobacils són inferiors als nivells d'aerobis totals perquè aquest tractament té un efecte molt significatiu sobre ells, doncs aconsegueix eliminar-los en gran part. Per això, als productes tractats en altes pressions els costa més de perdre les qualitats organolèptiques.

5. CONCLUSIONS

En l'apartat de resultats es fa la valoració de les anàlisis microbiològiques del LHCM. Indiquen, sobretot, que el tractament del producte en altes pressions durant 6 minuts és el més eficaç per reduir la presència de microorganismes. Les anàlisis també deixen constància de la sensibilitat dels bacteris estudiats, especialment dels aerobis totals i, més en concret, dels lactobacils, al tractament en altes pressions.

Es pot contestar la **pregunta inicial** que plantejava:

- Des del punt de vista microbiològic el tractament en altes pressions és eficaç per allargar la vida útil dels aliments.

També es poden revisar les **hipòtesis** formulades al principi:

- Els aliments no tractats en altes pressions presenten uns recomptes microbiològics molt més alts que els aliments tractats en altes pressions.

- El tractament en altes pressions durant 6 minuts és el més eficaç per reduir la presència de microorganismes en els aliments, però el tractament en altes pressions durant 4 minuts és el més rendible a nivell de reducció del cost industrial i de reducció de microorganismes.

  En les anàlisis s'observa que la reducció de microorganismes en els dos temps de tractament (4 i 6 minuts) és molt semblant. Si bé ho és més en el tractament de 6 minuts, la mínima diferència de resultats podria justificar la utilització del tractament durant 4 minuts, perquè aquesta reducció de temps d'utilització de la màquina podria incidir en el cost inferior de producció total del producte.

En relació als **objectius** proposats:

- La comparació dels resultats de l'anàlisi microbiològica dels productes tractats en altes pressions i els no tractats, evidencia que els recomptes microbiològics en els productes sense tractar són molt més elevats que en els productes sotmesos a les altes pressions, en qualsevol dels temps d'exposició.

- Tots els productes, sotmesos o no a altes pressions, han donat uns recomptes mínims de *Staphylococcus aureus* i de Clostridis sulfit-reductors, i no s'ha trobat presència de *Listeria monocytogenes* ni de Salmonel·la. Això significa que les condicions higièniques durant tot el procés de producció del LHCM han estat molt correctes.

- En els resultats s'ha comprovat que les altes pressions afecten els aerobis totals i, dins d'aquest grup de bacteris, els lactobacils s'han mostrat especialment sensibles a aquest tractament. Donat que se sap que els lactobacils són uns dels bacteris que més contribueixen a la pèrdua de les qualitats organolèptiques dels aliments (són els causants dela seva acidesa),la seva reducció contribueix a allargar considerablement la seva vida útil.

- El tractament del LHCM en altes pressions durant 6 minuts ha estat el més eficaç en la reducció de microorganismes durant la vida útil del LHCM.

- La reducció de microorganismes en el temps de tractament durant 4 i 6 minuts és molt semblant. En tot cas, la mínima diferència de resultats podria justificar la utilització del tractament durant 4 minuts, perquè aquesta reducció de temps d'utilització de la màquina incideix en el cost inferior de producció total del producte.

I, respecte dels **aprenentatges**:

- He estudiat el funcionament teòric de l’aplicació de les altes pressions als aliments i he seguit directament la seva aplicació, com a procés de producció industrial, en la fase final de la producció del LHCM, a la fàbrica Riera de Sant Esteve d’en Bas.

- He après les característiques que determinen la idoneïtat dels aliments que poden ser tractats en altes pressions: una activitat d’aigua en la seva estructura superior a 0,850 (en una escala de 0 a 1) i, en el cas dels aliments líquids, l’envasat en ampolles de plàstic o en envàs flexible.

- He estudiat les característiques dels envasos que proposava Tomàs Boix en el seu treball i he aprofundit en el coneixement específic dels envasos aptes per resistir les altes pressions: els envasos al buit i els envasos al buit en atmosfera modificada. L’estudi del LHCM s’ha fet, concretament,amb el producte envasat al buit en atmosfera modificada.

- He realitzat l’estudi teòric dels microorganismes presents a la carn i he treballat al laboratori en la preparació dels cultius i la recollida dels resultats.

- He desenvolupat l’estudi microbiològic del “Lacon al horno cortado a mano”, durant el període d’estada a l’empresa, des de mitjans de juny fins a finals del mes de juliol de 2012, al laboratori de la seu central de l’empresa NOEL ALIMENTARIA, SAU, de Begudà, al municipi de Sant Joan les Fonts.

Finalment, em sembla interessant constatar la rapidesa de l'evolució tecnològica en el camp de la indústria alimentària i la incorporació del avenços en els processos de producció industrial. Només fa quatre anys, les altes pressions eren una tecnologia experimental, molt cara com per generalitzar-ne la implantació. La màquina que es va instal·lar a la Garrotxa l'abril de 2012, gràcies a la iniciativa i a la col·laboració de diverses indústries del sector carni, ja incorpora millores respecte dels tractaments de l'any 2008 (6000 Bars enlloc de 5500),té més capacitat i és més rendible.

És clara també la capacitat de la indústria per incorporar el canvis necessaris per adaptar-se a les demandes del mercat. Les indústries pateixen intensament la crisi general d'aquests darrers anys i s'esforcen en buscar solucions que els permetin estendre la distribució dels seus productes en mercats nous i exigents, com els del països emergents, per exemple. Això fa que destinin molts recursos a la investigació de noves tecnologies que els proporcionin la possibilitat d'assolir nous reptes amb garanties d'èxit. L'exportació de productes alimentaris amb les qualitats adequades i una vida útil prou llarga és una bona mostra d'aquesta política de les empreses.

Per acabar, m'agradaria apuntar algunes vies d'estudi a partir d'aquest treball:

- El valor afegit del tractament en altes pressions d'alguns aliments per a la seva incorporació en la cuina d'autor.
- L'estudi bioquímic de l'efecte de les altes pressions en aliments i bacteris.

La realització del treball de recerca de batxillerat ha esta una experiència intensa que valoro positivament. Ha estat una feina laboriosa a la que he dedicat moltes hores i que m'ha aportat molts coneixement de biologia, de química i del funcionament del món de l'empresa.

La Vall de Bianya, 10 d'octubre de 2012

6. BIBLIOGRAFIA

Bibliografia general

- BOIX BONFILL, Tomàs, *Casolà o industrial? Estudi organolèptic i microbiològic de la vida útil del pernil cuit*. Treball de recerca de batxillerat, IES La Garrotxa, curs 2007-2008.

- NOEL ALIMENTARIA, SAU (2012), web oficial de l'empresa [en línia]. [Consultat: juny-setembre 2012]. Disponible a internet: www.noel.es

Microorganismes i metodologia

- BELLETTI, Nicoletta, et al., "Inhibición de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* mediante alta presión hidrostática en un producto listo para el consumo como el bloc de foie gras", *Eurocarne: La revista internacional del sector cárnico*(Madrid), núm. 197, juny 2011, p. 56-60.

- FERRÉS GURT, Concepció, *Biologia 1. Apunts i exercicis de Biologia*. Girona: CCG Edicions, 2009.

- SAHUQUILLO, María R., "¿Y si tomo un yogur caducado?", *El País*, 19 d'agost de 2012, p. 38.

Producte

- BEJARANO, Martín S. (coordinador), *Enciclopedia de la carne y de los productos cárnicos*. Madrid: Ediciones Martin & Macías, 2001.

Procés d'altes pressions (HPP)

- JOFRÉ, Anna, et al., "Efficiency of high hydrostatic pressure at 600 MPa against food-borne microorganisms by challenge tests on convenience

meat products”, *LWT – Food Science and Technology*[Revista oficial de la Swiss Society of Food Science and Tecnology](Zuric), volum 42/5, 2009, p. 924-928.

- SHARMA, Ranjan, *High pressure processing (HPP) – market trends, opportunities and challenges*[Presentació inaugural de la AusFoodtech Conference 2011, Adelaida, Austràlia], 18 d’octubre de 2011.

- HIPERBARIC (2012), web oficial de l’empresa [en línia]. [Consultat: juliol-agost 2012]. Disponible a internet:www.hiperbaric.com

7. AGRAÏMENTS

- A Joan Serra Serra, professor de Química de l’IES La Garrotxa, per assessorar-me en tot moment.

- A Tomàs Boix Bonfill per haver-me proposat seguir el fil del seu treball de recerca.

- A l’empresa NOEL ALIMENTARIA, SAU:

  - Als meus tiets per donar-me accés a totes les dependències i els recursos tècnics i humans de la seva empresa.

  - A les persones que treballen al laboratori, especialment a Enrica Insa, Ma. Pau Vilanova, Araceli Martín i Susanna Garangou,per transmetre’m els seus valuosos coneixements.

  - A Jordi Dilmé, responsable de la màquina de tractament en altes pressions, que em va acompanyar en l’aprenentatge del seu funcionament.

- A la meva mare, per la seva magnífica ajuda i perquè ha procurat que s’entengués tot el redactat del treball.