

**Aplicación de radiaciones ionizantes beta y gamma
para la conservación en fresco de la trufa negra
(*Tuber melanosporum*) de Teruel**

MODALIDAD-B



*“Somos frutos nacidos de la
entraña descuajada de la tierra,
para que huelas y comas, somos
gratas las trufas.”*

RESUMEN

Se ha valorado la eficacia descontaminante de radiaciones ionizantes tipo beta y gamma a dosis bajas (1,5 y 2,5 kGy) sobre la población microbiana (microorganismos aeroaerobios mesófilos totales, G^o *Pseudomonas*, F^a *Enterobacteriaceae*, bacterias ácido-lácticas, flora fúngica y microorganismos aerobios mesófilos esporulados) y las características sensoriales de *T. melanosporum* envasadas en atmósferas modificadas y conservadas durante 35 días a 4 °C. Las radiaciones beta han reducido de forma significativa la carga microbiana total en 4,3 y 5,5 log.ufc/g con las dosis 1,5 y 2,5 kGy, respectivamente, mientras que aún se han obtenido mayores reducciones con las radiaciones gamma (6,4 log.ufc/g para 1,5 kGy y 6,6 log.ufc/g para 2,5 kGy). Tras la aplicación de todos los tratamientos ionizantes prácticamente desaparecen las pseudomonas, las enterobacterias, las bacterias ácido-lácticas, los mohos, las levaduras y los aerobios mesófilos esporulados. No obstante, se observa una recuperación de las levaduras a través de la conservación, convirtiéndose en el grupo microbiano predominante. La actividad fisiológica o respiratoria de las trufas irradiadas se ralentiza, dando paso a atmósferas modificadas con menores porcentajes de CO₂ y mayores de O₂. La calidad sensorial de las trufas irradiadas con 2,5 kGy y para ambos tratamientos ionizantes se ve afectada por una pérdida de la textura, alcanzando una vida útil de 28 días. Cuando las trufas son irradiadas con 1,5 kGy, las características sensoriales se conservan mejor, y su vida útil alcanza los 35 días, superando en un 25% a las trufas control y a las irradiadas con 2,5 kGy.

ABSTRACT

The effects of two low doses of beta and gamma irradiation (1,5 kGy and 2,5 kGy) on the microbial populations (total mesophilic aerobes, *Pseudomonas* genus, *Enterobacteriaceae* family, lactic acid bacteria, molds, yeasts and aerobic mesophilic spore-forming bacteria) and sensory characteristics of *Tuber melanosporum* packaged under modified atmospheres were monitored during 35 days of storage at 4 °C. Treatment with beta rays significantly reduce the total microbial load by 4,3 and 5,5 log.cfu/g with 1,5 and 2,5 kGy doses, respectively; however, higher reductions were achieved with gamma rays treatment (6,4 log.cfu/g with 1,5 kGy and 6,6 log.cfu/g with 2,5 kGy). Counts below the detection limit were detected for pseudomonads (<2,0 log.cfu/g), *Enterobacteriaceae* (<1,0 log.cfu/g), lactic acid bacteria (<1,0 log.cfu/g), molds (<2,0 log.cfu/g), yeasts (<2,0 log.cfu/g) and aerobic mesophilic spore-forming bacteria (<1,0 log.cfu/g) after all irradiation treatments. Nevertheless, a recovery from radiation damage was observed on yeasts, becoming the dominant microbial population throughout storage. Respiration rate was decreased by radiation treatments, achieving an atmosphere composition inside MAP packages lower in CO₂ and higher in O₂ than control samples. The texture of truffles irradiated with 2,5 kGy (beta and gamma rays) were negatively affected at the end of their shelf life (day 28). Truffles treated with the lower dose, 1,5 kGy (beta and gamma rays), better preserved their sensory characteristics, prolonging their shelf life to 35 days, 25% more than control and 1,5 kGy irradiated truffles.

1. Introducción y antecedentes

Los cuerpos fructíferos o ascocarpos del G° *Tuber* son conocidos comúnmente como trufas. Se trata de hongos hipógeos micorrícicos que viven en simbiosis ectomicorrízica con las raíces de un árbol huésped, principalmente *Quercus ilex* (encina), *Quercus coccifera* (coscoja), *Quercus pubescens* (roble) o *Corylus avellana* (avellano). Desde tiempos antiquísimos las trufas ocupan un importante lugar en la gastronomía, engalanando las mesas de las más altas jerarquías. Rodeadas de un halo de misticismo que comienza con la manera atípica y muy peculiar de ser cosechadas, las trufas han sido protagonistas de numerosas historias y fabulas donde se les otorga desde poderes afrodisiacos hasta malignos.

Los países mediterráneos, Francia, Italia y España son los principales productores de trufa negra del mundo (Callot y col. 1999; Reyna 2000; Moreno y col. 2006). En los últimos decenios se ha producido una marcada y notable disminución en la producción de trufas procedentes de truferas naturales. Diversos factores han contribuido al deterioro, destrucción, sustitución y merma de las truferas naturales: la pobre renovación de las mismas, la mecanización, la sobreexplotación, la transformación de zonas truferas en campos dedicados a cultivos de cereales, los cambios climatológicos bruscos con sequías estivales manifiestas, la reducción de la ganadería extensiva y, en algunos lugares, el aumento notable en la población de jabalíes (Reyna 2000). La respuesta a este descenso manifiesto en la producción de trufas y al aumento de la demanda está en el desarrollo progresivo de la truficultura en los países mediterráneos, con importantes avances en la micorrización y la plantación de campos truferos (Callot y col. 1999). Dicho interés por la truficultura no sólo responde a intereses económicos, sino también a criterios sociales y ecológicos, puesto que fija población laboral y fomenta el crecimiento de la masa forestal.

En los últimos años se han alcanzado avances considerables en la truficultura gracias a

la creación de diversos grupos de trabajo que dirigen proyectos en torno a la trufa, y al desarrollo de actividades y jornadas técnicas y de campo (Reyna 2004). En cualquier caso, la falta de transparencia que rodea aún hoy en día el sector trufero en España hace difícil la tarea de evaluar correctamente la producción de trufas y la situación real de dicho sector. Pero a pesar de los logros conseguidos en el campo de la truficultura, los aspectos relativos a la conservación, manejo post-cosecha y control de calidad de las trufas han sido obviados, relevados a un segundo o tercer plano.

Es necesario preservar al máximo todo el potencial aromático que encierra este hongo luego de ser cosechado, de manera que el consumidor pueda percibir esas explosivas notas aromáticas que hacen de las trufas un regalo único de la naturaleza. Tratándose de un producto de alta cotización, las trufas merecen recibir el mismo trato y cumplir con un control de calidad y aptitud sanitaria tal y como debe suceder en la comercialización de todo alimento.

Conocida como el “diamante negro de la cocina”, la trufa negra o de invierno (*T. melanosporum*) constituye uno de los condimentos alimentarios más cotizados internacionalmente. Su escasez y sus propiedades organolépticas en estado fresco, en especial su potencial aromático, contribuyen a su elevado valor económico.

En las últimas décadas la truficultura ha cobrado un especial interés en España, siendo Aragón, y en concreto la Sierra de Javalambre, la principal zona trufera y una de las más importantes del mundo. Pese a que la cultura gastronómica de estos frutos hipogeos es mayor en Francia e Italia, la demanda de trufas frescas también se ha incrementado en los últimos años en España siendo cada vez más frecuente su inclusión en las cartas de numerosos restaurantes. Como consecuencia, se precisa aumentar la producción y encontrar los mecanismos que logren incrementar la disponibilidad del producto, estabilizar el precio de

mercado de las trufas frescas a lo largo de la mayor parte del año y la crear empresas prioritariamente de ámbito rural dedicadas a la comercialización de trufa fresca y otros productos trufados.

Como parte de este creciente interés en las trufas, hacia el año 2007 varios grupos de investigación del territorio nacional (DIEF-Valonsadero, CITA-Aragón, Universidad de Lleida, Universidad de Navarra, Fundación CEAM y Universidad de Zaragoza) unieron conocimientos y esfuerzos para solicitar al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) financiación para el proyecto denominado “Desarrollo integral de la truficultura de Teruel”. Dentro de este proyecto se incluyeron seis sub-proyectos, todos ellos complementarios, que abarcaban aspectos pre-cosecha, como la caracterización ecológica de las masas naturales forestales de Teruel con producción de trufa negra, el análisis y estudio de los factores bióticos y abióticos que afectan a la producción y a la calidad de la trufa negra de Teruel y el desarrollo de métodos de lucha para el control de parásitos, patógenos y contaminantes, tanto de la trufa negra como de sus huéspedes.

Los aspectos post-cosecha de la trufa, a cargo de nuestro grupo de investigación y pionero en este sentido en nuestro país, se han desarrollado mediante el sub-proyecto INIA “Incremento de la vida comercial de la trufa negra: utilización de métodos combinados; aplicación de nuevas tecnologías para su conservación”. En el marco de este sub-proyecto se ha efectuado el primer trabajo de investigación existente en España dedicado a la conservación en fresco de la trufa negra, a través del cual se han aplicado distintas técnicas y tecnologías con el fin de caracterizar el producto en fresco y alargar su vida útil. La investigación que aquí se presenta es la culminación del trabajo desarrollado durante varios años en los que se ha caracterizado microbiológica (Rivera y col., 2010a), fisiológica y organolépticamente (Rivera y col. 2010b) las especies *Tuber aestivum* y *Tuber*

melanosporum. Además, se han establecido las condiciones óptimas de envasado en atmósferas modificadas para trufas frescas (Rivera y col. 2010b) basándose en la actividad respiratoria y la tolerancia a distintas concentraciones de O₂ y CO₂ (Rivera y col., 2008a) y se han ensayado y optimizado diversos métodos descontaminantes (Rivera y col. 2008b). Todo este experimental ha permitido el desarrollo exitoso de una tesis doctoral (Rivera 2009).

2. Objetivos

El objetivo general de esta investigación ha sido valorar y determinar el efecto descontaminante de las radiaciones ionizantes de tipo beta (electrones acelerados o corpusculares) y de tipo gamma (electromagnéticas o no corpusculares) combinadas con la conservación en atmósferas modificadas como metodología de obstáculos para prolongar la vida útil de trufas frescas de la especie *Tuber melanosporum*.

Este objetivo general se pretende conseguir a través de una serie de objetivos parciales que son descritos a continuación:

- 1º Establecer la eficacia descontaminante de los dos tipos de radiaciones ionizantes existentes (beta y gamma) en *T. melanosporum*
- 2º Establecer el efecto que ejercen las radiaciones ionizantes sobre la actividad respiratoria de *T. melanosporum*
- 3º Determinar el efecto combinado de las radiaciones ionizantes y la conservación en atmosferas modificadas de *T. melanosporum* sobre los principales grupos microbianos que colonizan este condimento y sobre las características sensoriales de los carpóforos

3. Revisión bibliográfica

La trufa por excelencia en España, y la más reconocida a nivel mundial es sin lugar a dudas el *diamante negro de la cocina*, *Tuber melanosporum*. Conocida comúnmente como trufa negra, trufa de invierno o trufa negra del Périgord, sus características organolépticas, en especial su intenso sabor y su aroma excepcional la han convertido en la reina de las trufas y son responsables indiscutibles de su elevado valor económico y gastronómico.

Tradicionalmente la gastronomía y comercialización de trufas se relaciona con Francia e Italia, sin embargo, en los últimos años se ha experimentado un incremento significativo en la demanda de trufas frescas en España siendo frecuente su inclusión en los menús de muchos restaurantes. Para satisfacer la creciente demanda es necesario aumentar la producción y encontrar los mecanismos precisos para estabilizar la disponibilidad del producto en fresco, estado en el que se alcanza el máximo valor económico y gastronómico. Sin embargo, la vida útil de las trufas frescas si no se aplica una tecnología apropiada de conservación es muy reducida (~7 días).

Las trufas son cosechadas cuando alcanzan su plena madurez, por lo cual están más cercanas a la senescencia. Es por tanto esencial mimarlas; sin embargo, actualmente no son objeto de las tecnologías post-cosecha que usualmente se aplican a otros productos frescos y en un porcentaje muy elevado se comercializan de mano en mano (recolector a intermediario), con tierra de cobertura, en sacos y en la mayoría de los casos sin el necesario apoyo de la refrigeración y sin el obligado control de calidad.

El nicho ecológico en el cual se desarrollan las trufas (rizósfera) alberga una importante y variada población microbiana, dando lugar a una elevada carga microbiana en torno a las mismas. Se ha determinado que la carga microbiana total de las trufas oscila entre 7 y 8 log.ufc/g (Barbieri y col. 2005; Nazzaro y col., 2007, Rivera y col., 2010a,b), y que está presente principalmente sobre la superficie o el peridio de los ascocarpos sanos (Rivera y col., 2010a). Estudios realizados para caracterizar la población microbiana asociada a las trufas, han determinado que dicha población es estable y que está integrada principalmente por microorganismos del G^o *Pseudomonas* (Bedini y col., 1999; Sbrana y col., 2002; Barbieri y col., 2007; Rivera y col., 2010a). En *T. melanosporum*, Rivera y col. (2010a) señalan que la población microbiana del G^o *Pseudomonas* alcanza las 7,9 log.ufc/g y que en un segundo plano quedan las enterobacterias (5,1 log.ufc/g) y las levaduras (5,0 log.ufc/g).

No existe al día de hoy una legislación que establezca criterios microbiológicos y límites de seguridad para las trufas frescas. No obstante la incidencia de *Listeria monocytogenes* ha sido previamente señalada por Reyes y col. (2006) en carpóforos frescos de *Tuber indicum* y por Rivera y col. (2010a) en *Tuber aestivum*, aumentando la necesidad de desarrollar estrategias descontaminantes y de conservación que aseguren los parámetros de calidad y seguridad que exige el mercado alimentario. No podemos pasar por alto que las trufas son consumidas principalmente crudas, hecho que sugiere la utilización de procedimientos descontaminantes que ofrezcan seguridad alimentaria al consumidor.

Los métodos tradicionales de descontaminación, físicos o químicos, aplicados a productos frescos disminuyen la carga microbiana superficial; sin embargo, otra problemática añadida en la conservación de trufas frescas es la frecuente presencia de carpóforos parasitados, por lo que es imprescindible realizar una selección minuciosa de los carpóforos previo a la aplicación de cualquier metodología de conservación, eliminando aquellos

dañados o manifiestamente parasitados. Rivera (2009) desarrolla una metodología de obstáculos para la descontaminación y conservación de *T. aestivum* y *T. melanosporum* aplicando etanol al 70% y ultrasonidos, y conservando las trufas en atmósferas modificadas. Con esta metodología se ha conseguido alargar la vida útil de la trufa de verano hasta 21 días y de la trufa negra hasta 28.

La presencia de formas parasitarias dentro de los carpóforos puede pasar inadvertida, por lo que un proceso de descontaminación que inactive dichas formas sería altamente recomendable. La aplicación de radiaciones ionizantes es una alternativa interesante para trufas frescas puesto que su acción no se limita a un plano superficial, sino que penetran al interior del producto y eliminan tanto los microorganismos presentes en el peridio de las trufas así como microorganismos, larvas de insectos o parásitos que se encuentren en el interior o gleba de las mismas.

La irradiación de alimentos consiste en someter el producto a radiaciones ionizantes a) electromagnéticas o no corpusculares (rayos gamma) o b) corpusculares (rayos beta o electrones acelerados). Los radioisótopos emisores de radiación gamma utilizados en alimentos son principalmente el cobalto 60 (^{60}Co), donde la energía máxima es de 1,25 MeV y el cesio 137 (^{137}Cs), con una energía máxima de 0,7 MeV, mientras que para los electrones acelerados la energía máxima es de 10 MeV.

Los diferentes estudios científicos realizados en 1980 por varios organismos internacionales, como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA) determinaron que la irradiación de alimentos hasta una dosis media global de 10 kGy, no crea problemas especiales de orden nutricional,

microbiológico o sanitario (Thayer y Rajkowski 1999; Thakur y Singh 1995; Reale y col. 2009) en los consumidores.

Las radiaciones ionizantes surgen como una alternativa a la aplicación de agentes químicos cuando éstos son inadecuados para la desinfección de determinados alimentos. El mecanismo de acción de las radiaciones ionizante afecta al ADN, por la producción de radicales libres, inactivando las células vivas, de manera que se impide la reproducción de los microorganismos. Entre las ventajas de su utilización están que no ocurre un aumento significativo de temperatura durante su aplicación (fueron inicialmente conocidas como esterilización fría), que inactiva un gran número de microorganismos, insectos, y parásitos, que no deja residuos y que no afecta significativamente a las características físicas del alimento.

Pese a todas estas ventajas, actualmente existe una gran polémica sobre la utilización de este tipo de tratamientos en alimentos, tanto en el ámbito científico como social, con un marcado rechazo por parte de los consumidores. Sin embargo, su uso se ha implantado en varios países, principalmente en EEUU. La Directiva 1999/3/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de febrero de 1999 establece una lista de alimentos que pueden ser tratados con radiaciones ionizantes y los países en los que están permitidos.

En España, el Real Decreto 348/2001 limita su utilización a hierbas aromáticas secas, especias y condimentos vegetales, con una aplicación máxima de 10 kGy. A través del Diario Oficial de la UE 2006/C 112/05, algunos países como Francia, Bélgica, Holanda, Italia, Polonia y el Reino Unido han ampliado la utilización de las radiaciones ionizantes a otros productos, siendo permitida la aplicación de hasta 2 kGy en hongos en Reino Unido y en Bélgica. En Japón es posible también la aplicación de radiaciones ionizantes en setas, hasta 1

kGy. Sin embargo y a pesar de su condición de hongos, las trufas deberían ser consideradas a todas luces como condimentos, puesto que su aplicación en la cocina así lo ratifica y justifica.

Actualmente en España existen dos empresas autorizadas como instalaciones radioactivas según, la Directiva 1999/3/CE. Estas empresas son Aragogamma, en Les Franqueses del Vallés (Barcelona) donde se irradia con ^{60}C (radiación γ), y en Tarancón (Cuenca) se encuentra Ionisos Ibérica, que posee un rhodotron (acelerador de electrones), utilizando radiación β .

La aplicación de radiaciones ionizantes en frutas y vegetales ha sido ampliamente estudiada, y su utilización data de hace varias décadas; así ya en 1979, Basson y col. someten mangos a radiaciones gamma (1 kGy), y en el presente su eficacia se ha estudiado en papaya, tomate, melón, fresa, manzana, zumo de naranja, lechuga y repollo, entre otros (Arvanitoyannis y col. 2009).

Varios estudios consideran la utilización de las radiaciones ionizantes en cuerpos frutíferos de trufa de verano o *T. aestivum* (Adamo y col. 2004; Nazzaro y col. 2007; Reale y col. 2009). Adamo y col. (2004) observan que trufas de verano tratadas con dosis de 3,5 y 10 kGy presentan ablandamiento y oscurecimiento de la gleba y la reducción de la microbiota tras la aplicación del tratamiento, se pierde o recupera tras 14 días de conservación. Con dosis menores de radiación, de 1,5 y 2 kGy, también se observa una disminución de la carga microbiana de las muestras, pero que además se mantiene durante todo el periodo de conservación (9 semanas). Este estudio recomienda dosis de 1,5 kGy para el tratamiento de las trufas de verano ya que dosis mayores pueden afectar negativamente a sus características bioquímicas, texturales y organolépticas.

Nazzaro y col. (2007) determinan que la aplicación de 1,5–2,0 kGy disminuye la carga microbiana de trufas de verano y mantiene su calidad sensorial hasta 30 días de conservación

bajo refrigeración. En estudios más recientes, Reale y col. (2009) confirman la eficacia de 1,5 kGy para prolongar la vida útil de trufas de verano hasta 40 días.

Fратиanni y col. (2007) evalúan las propiedades mutagénicas y antimutagénicas de carpóforos de *T. aestivum* irradiados, y las posibles modificaciones que pudiese producir la irradiación sobre el producto; llegan a la conclusión de que pueden existir biomoléculas en las trufas, que tanto solas, o de manera sinérgica, ejerzan un efecto inhibitorio de los compuestos mutagénicos. También determinan modificaciones leves de biomoléculas antioxidantes que podrían inhibir el proceso oxidativo, influenciando la actividad antimutagénica de las trufas.

Con estos antecedentes se convierte en una alternativa interesante la combinación de tratamientos ionizantes y junto a la conservación en atmósferas modificadas de *T. melanosporum* a 4 °C, como metodología de barreras que permita alargar la vida útil de tan preciado alimento.

4. Materiales y Métodos

4.1. Especie y procedencia

Para el desarrollo de esta investigación la especie de trufa objeto de estudio, ha sido la de mayor importancia económica y gastronómica en España: la trufa negra o de invierno, *Tuber melanosporum*, procedente de la comarca de Sarrión (Teruel) (Fig. 4.1.1).

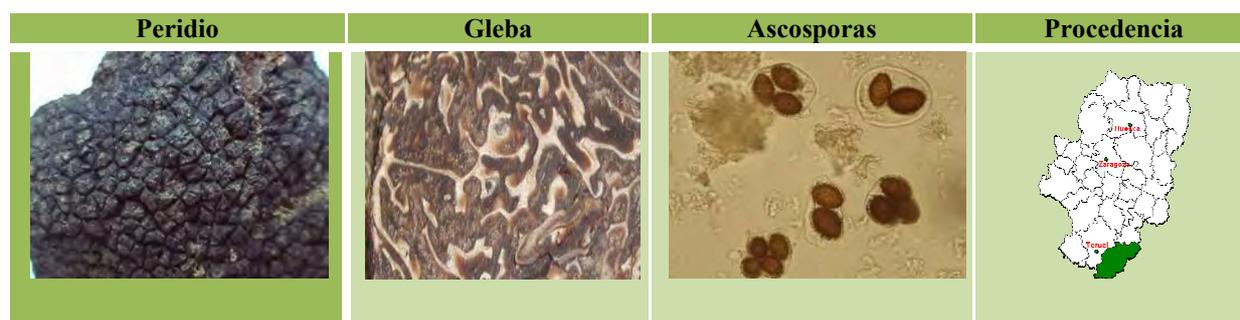


Figura 4.1.1. Características macroscópicas y microscópicas de *T. melanosporum* y lugar geográfico de procedencia (comarca de Sarrión, Teruel).

La época de recolección de esta especie, evoca su nombre común, el invierno. Los meses de recolección se muestran en el calendario de la tabla 5.1.2.

Especie	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
<i>T. melanosporum</i>												

Tabla 5.1.2. Época de recolección de y *T. melanosporum*

4.1.1. Recolección, limpieza y selección de las muestras

La forma de procesar las trufas antes del experimental se ilustra detalladamente en la figura 4.1.2.

La recolección o “caza” de las trufas se ha realizado mediante el empleo de perros adiestrados en trufas cultivadas de Sarrión. Una vez recolectadas, las trufas eran trasladadas a la empresa dedicada a su comercialización y tras una primera selección se acondicionaban en cajas de poliespan, y se enviaban inmediatamente en transporte refrigerado a nuestro laboratorio.

Las trufas se recepcionaban con tierra de cobertura por lo que nada más llegar al laboratorio se eliminaba mediante lavado con agua de red fría y cepillado; se dejaban secar en cabina de flujo laminar. Posteriormente se realizaba una selección minuciosa de las muestras, con la ayuda de una lupa binocular, y descartando los carpóforos parasitados, aquellos con daños o traumatismos severos ocasionados por el perro o con el cuchillo trufero y aquellos excesivamente maduros o senescentes.

<i>Fase</i>	<i>T. melanosporum</i> Trufas cultivadas	
Recolección de los carpóforos mediante el empleo de perros truferos adiestrados y recolectores experimentados.		
Envío desde la empresa distribuidora a la Universidad de Zaragoza: en cajas de poliespan, con tierra de cobertura y refrigeradas		
Recepción en el laboratorio, lavado con agua fría y cepillado, secado en cabina de flujo laminar		
Selección minuciosa con estereomicroscopio (10-40 aumentos)		

Figura 4.1.2. Procedimiento de recolección, transporte, limpieza, lavado y selección de las trufas antes de la realización del experimental.

4.2. Tratamiento con radiaciones ionizantes

Tras la selección, las trufas fueron colocadas, de manera aséptica, en envases plásticos alveolados de 6 compartimentos que a su vez se introdujeron en bolsas plásticas y se termosellaron con el fin de evitar recontaminaciones posteriores durante el envasado. Un envase, de cada uno de los lotes establecidos, fue seleccionado al azar para la determinación de la eficacia descontaminante. Debido a la alta variabilidad microbiológica individual existente entre las trufas, y constatada en estudios previos (Rivera 2009), los carpóforos, previo a su descontaminación, se dividieron en dos mitades iguales, mediante el empleo de guantes y bisturí estériles. La mitad de cada trufa se sometió al tratamiento ionizante y la otra mitad constituyó la muestra control. Este procedimiento nos permitió establecer con mayor exactitud la eficacia del tratamiento descontaminante empleado. Para cada tratamiento se emplearon 50 unidades muestrales. Las trufas fueron transportadas en cajas de poliespan bajo refrigeración hasta las plantas de irradiación.

4.2.1. Tratamiento con radiaciones beta

El tratamiento se llevó a cabo en la empresa Ionisos, Ibérica (Tarancón, Cuenca), equipada con un acelerador de electrones (Rhodotron TT200, IBA, Louvain La Neuve, Bélgica), con una energía máxima de 10 MeV, 10 kW nivel de potencia, y 98 kGy/min de dosis mínima. Las muestras se depositaron en una bandeja metálica que con la ayuda de una cinta transportadora fueron introducidas en el recinto de tratamiento (ver figura 5.2.1). La exposición a los electrones acelerados se realizó por la parte superior de las bandejas. Para obtener las dosis de radiación seleccionadas, 1,5 y 2,5 kGy, se ajustó la velocidad de la cinta transportadora a 0,2, y 0,1 m/s, respectivamente.

La dosis de irradiación absorbida por las muestras se evaluó mediante dosímetros FWT 60-00 (Far West Technology Inc., Goleta, CA, USA) dispuestos en la parte superior de 3 bandejas equidistantes. Estos dispositivos consisten en finas láminas que contienen

derivados incoloros de la familia de los aminotrifetil-metano que adquieren un color azul más o menos intenso en función de la dosis de irradiación absorbida. La intensidad del color se determina espectrofotométricamente a 600 nm, utilizando para su lectura un espectrofotómetro UV-Vis Genesys 5 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Para las trufas irradiadas con 1,5 kGy, la dosis media recibida fue de $1,59 \pm 0,02$ kGy para las tratadas con 2,5 kGy, la dosis media fue de $2,64 \pm 0,03$ kGy.

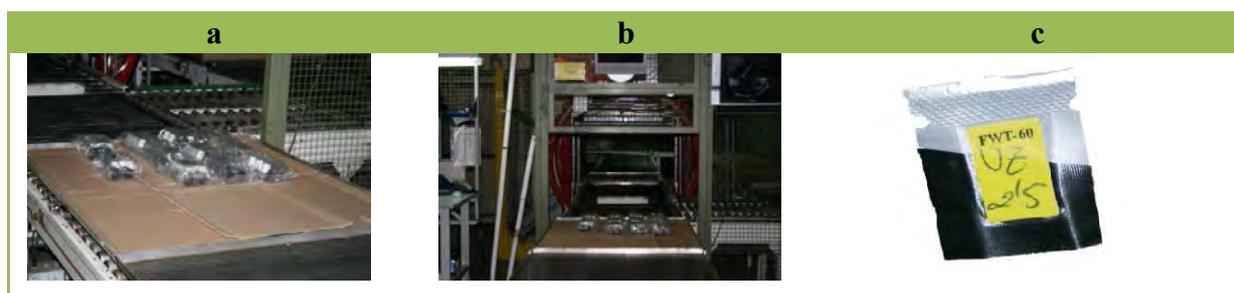


Figura 4.2.1. Muestras de trufas preparadas para irradiar (a); trufas en la cinta transportadora dispuestas para su irradiación (b); dosímetro FWT-60

4.2.2. Tratamiento con radiaciones gamma

El tratamiento se llevó a cabo en Arogogamma, S. L. (Les Franqueses del Vallés, Barcelona), equipada con irradiador de ^{60}Co . Las muestras se depositaron en cajas de dimensiones normalizadas, que son introducidas en el interior de la Unidad de irradiación, donde mediante unos dispositivos especiales son movidas durante el tiempo preestablecido para cada dosis (1,5 y 2,5 kGy). La dosis de irradiación absorbida por las muestras se evaluó mediante dosímetros Amber Perspex 3042 (Atomic Energy Research Establishment, Harwell, Oxfordshire, UK) dispuestos en la parte superior y en la parte interna de las cajas conteniendo las trufas. El resultado del dosímetro se determinó mediante su lectura espectrofotométrica a 600 nm empleando un Espectrofotómetro Hitachi U-2800 (Hitachi, Japón). Las trufas irradiadas con 1,5 kGy, $1,49 \pm 0,05$ kGy y para las tratadas con 2,5 kGy la radiación media fue de $2,59 \pm 0,07$ kGy.

Tras la irradiación, las trufas fueron de nuevo transportadas bajo refrigeración al

laboratorio donde se realizaron los pertinentes análisis microbiológicos (sección 5.3) y sensoriales (sección 5.7) correspondientes al día 0; el resto de las trufas se conservaron a 4 °C en atmósferas modificadas efectuándoles analíticas de frecuencia semanal durante todo el periodo de conservación.

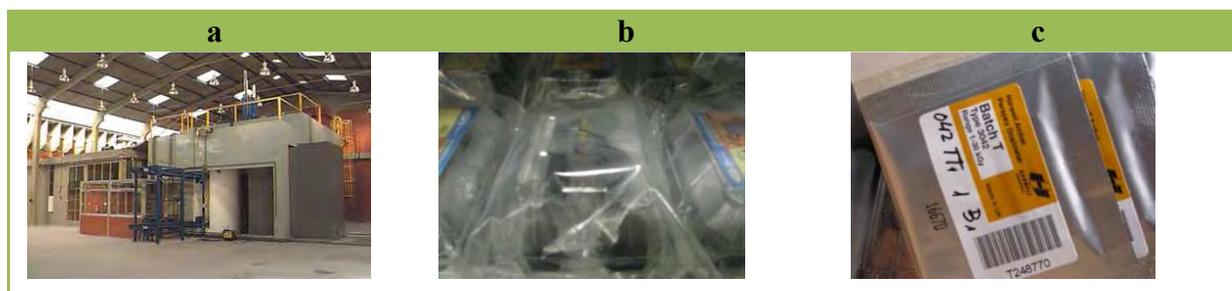


Figura 4.2.1. Instalaciones irradiación (a); trufas dispuestas para su irradiación (b); dosímetro Amber Perspex 3042.

4.3. Analítica microbiológica

Las muestras fueron sometidas a la investigación cuantitativa de microorganismos aero-anaerobios mesófilos totales, G^o *Pseudomonas*, F^a *Enterobacteriaceae*, bacterias ácido-lácidas, flora fúngica y microorganismos aerobios mesófilos esporulados.

La analítica microbiológica se realizó en trufas sin irradiar (control), y tras la aplicación de todos los tratamientos ionizantes. El seguimiento microbiológico de todos los lotes establecidos se realizó semanalmente.

En la tabla 4.3.1 se muestran las condiciones de estudio para los distintos grupos microbianos investigados.

Grupo microbiano/ Normativa ISO	Alícuota Homogenización	Medio de Cultivo	Condiciones de incubación	Morfología colonial
Microorganismos aero-anaerobios mesófilos totales ISO 4833:2003	1 mL Masa	Agar de Recuento en Placa (PCA, Merck)	30 °C/72 h Régimen aeróbico	
G° <i>Pseudomonas</i> ISO 11290-1:2004	0,1 mL Superficie	Agar Base <i>Pseudomonas</i> + Cetrimida, Fucidina y Cefaloridina (CFC, Oxoid)	24 °C/24 h Régimen aeróbico	
F^a <i>Enterobacteriaceae</i> ISO 21528-2:2004	1 mL Masa	Agar Glucosa, Cristal Violeta, Bilis y Rojo Neutro (VRBG, Merck) + doble capa del mismo medio	30 °C/24 h Régimen aeróbico	
Bacterias ácido-láctica ISO 15214:1998	1 mL Masa	Agar Man Rogosa Sharpe (MRS, Merck)	30 °C/72 h Régimen microerófilo (5-10% CO ₂)	
Mohos y levaduras ISO 7954:1998	0,1 mL Superficie	Agar Dicloran Rosa Bengala y Cloranfenicol (DRBC, Merck), suplementado con gentamicina al 0,1%	24 °C/120 h Régimen aeróbico	
Microorganismos aerobios esporulados ISO 4033/2003	80 °C/10' 1 mL Masa	Agar de Recuento en Placa (PCA, Merck)	37 °C/72 h Régimen aeróbico	

Tabla 4.3.1. Condiciones analíticas utilizadas para la cuantificación de los distintos grupos microbianos investigados.

4.4. Determinación de la actividad respiratoria

La determinación de la actividad respiratoria se realizó utilizando un sistema cerrado y a 4 °C. Las trufas seleccionadas fueron pesadas y colocadas en frascos de cristal de 700 mL, herméticamente cerrados con tapas que, mediante la adaptación de un septum (Fig. 4.1.6-A y B), facilitaban y permitían la toma de muestras del espacio de cabeza. El volumen libre se calculó por la diferencia entre la capacidad del frasco y el volumen ocupado por la muestra. En cada frasco se introducían alrededor de 120 g de trufa, lo que correspondía a un volumen libre aproximado de 580 mL. Los ensayos se efectuaron por triplicado para cada uno de los lotes establecidos. Periódicamente se tomaban muestras del espacio de cabeza de los frascos y se determinaba la concentración de oxígeno y dióxido de carbono por cromatografía de gases (sección 4.6). El experimento finalizó cuando la concentración de O₂ descendía a cotas anaeróbicas (<2%).



Figura 4.4.1. Preparación de los frascos con trufas para la determinación de la actividad respiratoria (A) y detalle del septum y toma de muestra gaseosa (B).

4.5. Envasado en atmósfera modificada

Para el envasado de las trufas frescas en atmósferas modificadas se utilizaron barquetas de polipropileno semirrígidas (TS250, Linpac), de 250mL de capacidad, en las que se introdujeron alrededor de 50 g de trufa.

El cierre de las barquetas se realizó por termosellado con película plástica microperforada por láser (PPLUS, Amcor Flexible); esta película de 96 cm² que está compuesta por una doble capa de polietileno (40 µm) y poliéster (12 µm), se ha termosellado a las barquetas mediante una envasadora manual BOV 160 (ORA Constructeur, Francia) (Fig. 4.5.1).

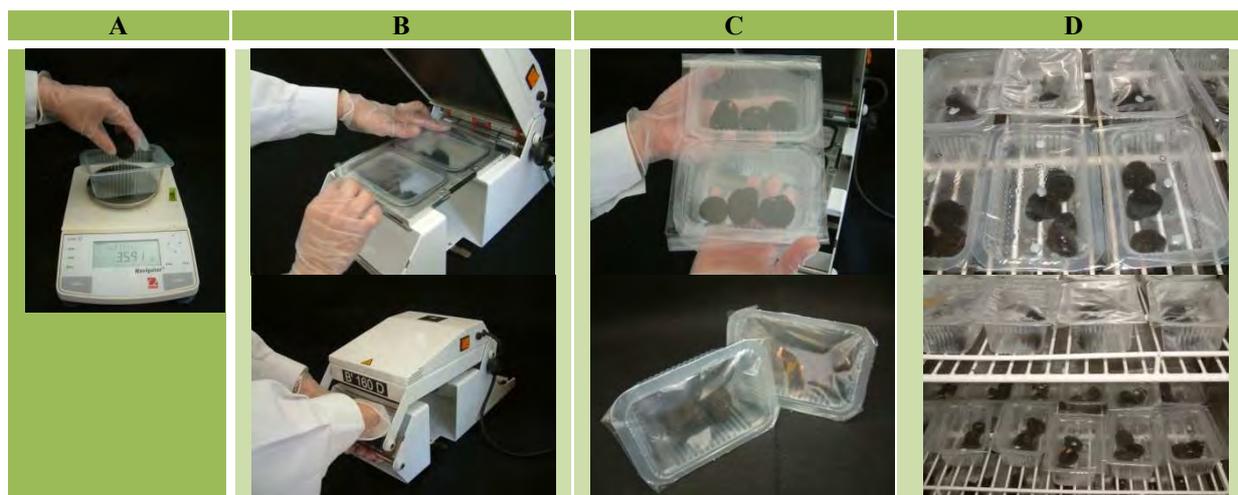


Figura 4.5.1. Sistema empleado en el envasado de *T. melanosporum* en atmósfera modificada pasiva. Preparación de muestras en barquetas de polipropileno (A); termosellado con envasadora manual (B); envase listo para la conservación (C); barquetas en conservación a 4 °C (D).

La composición gaseosa del interior de los envases se evaluó a lo largo del tiempo hasta que se alcanzó el equilibrio. Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía gaseosa con los equipos y en las condiciones descritas en la sección 5.6.

4.6. Determinación de las concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono

La determinación de la concentración gaseosa en los ensayos de investigación de la actividad respiratoria y del envasado en atmósfera modificada se realizó por cromatografía de gases. Las muestras del espacio de cabeza de los frascos o envases se extraían utilizando una jeringa Hamilton Gastight 1710N, e inyectando un volumen de 50 µL en un cromatógrafo Hewlett Packard 4890-A, equipado con un detector de conductividad térmica.

Las condiciones del análisis cromatográfico se muestran en la tabla 4.6.1. El tiempo

de retención del O₂ bajo dichas condiciones es de 1,8 minutos y del CO₂ de 6,5 minutos.

Bajo estas mismas condiciones de análisis, se inyectaron mezclas de calibración de composición certificada, para obtener la curva patrón del oxígeno (Fig. 5.6.1). Las medidas se tomaron en el intervalo de concentración del 0 al 25 %.

CONDICIONES DE ESTUDIO	
Equipo detector	Cromatógrafo Hewlett Packard 4890-A
Sistema de inyección	Jeringa Hamilton Gastight 1710N
Volumen muestra inyectada	50 µL
Gas portador/velocidad de flujo	Helio/12,6 mL min ⁻¹
Columna	CP-Carboplot (Chrompack)
Diámetro interno/longitud	0,53 mm/25 m
Temperatura inicial del horno	40 °C
Tiempo inicial	2,5 min
Velocidad de calentamiento	45 °C min ⁻¹
Temperatura final del horno	115 °C
Tiempo final	4,5 min
Temperatura del inyector	59 °C
Temperatura del detector	120 °C

Tabla 4.6.1. Condiciones del análisis cromatográfico para la determinación de O₂ y CO₂.

4.7. Análisis sensorial

La analítica sensorial de las trufas se ha realizado mediante un análisis descriptivo y hedónico, para el cual hemos establecido y entrenado un panel de 10 catadores (Fig. 5.7.1). Las trufas se han valorado externa e internamente, el mismo día de iniciarse los experimentos, tras los tratamientos, y semanalmente durante la conservación.



Figura 4.7.1. Panel de catadores en entrenamiento (A); valorando las trufas (B); láminas de trufas para ser catadas (C).

La evaluación externa se realizó sobre los carpóforos enteros e incluyó la textura, el color o la calidad visual y el aroma. La valoración de la textura se realizó situando el

carpóforo entre el dedo pulgar e índice y ejerciendo una ligera presión. Las características internas (textura, calidad visual, aroma y sabor) se evaluaron sobre finas láminas de trufa (1 mm). Para la evaluación, los catadores utilizaron una hoja de datos donde puntuaron los distintos parámetros, para al final otorgar una valoración global del producto. También se reservó un espacio en las hojas de evaluación sensorial para que el catador anotase si percibía olores o sabores anómalos. Para facilitar la calificación de algunos de los parámetros se diseñó una escala hedónica, cuya puntuación máxima era de 9. Las hojas de evaluación sensorial (Fig. 4.7.2) así como la tabla auxiliar (Tabla 4.7.1) para la evaluación de *T. melanosporum* se observan a continuación.

	9-8	7-6	5-4	3-2	1
Textura	Dura	Moderadamente dura	Moderadamente blanda	Blanda	Inaceptable
Aroma	Típico	Moderadamente fuerte	Aroma moderada	Aroma leve	No típica
Color	Venas blancas bien definidas	Venas blancas menos definidas, color más oscuro	Venas de color marrón, poca visibilidad de venas	Venas marrón oscuro	Gleba Completamente homogénea
Flavor	Típico	Típico, pero menos persistente	Moderado	Sabores extraños	No típico
Aceptabilidad General	Definitivamente Aceptable	Aceptable	Puede ser aceptable	Poco aceptable	Inaceptable
Desarrollo micelio ó levaduras	0	1	2	3	4
	No existe	Leve	Moderado	Bastante	Abundante

Tabla 4.7.2. Tabla auxiliar empleada para la evaluación sensorial de *T. melanosporum*.

Muestra:							
Textura							
9	8	7	6	5	4	3	2
[_____]							
Aroma							
9	8	7	6	5	4	3	2
[_____]							
Color							
9	8	7	6	5	4	3	2
[_____]							
Sabor							
9	8	7	6	5	4	3	2
[_____]							
Micelio							
0		1		2		3	4
[_____]							
Levaduras							
0		1		2		3	4
[_____]							
Anotaciones:							

Figura 4.7.2. Hoja para la evaluación sensorial de *T. melanosporum*.

4.8. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos con los diferentes parámetros evaluados se compararon estadísticamente mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA de una vía) combinado con el test de Tukey de rango múltiple con un nivel de significación del 0,05. En el análisis de datos se utilizó el programa estadístico SPSS versión 15.0 (Windows 2006).

5. Resultados y discusión

Los distintos lotes de trufas valorados tras la aplicación de radiaciones ionizantes mediante rayos gamma y rayos beta y conservados en atmósferas modificadas, se observan en la tabla 5.1.

Lote	Abreviatura	Tratamiento descontaminante	Conservación (4 °C)	Tiempo (días)
Control	C	Ninguno	Atmósfera modificada	28
Rayos β – 1,5 kGy	1,5-B	1,5 kGy	Atmósfera modificada	35
Rayos γ – 1,5 kGy	1,5-G	1,5 kGy	Atmósfera modificada	35
Rayos β – 2,5 kGy	2,5-B	2,5 kGy	Atmósfera modificada	35
Rayos γ – 2,5 kGy	2,5-G	2,5 kGy	Atmósfera modificada	35

Tabla 5.1. Lotes establecidos para la conservación de *T. melanosporum* mediante radiaciones ionizantes y atmosferas modificadas.

La vida útil de cada lote se estableció en base a las características organolépticas y de aceptabilidad comercial que presentaron los carpóforos durante su conservación.

5.1. Eficacia descontaminante de los tratamientos de irradiación

Los recuentos microbiológicos de las trufas utilizadas en este experimental, antes y tras la aplicación de radiaciones ionizantes beta y gamma (1,5 kGy y 2,5 kGy), se muestran en la tabla 5.1.1.

	C	1.5-B		1.5-G		2.5-B		2.5-G	
		R*	RL**	R	RL	R	RL	R	RL
Totales	7,7 ^a ±0,6	3,3 ^b ±1,7	4,3	1,3 ^c ±0,3	6,4	2,1 ^{b,c} ±1,2	5,5	1,1 ^c ±0,1	6,6
Pseudomonas	7,0 ^a ±0,7	<2,0 ^b	>5,0	<2,0 ^b	>5,0	<2,0 ^b	>5,0	<2,0 ^b	>5,0
Enterobacterias	4,9 ^a ±0,9	<1,0 ^b	>3,9	<1,0 ^b	>3,9	<1,0 ^b	>3,9	<1,0 ^b	>3,9
LAB	2,2 ^a ±1,0	<1,0 ^b	>1,2	<1,0 ^b	>1,2	<1,0 ^b	>1,2	<1,0 ^b	>1,2
Levaduras	4,9 ^a ±0,6	<2,0 ^b	>2,9	<2,0 ^b	>2,9	<2,0 ^b	>2,9	<2,0 ^b	>2,9
Mohos	2,2 ^a ±0,4	<2,0 ^a	>0,2	<2,0 ^a	>0,2	<2,0 ^a	>0,2	<2,0 ^a	>0,2
Esporos	1,6 ^a ±0,3	<1,0 ^b	>0,6	<1,0 ^b	>0,6	<1,0 ^b	>0,6	<1,0 ^b	>0,6

Tabla 5.1.1. *Recuentos (R) de los grupos microbianos investigados en *T. melanosporum* antes y después de la descontaminación con radiaciones ionizantes y **reducciones logarítmicas (RL) obtenidas con los distintos tratamientos. Para un mismo grupo microbiano las medias de los recuentos obtenidos seguidas de distintas letras señalan la existencia de diferencias significativas. Nivel de significación: $p < 0,05$.

La carga microbiana total inicial en las trufas no irradiadas (lote C) fue de 7,7 log.ufc/g, siendo mayoritaria la población del G^o *Pseudomonas* con 7,0 log.ufc/g; las

enterobacterias y levaduras quedan en un segundo plano con 4,9 log.ufc/g, mientras que se obtienen recuentos muy bajos de bacterias ácido lácticas (2,2 log.ufc/g) y mohos (2,2 log.ufc/g) y la presencia de aerobios mesófilos esporulados (1,6 log.ufc/g) ha sido casi testimonial (Tabla 5.1.1).

Tras la aplicación de las radiaciones beta a una dosis de 1,5 kGy, los recuentos totales han descendido a 3,3 log.ufc/g, mientras que el G° *Pseudomonas* (<2,0 lo.ufc/g), enterobacterias, microbiota láctica, aerobios mesófilos esporulados (<1,0 log.ufc/g) y microbiota fúngica (<2,0 log.ufc/g) se han situado por debajo del límite de detección. La dosis de 1,5 kGy aplicada con rayos gamma ha tenido un mayor efecto antimicrobiano (6,4 reducciones logarítmicas) que su homólogo con electrones acelerados (4,3 reducciones logarítmicas) en la descontaminación de *T. melanosporum*. Con este tratamiento la carga microbiana total se ha reducido hasta 1,3 log.ufc/g y el resto de los grupos microbianos se sitúan por debajo del límite de detección (Tabla 5.1.1).

Como era de esperar, un mayor efecto antimicrobiano se ha obtenido con la dosis de irradiación superior (2,5 kGy), sin embargo en el caso de las radiaciones gamma no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos con ambas dosis (Tabla 5.1.). Los recuentos tras la aplicación del tratamiento de 2,5 kGy con rayos beta sitúan la carga microbiana total en 2,1 log.ufc/g, mientras que para el tratamiento homólogo con rayos gamma, los recuentos totales disminuyen hasta 1,1 log.ufc/g. Con ambos tratamientos también se obtienen recuentos por debajo del límite de detección para el resto de poblaciones microbianas analizadas.

Los datos obtenidos, con la excepción de los mohos, han revelado diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el control y todos los tratamientos aplicados. Respecto a la carga microbiana total se establecen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el tratamiento

1,5-B y aquellos que aplican rayos gamma. Sin embargo, para la dosis de 2,5 no se han detectado diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las fuentes de radiación empleadas.

Importantes reducciones logarítmicas se han conseguidas mediante la aplicación de radiaciones gamma, de 6,4 log.ufc/g con la dosis de 1,5 kGy y de 6,6 log.ufc/g con la de 2,5 kGy. Los tratamientos con electrones acelerados han tenido un efecto menor con reducciones de 4,3 log.ufc/g (1,5 kGy) y de 5,5 log.ufc/g (2,5 kGy). Así, en un primer análisis y desde una perspectiva microbiológica son más eficaces las radiaciones gamma que las beta en la descontaminación de trufas frescas.

Sin embargo, las reducciones de la carga microbiana total detectadas en nuestro experimental mediante la aplicación de radiaciones gamma difieren de las señaladas por otros investigadores en *T. aestivum* (Tabla 5.1.2). Respecto a las radiaciones beta no tenemos datos señalados previamente por otros investigadores.

Fuente	Especie	Reducción (log.ufc/g)						
		Dosis absorbida de radiación ionizante (kGy)						
		1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	5,0	10,0
Datos propios (2010) - β	<i>T. melanosporum</i>	-	4,3	-	5,5	-	-	-
Datos propios (2010) - γ	<i>T. melanosporum</i>	-	6,4	-	6,6	-	-	-
Adamo y col. (2004) - γ	<i>T. aestivum</i>	-	-	-	-	4,0	>5,0	>5,0
Nazzaro y col. (2006) - γ	<i>T. aestivum</i>	-	3,0	4,0	-	-	-	-
Reale y col. (2009) - γ	<i>T. aestivum</i>	<1,0	<1,0	<1,0	-	<1,0	1,0	2,0

Tabla 5.1.2. Reducciones logarítmicas en la carga microbiana total de trufas sometidas a radiaciones ionizantes según distintas fuentes bibliográficas.

Así, Adamo y col. (2004) que emplean dosis mayores de radiación, encuentran una reducción de 4,0 log.ufc/g para tratamientos con 3 kGy, y superiores a 5,0 log.ufc/g para 5 y 10 kGy. Nazzaro y col (2006) con una dosis de 1,5 kGy consiguen una disminución de 3,0 log.ufc/g y de 4,0 log.ufc/g para 2 kGy. Por último, Reale y col. (2009), prácticamente no detectan reducciones en la carga microbiana total cuando aplican dosis de entre 1 y 5 kGy, y la mayor reducción en la flora total (2,0 log.ufc/g) la consiguen con una dosis de 10 kGy.

Las discrepancias encontradas en los resultados obtenidos pueden estar determinadas por la propia variabilidad intraespecífica pero quizás, el aspecto más importante a tener en cuenta sea una inadecuada selección de la materia prima. La presencia interna de larvas de insectos, junto a la potente diseminación de microorganismos, puede modificar ostensiblemente los resultados.

Respecto a la eficacia de las radiaciones beta en otras setas cultivadas (*Agaricus bisporus*), diversos autores han señalado también importantes reducciones logarítmicas. Así, Koorapati y col. (2004) encuentra reducciones de 4,3 log.ufc/g cuando aplican rayos beta a una dosis de 0,5 kGy y >6,0 log.ufc/g cuando aumentan la dosis a 1,0. Beaulieu y col. (1992) y Gauthaman y col. (1998) obtienen reducciones entre 5-9 log.ufc/g con rayos gamma (2,0 kGy). En cuanto a las radiaciones gamma, Jiang et al. (2010) señalan reducciones >3,3 log.ufc/g cuando tratan *Lentinula edodes* con rayos gamma a 1, 1,5 y 2 kGy.

El principal grupo microbiano asociado a las trufas, el G^o *Pseudomonas*, es prácticamente eliminado con cualquiera de los tratamientos ensayados, con reducciones >5,0 log.ufc/g. Tras la irradiación de *Lentinula edodes* con rayos gamma a las dosis de 1, 1,5 y 2 kGy, Jiang y col. (2010) coinciden con nuestros resultados (>5,2 log.ufc/g).

El G^o *Pseudomonas* no solo es el principal constituyente microbiano de las trufas, sino de los hongos frescos en general, convirtiéndose en uno de los principales alterantes de estos alimentos. Es por tanto fundamental reducir esta población de manera que se pueda alargar la vida útil de estos hongos. Las especies pertenecientes al G^o *Pseudomonas* son frecuentemente responsables del deterioro post-cosecha de las setas frescas (Varoquaux y col, 1999; Eastwood y Burton, 2002; Masson y col., 2002; Koorapati y col., 2004; Jiang y col., 2010) puesto que poseen múltiples enzimas, son capaces de proliferar a temperaturas de refrigeración y de sobrevivir en condiciones disgenésicas (Moore y col., 2006).

En el caso de las enterobacterias hemos detectado reducciones cercanas a 4 log.ufc/g en todos los tratamientos aplicados. Las reducciones detectadas en nuestro experimental en la F^a *Enterobacteriaceae*, son también distintas de las encontradas para *T. aestivum* por Nazzaro y col. (2007), quienes hacen referencia a una disminución de tan sólo 1,0-1,5 log.ufc/g en trufas irradiadas con 1,5 y 2,0 kGy respectivamente. Sin embargo, Reale y col. (2009) manifiestan que las enterobacterias prácticamente desaparecen tras la irradiación de las trufas, con todas las dosis ensayadas.

Las menores reducciones se han observado en las bacterias ácido lácticas (>1,2 log.ufc/g), los mohos (>0,2 log.ufc/g) y los esporos aerobios (0,2->0,6 log.ufc/g), puesto que independientemente de que sean más radioresistentes, estos grupos microbianos se encuentran en *T. melanosporum* en un número muy reducido. En el caso de las levaduras, se han encontrado reducciones >2,9 log.ufc/g para todos los tratamientos ensayados. Se ha determinado que la población de levaduras asociada a *T. melanosporum* es más importante y estable que la de *T. aestivum* (Rivera y col., 2010a).

5.2. Efectos de las radiaciones ionizantes sobre la actividad respiratoria

En la tabla 5.2.1 se observan los valores iniciales de la actividad respiratoria de las trufas antes de ser sometidas al tratamiento con radiaciones ionizantes y tras los distintos tratamientos.

La actividad respiratoria inicial de *T. melanosporum* en base al consumo de O₂ es elevada, con un valor de 38,5 mL kg⁻¹ h⁻¹, mientras que la producción de CO₂ obtiene valores más bajos, de 23,1 mL kg⁻¹ h⁻¹. Estos valores son inferiores a los señalados por Rivera y col. (2010b) quienes detectan una actividad respiratoria de 45 mL O₂ kg⁻¹ h⁻¹ y de 61 mL CO₂ kg⁻¹ h⁻¹. No obstante, González y col. (2009) obtienen valores más bajos para *T. melanosporum* a 4 °C, de 25 mL O₂ kg⁻¹ h⁻¹ y de 30 mL CO₂ kg⁻¹ h⁻¹. Se ha señalado que estas diferencias

detectadas en la actividad respiratoria de las trufas se deben al grado de madurez de las mismas, reduciéndose la actividad respiratoria con el avance del grado de madurez (Rivera y col., 2010b). Harki y col. (2006) establecieron 6 diferentes grados de madurez para *T. melanosporum* siendo los últimos tres (IV, V y VI) los de interés comercial. El grado V (maduras) abarca las trufas cosechadas cuando comienza la temporada (noviembre) y las de grado VI (completamente maduras) las cosechadas desde enero hasta marzo. Las trufas utilizadas en este experimental se clasifican con un grado de madurez VI, puesto que han sido recolectadas durante el mes de febrero, mientras que las utilizadas por Rivera y col. (2009b) fueron recolectadas durante el mes de diciembre, con un grado de madurez entre V y VI, y razón por la cual las trufas empleadas en este experimental han mostrado una actividad fisiológica más reducida.

Tratamiento	RO ₂ mL kg ⁻¹ h ⁻¹	RCO ₂ mL kg ⁻¹ h ⁻¹	RQ
Control	38,5	23,1	0,60
1,5-B	27,9	26,5	0,96
1,5-G	32,2	27,4	0,85
2,5-B	33,4	34,1	1,01
2,5-G	31,2	34,2	1,10

Tabla 5.2.2. Valores iniciales de la actividad respiratoria en aire medida en base al consumo de O₂ (RO₂) y de la producción de CO₂ (RCO₂) y el coeficiente de respiración (RQ) para *T. melanosporum* sin irradiar y tras los distintos tratamientos de irradiación a 4 °C.

El efecto de las radiaciones ionizantes sobre la actividad respiratoria de los productos frescos no está del todo aclarado pero, aunque la dosis aplicada sea baja, siempre van a suponer una agresión para la fisiología y el metabolismo de alimentos “vivos” como frutas, verduras y hongos. El efecto de los tratamientos ionizantes ha sido estudiado en otras setas. Así Benoît y col. (2000) en *A. bisporus* y Jiang y col. (2009) en *L. edodes* determinan que la velocidad de respiración disminuye con el aumento en las dosis de irradiación.

Nuestros resultados confirman una disminución de la actividad respiratoria de *T. melanosporum* medida como el consumo de O₂ para todos los tratamientos aplicados, y que en el caso de las radiaciones gamma se incrementa este efecto con el aumento de la dosis

aplicada. Tras la irradiación de otras setas también se ha señalado una merma en la actividad respiratoria, así Benoît y col. (2000) en *A. bisporus* y Jiang y col. (2009) en *L. edodes* establecen que la velocidad de respiración disminuye con el aumento en dosis de irradiación.

Para las trufas sometidas a radiaciones beta se observa una mayor disminución de RO_2 con la dosis de 1,5 kGy. Sin embargo, el efecto ionizante sobre la actividad respiratoria medida como consumo de CO_2 ha sido contrario, observándose un aumento en todos los tratamientos, y que se incrementa con la dosis aplicada. Como consecuencia observamos un aumento en el coeficiente respiratorio (RQ) de las trufas irradiadas, que supera el 1,0 cuando se someten a una dosis de 2,5.

Los valores de RQ detectados en la mayoría de los alimentos vivos varían entre 0,7 y 1,3 (Fonseca y col. 2000; Kader y Saltveit, 2003), aunque normalmente se encuentran en torno a 1, puesto que este valor depende del sustrato nutritivo utilizado durante la respiración. En el caso de *T. melanosporum*, Rivera (2009) detecta valores de 1,36 a 4 °C, que van disminuyendo con el tiempo. La actividad respiratoria así como el RQ tendrán una influencia directa sobre la composición atmosférica dentro de los envases de conservación de las trufas.

5.3. Efecto de las radiaciones ionizantes sobre la composición atmosférica de los envases

La evolución atmosférica en el interior de las barquetas conteniendo los carpóforos de *T. melanosporum* a lo largo de la conservación se presenta en la figura 5.3.1.

Tras 2 días de conservación se han establecido las atmósferas de equilibrio con 8% CO_2 :11% O_2 en las barquetas del lote no descontaminado (C), 7% CO_2 :14% O_2 en el lote tratado con radiaciones beta a 1,5 kGy (1,5-B), 9% CO_2 :12% O_2 en el lote irradiado con radiaciones gamma a 1,5 kGy (1,5-G), 8% CO_2 :13% O_2 en el lote irradiado con rayos beta a 2,5 kGy (2,5-B) y para su homólogo con gamma (2,5-G) 11% CO_2 :12% O_2 . En los envases de trufas no irradiados (C) se produce una mayor acumulación de CO_2 y reducción de O_2 , y se

observan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los lotes tratados con rayos beta y el resto de los lotes.

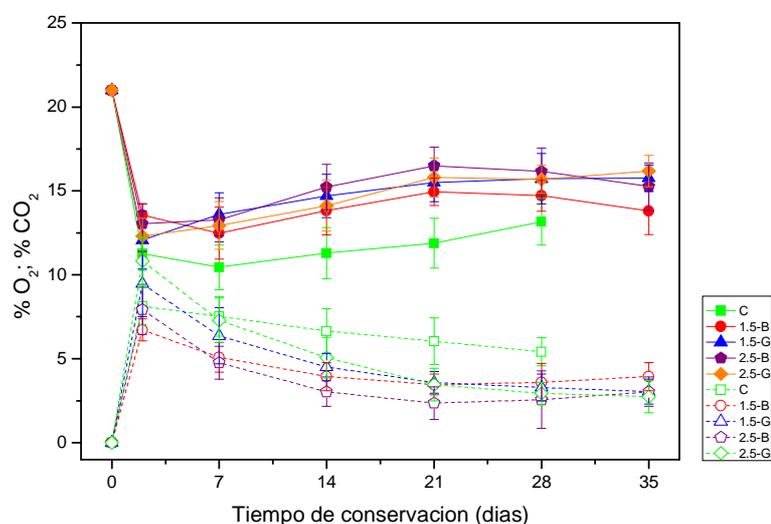


Figura 5.3.1. Evolución de la composición atmosférica, % O₂ (línea continua) y % CO₂ (línea discontinua), en envases que contienen *T. melanosporum* conservadas a 4 °C. C=Control; 1,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 1,5 kGy; 1,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 1,5 kGy; 2,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 2,5 kGy; 2,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 2,5 kGy.

La menor acumulación de CO₂ y mayor de O₂ dentro de las barquetas con trufas ionizadas, se debe al cambio sufrido en la actividad respiratoria de los carpóforos sometidos al tratamiento. Este mismo comportamiento ha sido señalado por Rivera (2009) para trufa de verano, tratadas con rayos beta, donde las atmósferas siempre se han mantenido con una cantidad menor de CO₂ y mayor de O₂. Este fenómeno ha sido observado previamente en otros productos frescos ionizados. De esta manera, Prakash y col. (2000) observan una presencia más reducida de CO₂ en bolsas de lechuga romana sometidas a 0,15 y 0,35 kGy cuanto mayor es la dosis de irradiación, lo que implica un descenso de la actividad respiratoria en las muestras tratadas. Asimismo, Gunes y col. (2001) detectan una disminución en la actividad respiratoria de zanahorias ralladas irradiadas con 2,0 kGy. Por el contrario, tanto Hagenmaier y Baker (1997) como Han y col. (2004) observan sorprendentemente que la actividad metabólica de lechugas irradiadas sufre un aumento

significativo; sin embargo, estos últimos investigadores un descenso en la respiración de las lechugas con radiaciones superiores (3,2 kGy).

5.4. Pérdida de peso

La merma en peso de las trufas negras utilizadas en esta investigación se detalla en la figura 5.4.1.

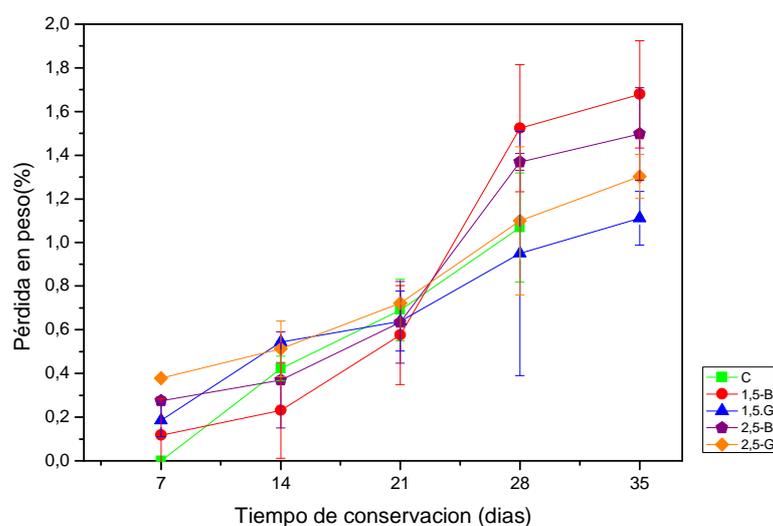


Figura 5.4.1. Merma en peso (%) de *T. melanosporum* conservada a 4 °C en atmósferas modificadas. C=Control; 1,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 1,5 kGy; 1,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 1,5 kGy; 2,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 2,5 kGy; 2,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 2,5 kGy.

Se observa una discreta pérdida de peso, siempre menor a un 2%, en las trufas conservadas en atmósferas modificadas. También Rivera y col. (2010b) señalan como uno de los efectos positivos del uso de atmósferas modificadas en la conservación de *T. aestivum* y *T. melanosporum*, la reducción en la pérdida de peso que tras 14 días de conservación no supera el 5%.

5.5. Evolución de los grupos microbianos a través de la conservación

La evolución de los microorganismos aero-anaerobios mesófilos totales a través de la conservación se observa en la figura 5.5.1.

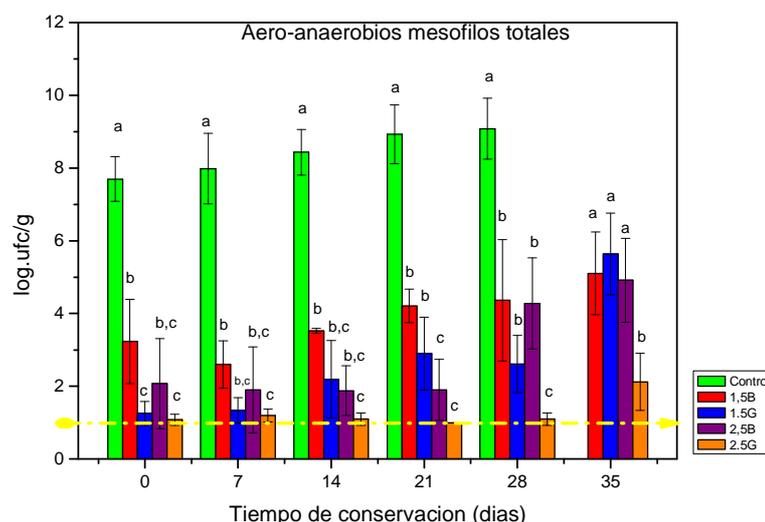


Figura 5.5.1. Recuentos de microorganismos aero-anaerobios facultativos mesófilos totales en *T. melanosporum* conservadas a 4 °C en atmósferas modificadas. C=Control; 1,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 1,5 kGy; 1,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 1,5 kGy; 2,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 2,5 kGy; 2,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 2,5 kGy.

En las trufas no irradiadas la carga microbiana total se incrementa progresiva y ligeramente, alcanzando 9,1 log.ufc/g al final de su conservación. Por lo que respecta a las trufas ionizadas son las tratadas con rayos beta, las que presentan una mayor carga microbiana tras 28 días de conservación (~4,0 log.ufc/g). Los lotes ionizados con rayos gamma cuentan con una menor presencia microbiana, si bien al finalizar la conservación los mayores recuentos totales se detectan en el lote 1,5-G con 5,6 log.ufc/g. La menor carga microbiana total a través de toda la conservación se obtiene en las trufas tratadas con rayos gamma a 2,5 kGy (2,5-G), con recuentos cercanos al límite de detección. El análisis estadístico establece diferencias significativas ($p < 0,05$) entre este lote y los lotes control y 1,5-B durante toda la conservación. A partir del día 28 el lote 2,5-G difiere significativamente de los demás lotes de trufas irradiadas.

La evolución del G° *Pseudomonas* a través de la conservación se recoge en la figura 5.5.2. En las trufas no irradiadas (C) observamos una evolución prácticamente idéntica a la de los microorganismos aero-anaerobios mesófilos totales, lo que es lógico, puesto que las pseudomonas constituyen el grupo mayoritario de la microbiota asociada a *T. melanosporum*. El incremento en el tiempo de estas bacterias Gram negativas ha sido de 2,6 log.ufc/g.

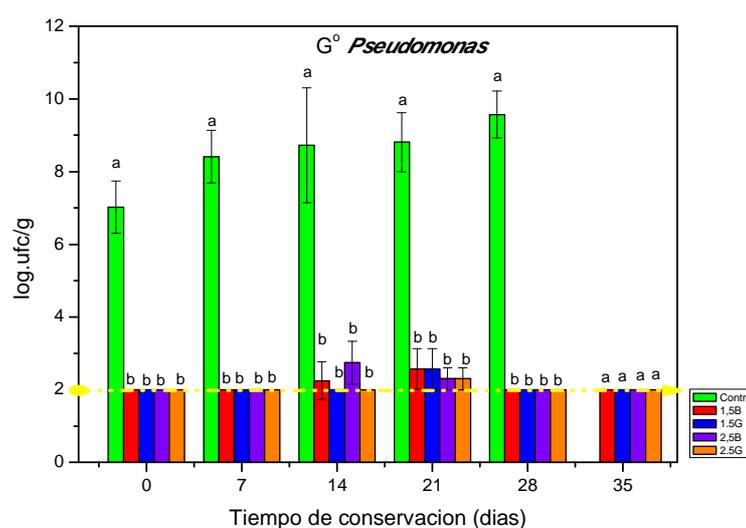


Figura 5.5.2. Recuentos del G° *Pseudomonas* en *T. melanosporum* conservada a 4 °C en atmósferas modificadas. C=Control; 1,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 1,5 kGy; 1,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 1,5 kGy; 2,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 2,5 kGy; 2,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 2,5 kGy.

Por el contrario, en los lotes irradiados, la evolución de las pseudomonas difiere notablemente de la carga total ya que se mantienen en torno o por debajo del límite de detección (<2,0 log.ufc/g) durante toda la conservación y en todos los lotes. Este hecho nos indica que las radiaciones ionizantes son capaces de inactivar casi en su totalidad las pseudomonas, que obviamente dejan de ser la población mayoritaria. Son por tanto un grupo microbiano altamente radiosensible.

El análisis estadístico revela diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el lote control y los irradiados a través de toda la conservación; sin embargo, no se encuentran diferencias entre los lotes ionizados.

La figura 5.5.3 nos muestra la evolución de la F^a *Enterobacteriaceae* en trufas negras conservadas en atmósferas modificadas a 4 °C. En el lote no irradiado, la evolución de las enterobacterias ha sido similar a la de la carga total y a las pseudomonas, con recuentos a los 28 días de 7,8 log.ufc/g, lo que supone un incremento de ~3 log.ufc/g durante su conservación. Por el contrario, en los lotes irradiados, las enterobacterias se han mantenido por debajo del límite de detección (<1,0 log.ufc/g) durante toda la conservación, con alguna excepción escasamente notoria el día 14.

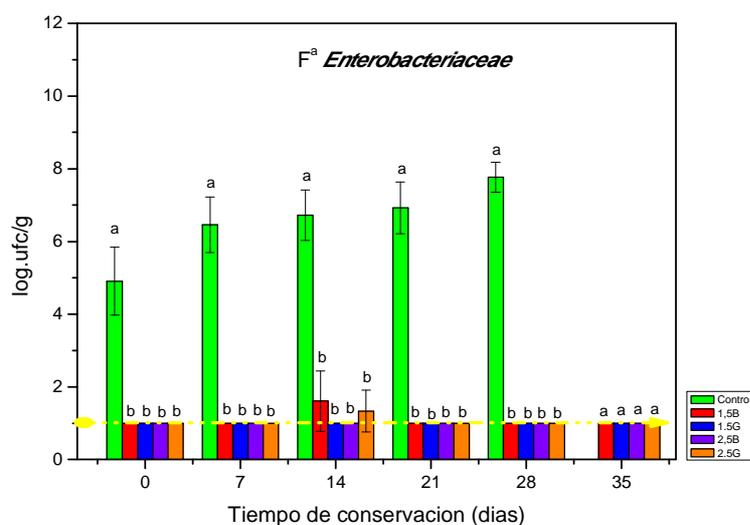


Figura 5.5.3. Recuentos de la F^a *Enterobacteriaceae* en *T. melanosporum* conservada a 4 °C en atmósferas modificadas. C=Control; 1,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 1,5 kGy; 1,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 1,5 kGy; 2,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 2,5 kGy; 2,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 2,5 kGy.

El análisis estadístico señala la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las trufas no irradiadas y aquellas tratadas con radiaciones ionizantes. Al igual que sucede con el G^o *Pseudomonas*, no se detectan diferencias significativas entre los lotes de trufas

irradiadas a lo largo de la conservación. También y como hemos indicado con el G° *Pseudomonas*, las enterobacterias han demostrado ser muy sensibles a las radiaciones ionizantes sean de tipo beta o gamma.

La figura 5.5.4 nos muestra la evolución de la microbiota láctica en el tiempo. En las trufas control se observa un ligero incremento durante las 3 primeras semanas, y una disminución al final de la conservación, con unos recuentos de tan solo 2,7 log.ufc/g. En los lotes irradiados observamos la misma tendencia de pseudomonas y enterobacterias, manteniéndose los recuentos por debajo del límite de detección durante la mayor parte de la conservación. El análisis estadístico señala la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las trufas no irradiadas durante las primeras tres semanas de la conservación; en el día 28 sin embargo, no se encuentran diferencias significativas entre las trufas no irradiadas (C) y las tratadas con 1,5 kGy (1,5-B y 1,5-G).

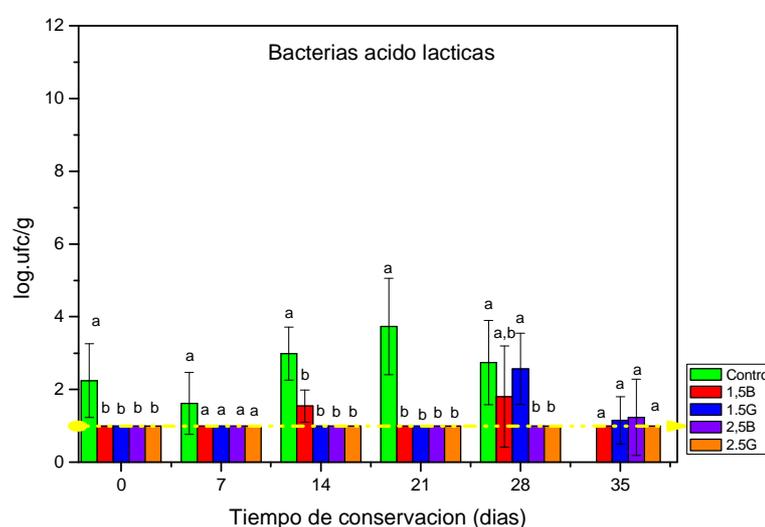


Figura 5.5.4. Recuentos de las bacterias ácido-lácticas en *T. melanosporum* conservada a 4 °C en atmósfera modificada. C=Control; 1,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 1,5 kGy; 1,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 1,5 kGy; 2,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 2,5 kGy; 2,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 2,5 kGy.

En cuanto a los micromicetos pluricelulares o mohos, hemos observado que los bajos recuentos iniciales, junto con los tratamientos ionizantes y el envasado en atmósfera modificada, determinan una muy escasa participación de este grupo microbiano, no detectándose en la mayoría de los casos. Por el contrario, la población de micromicetos unicelulares o levaduras se ha comportado de una manera bien distinta. En la figura 5.5.5 se observan los recuentos obtenidos a través de la conservación.

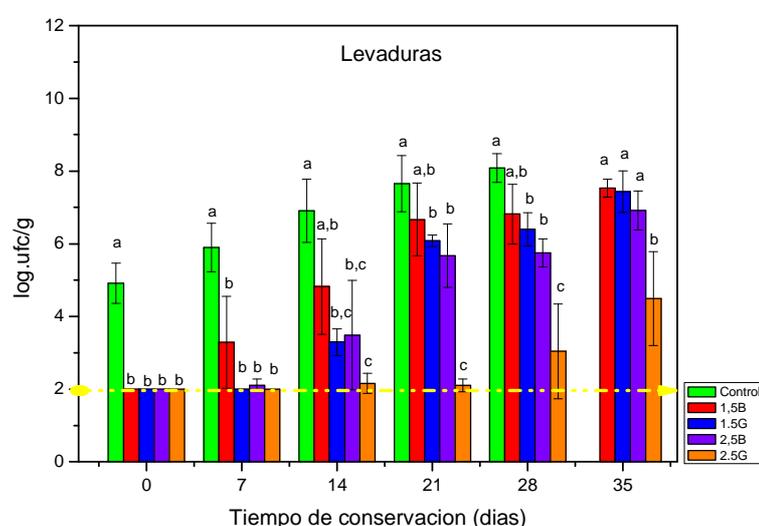


Figura 5.5.5. Recuentos de levaduras en *T. melanosporum* conservadas a 4 °C en atmósfera modificada. C=Control; 1,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 1,5 kGy; 1,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 1,5 kGy; 2,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 2,5 kGy; 2,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 2,5 kGy.

Las trufas no irradiadas (C) han experimentado un aumento en la población de levaduras a lo largo de toda la conservación, alcanzando las 8,1 log. ufc/g, con un incremento total de 3,1 log. ufc/g. De los tres principales grupos microbianos presentes en las trufas, *G*^o *Pseudomonas*, *F*^a *Enterobacteriaceae* y levaduras, son estas últimas las que sufren un mayor incremento y las que parece ser aguantan mejor las atmósferas modificadas. Respecto a los lotes irradiados, las levaduras también aumentan a lo largo de la conservación, siendo los incrementos más manifiestos en los lotes irradiados con 1,5 kGy. A partir de la tercera semana las trufas irradiadas del lote 2,5-B aumentan, sin que se detecten diferencias

significativas entre este lote y los de trufas irradiadas con 1,5 kGy (1,5-B y 1,5-G). La población de levaduras en el lote 2,5-G se ha mantenido con recuentos próximos al límite de detección durante las 3 primeras semanas, pero hacia el final de la conservación se observa un aumento considerable.

En las trufas irradiadas, a partir de la segunda semana, y a diferencia de los otros grupos microbianos investigados, las levaduras comienzan a multiplicarse, pasando a ser estos eucariotas los únicos microorganismos presentes en las trufas ionizadas. Este aspecto nos indica que las levaduras son más radioresistentes y que la ionización en estos microorganismos puede ocasionar daños subletales susceptibles de ser reparados en el tiempo. Al final de la conservación las levaduras superan las 7,0 log.ufc/g para los tratamientos 1,5-E, 1,5-G y 2,5-E y las 5,0 log.ufc/g en las trufas del lote 2,5-G. Este notable aumento se debe obviamente a la mayor radioresistencia, a la reparación de los daños subletales, a su mayor competitividad bajo atmósferas modificadas y a la ausencia de competencia microbiana. En estudios previos, Reale y col. (2009) señalan que en trufas de verano, irradiadas con dosis bajas (1,5-3,0 kGy) de rayos gamma y conservadas en atmósferas inertes (100% N₂), la población de levaduras prácticamente se mantiene estable durante 40 días de conservación (en torno a 4,0 log.ufc/g).

La evolución de la población de los microorganismos aerobios mesófilos esporulados a través de la conservación se muestra en la figura 5.5.6.

La población de microorganismos aerobios mesófilos esporulados en *T. melanosporum* es muy reducida, a pesar de ser un alimento de origen telúrico; solo en el lote control se detecta un aumento de los recuentos a través de la conservación hasta alcanzar 3,4 log.ufc/g. En las trufas irradiadas los recuentos no superan las 1,5 log.ufc/g.

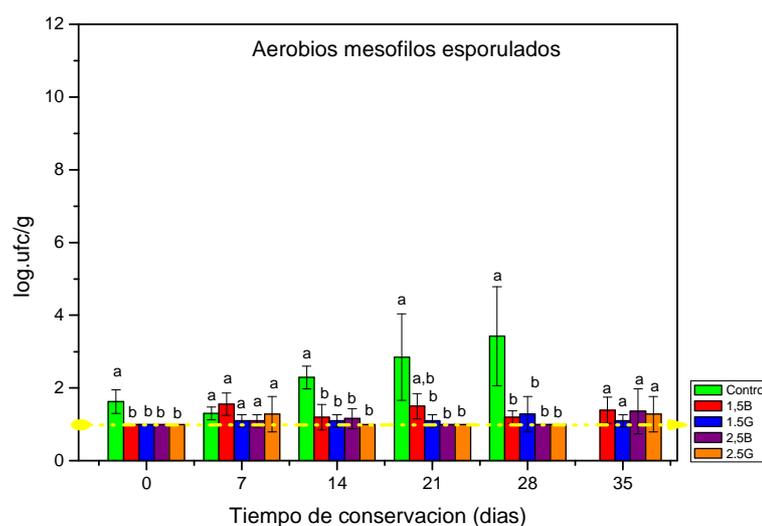


Figura 5.5.6. Recuentos de aerobios mesófilos esporulados en *T. melanosporum* conservadas a 4 °C en atmósferas modificadas. C=Control; 1,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 1,5 kGy; 1,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 1,5 kGy; 2,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 2,5 kGy; 2,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 2,5 kGy.

5.6. Efecto de las radiaciones ionizantes y la conservación en atmósferas modificadas sobre la calidad sensorial de *T. melanosporum*

La calidad sensorial de las trufas a través de la conservación ha sido evaluada mediante el empleo de un panel de catadores adiestrados, utilizando la escala hedónica, donde 9=excelente; 7=muy buena; 5=buena; 3=regular y 1=mala. En la tabla 5.6.1 se muestran los resultados obtenidos para la analítica sensorial externa de los carpóforos.

Tras los distintos tratamientos ionizantes se observa una disminución en la textura de las trufas, detectándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los lotes irradiados y el control. Este ligero ablandamiento de las trufas irradiadas deja de ser manifiesto tras la tercera semana donde la textura de las trufas tratadas supera o iguala a la de las trufas control. A partir de este momento la textura en todas las trufas disminuye en una unidad por semana, siendo siempre las trufas irradiadas con radiaciones beta y en concreto las de la dosis de 1,5 kGy las que obtienen una mejor puntuación. Esta pérdida de textura parece deberse a un exudado acuoso que se genera en algunas trufas irradiadas, y que es más evidente en las

tratadas con rayos gamma. De esta manera, las trufas tratadas con rayos gamma obtienen los valores más bajos de textura al final de la conservación, de 5,1 y 4,4, para las dosis de 1,5 kGy y 2,5 kGy, respectivamente.

Tiempo (días)	Tratamiento	Textura	Aroma	Flavor	Color Interno	Aceptabilidad General	Crecimiento micelio	Crecimiento levaduras
Inicial	C	9,0 ^a	9,0 ^a	9,0 ^a	9,0 ^a	9,0 ^a	0 ^a	0 ^a
	1,5-B	8,6 ^b	8,8 ^{a,b}	8,7 ^b	8,8 ^{a,b}	8,7 ^b	0 ^a	0 ^a
	1,5-G	8,6 ^b	8,7 ^b	8,6 ^b	8,7 ^{a,b}	8,7 ^b	0 ^a	0 ^a
	2,5-B	8,4 ^b	8,6 ^b	8,7 ^b	8,6 ^b	8,6 ^b	0 ^a	0 ^a
	2,5-G	8,4 ^b	8,6 ^b	8,8 ^{a,b}	8,5 ^b	8,6 ^b	0 ^a	0 ^a
7	C	8,5 ^a	8,0 ^{a,b}	8,2 ^a	8,4 ^a	8,3 ^a	0 ^a	0 ^a
	1,5-B	8,1 ^{a,b}	8,2 ^{a,b}	8,7 ^b	8,0 ^b	8,3 ^a	0 ^a	0 ^a
	1,5-G	8,3 ^{a,b}	8,3 ^b	8,6 ^b	8,1 ^{a,b}	8,3 ^a	0 ^a	0 ^a
	2,5-B	8,0 ^b	7,9 ^a	7,8 ^c	8,0 ^b	7,9 ^a	0 ^a	0 ^a
	2,5-G	8,4 ^a	7,8 ^a	7,9 ^{a,c}	8,2 ^{a,b}	8,0 ^a	0 ^a	0 ^a
14	C	8,0 ^a	7,2 ^a	6,9 ^a	7,8 ^a	7,5 ^a	0,2 ^a	0
	1,5-B	7,6 ^{b,c}	7,3 ^{a,c}	7,0 ^a	7,9 ^a	7,4 ^a	0 ^b	0
	1,5-G	7,8 ^{a,c}	7,7 ^b	8,1 ^b	8,1 ^a	7,9 ^b	0 ^b	0
	2,5-B	7,7 ^{b,c}	7,5 ^{b,c}	8,0 ^{b,c}	8,0 ^a	7,8 ^{b,c}	0 ^b	0
	2,5-G	7,5 ^b	7,3 ^{a,c}	7,7 ^c	8,0 ^a	7,6 ^{a,c}	0 ^b	0
21	C	7,0 ^a	6,7 ^a	6,4 ^a	5,8 ^a	6,7 ^a	0,5 ^a	0 ^a
	1,5-B	7,2 ^{a,b}	6,9 ^a	6,5 ^{a,c}	7,6 ^b	7,1 ^b	0 ^b	0,6 ^b
	1,5-G	7,4 ^b	6,8 ^a	6,7 ^{a,b,c}	7,9 ^b	7,2 ^b	0 ^b	0,6 ^b
	2,5-B	7,0 ^a	6,8 ^a	6,9 ^{b,c}	7,7 ^b	7,1 ^b	0 ^b	0,8 ^c
	2,5-G	6,9 ^a	6,8 ^a	6,8 ^c	7,8 ^b	7,1 ^b	0 ^b	0,4 ^d
28	C	6,1 ^{a,c}	4,8 ^a	4,8 ^a	5,1 ^a	5,2 ^a	1,2 ^a	0 ^a
	1,5-B	6,4 ^{a,b}	6,2 ^{b,c}	6,0 ^b	7,0 ^b	6,4 ^b	0 ^b	1,0 ^b
	1,5-G	6,5 ^b	6,3 ^b	6,9 ^c	7,2 ^b	6,6 ^b	0 ^b	1,2 ^b
	2,5-B	6,1 ^{a,c}	6,0 ^{b,c}	6,7 ^c	6,9 ^b	6,4 ^b	0 ^b	1,1 ^b
	2,5-G	6,0 ^c	5,9 ^c	5,7 ^b	6,5 ^c	6,0 ^c	0 ^b	1,0 ^b
35	C	-	-	-	-	-	-	-
	1,5-B	5,8 ^a	5,6 ^a	5,2 ^{a,b}	6,1 ^a	5,6 ^a	0 ^a	1,8 ^a
	1,5-G	5,0 ^{b,c}	5,1 ^b	5,0 ^a	6,1 ^a	5,2 ^a	0 ^a	2,0 ^a
	2,5-B	5,1 ^{a,c}	4,7 ^c	4,4 ^b	4,4 ^b	4,4 ^b	0 ^a	2,1 ^a
	2,5-G	4,4 ^b	4,8 ^{b,c}	4,3 ^{a,b}	4,2 ^b	4,2 ^b	0 ^a	2,4 ^a

Tabla 5.6.1. Evaluación sensorial de *T. melanosporum*, conservadas en atmósferas modificadas a 4° C. C=Control; 1,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 1,5 kGy; 1,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 1,5 kGy; 2,5-B=trufas irradiadas con rayos beta a una dosis de 2,5 kGy; 2,5-G=trufas irradiadas con rayos gamma a una dosis de 2,5 kGy.

El aroma de las trufas al inicio de la conservación ha sido mejor en el lote control (9), mientras que en los lotes irradiados este parámetro disminuye hasta 8,6, dando lugar a la existencia de diferencias significativas, a excepción del lote 1,5-B. Sin embargo, tras 28 días de conservación las trufas sin irradiar obtienen una puntuación de 4,8, hecho que se relaciona con la senescencia y con el desarrollo de micelio superficial. En cuanto al aroma de las trufas

tratadas con radiaciones beta (1,5-B y 2,5-B) y en el lote 1,5-G, se observan puntuaciones superiores a 6,0 tras un mes de conservación. Las trufas irradiadas con la dosis de 1,5 kGy culminan la conservación con mejores valores que las sometidas a 2,5 kGy, obteniendo puntuaciones de 5,6 y 5,1 en 1,5-B y 1,5-G respectivamente, y dando lugar a diferencias significativas ($p < 0,05$) entre estos lotes y los tratados con 2,5 kGy (2,5-B y 2,5-G). El aroma de las trufas irradiadas se ve afectado por la propia senescencia y el desarrollo de levaduras en su superficie.

El flavor es un parámetro muy cercano al aroma, por lo que es de esperar que ambos parámetros tengan una evolución similar. Al igual que ha sucedido con los demás parámetros sensoriales analizados, el flavor de las trufas sometidas a los distintos tratamientos ionizantes disminuye levemente tras la aplicación de los tratamientos, dando lugar a la aparición de diferencias significativas entre las trufas no irradiadas y las tratadas con la dosis de 2,5 kGy (2,5-B y 2,5-G). En las trufas no irradiadas observamos un descenso importante de este parámetro a partir de la segunda semana de conservación, que culmina con una puntuación de 4,8 tras 4 semanas. Como hemos discutido anteriormente para el aroma, la aparición de mohos superficiales en las trufas no irradiadas y la propia senescencia de la misma, tiene como consecuencia daños organolépticos en el flavor.

El color interno de los carpóforos trufas sin irradiar disminuye hasta 5,8 tras casi un mes de conservación. En cuanto al color de las trufas ionizadas observamos poca variación, obteniendo en el día 28 valores superiores a 7,0 para las trufas tratadas con 1,5 kGy (1,5-B y 1,5-G), de 6,9 para el lote 2,5-B y de 6,5 para el 2,5-G. Estos valores disminuyen en aproximadamente en una unidad en la última semana de conservación, siendo siempre superiores en las trufas tratadas con 1,5 kGy.

La aceptabilidad general recoge la valoración global de las trufas a lo largo de su conservación. Así pues, las muestras no irradiadas tras 4 semanas de conservación reciben una puntuación de 5,2. Al cabo de 35 días, la mejor aceptabilidad general la obtienen los carpóforos irradiados con 1,5-B (5,6), seguidos de los que recibieron el tratamiento homólogo con rayos gamma (5,2). La aceptabilidad general en las trufas tratadas con la dosis de 2,5 kGy obtiene valores más bajos, con 4,4 y 4,2, para las trufas tratadas con beta y gamma, respectivamente.

No se ha detectado crecimiento de micelio superficial en ninguno de los carpóforos irradiados; sin embargo a partir de la segunda semana de conservación se observa desarrollo de micelio en algunas de las trufas no tratadas. El desarrollo de mohos superficiales en las trufas no irradiadas altera el aroma y el flavor de las mismas, haciendo que su vida útil finalice a los 28 días. Por otra parte, en las trufas irradiadas se comienza a detectar el desarrollo de levaduras sobre el peridio a partir de las 3 semanas de conservación. Este crecimiento se debe al aumento significativo que tiene este grupo de microorganismos en los lotes irradiados y que hemos señalado y discutido en la sección 4.6. El crecimiento de estos microorganismos, sin embargo, no afecta de manera tan drástica al aroma de los carpóforos, lo que permite prolongar la vida útil de las trufas irradiadas hasta el día 35, solo en aquellas tratadas con dosis de 1,5 kGy.

6. Conclusiones

La actividad respiratoria, medida como el consumo de O₂ (RO₂), de *T. melanosporum* disminuye con la aplicación de los tratamientos ionizantes ensayados. Cuando el tratamiento es aplicado mediante radiaciones gamma, se observa una mayor disminución de RO₂ con el aumento de la dosis aplicada. Cuando la actividad respiratoria es medida como producción de CO₂ (RCO₂), ocurre el efecto contrario, aumentando la actividad respiratoria de las trufas sometidas a irradiación, y como consecuencia el coeficiente respiratorio (RQ). Esta alteración en la actividad metabólica trae como consecuencia una menor presencia de CO₂ y mayor de O₂ en las barquetas conteniendo trufas ionizadas.

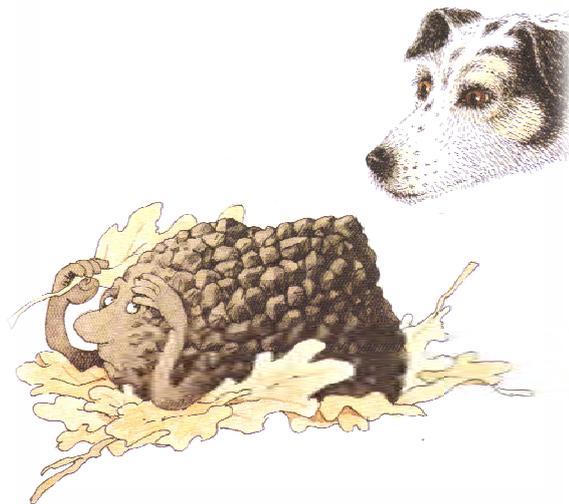
La aplicación de un procedimiento descontaminante integral, que abarca peridio y gleba de *T. melanosporum* y consistente en radiaciones ionizantes de tipo beta a dosis de 1,5 y 2,5 kGy reduce de manera muy significativa la carga microbiana total en 4,3 y 5,5 log.ufc/g, respectivamente. Cuando el tratamiento ionizante es aplicado mediante radiaciones gamma, se obtienen mayores reducciones (6,4 log.ufc/g para 1,5 kGy y 6,6 log.ufc/g para 2,5 kGy). Cualquiera de los tratamientos ionizantes aplicados, prácticamente elimina el G^o *Pseudomonas*, la F^a *Enterobacteriaceae*, las bacterias ácido-lácticas, la microbiota fúngica pluricelular y los microorganismos aerobios esporulados. Las levaduras además de ser radioresistentes, han mostrado ser capaces de reparar los daños subletales ocasionados por la ionización, pasando a ser en el tiempo el grupo microbiano predominante y casi único. Este aumento significativo en la población de levaduras posibilita la aparición de colonias en la superficie o peridio de los carpóforos, condicionando el aroma y el flavor de las trufas al final de su conservación.

La combinación de radiaciones ionizantes beta y gamma a una dosis de 2,5 kGy junto con la conservación en atmósferas modificadas a 4 °C, permite mantener la vida útil de las

trufas hasta 28 días, puesto que la calidad organoléptica se ve afectada por la pérdida de textura, aroma y flavor. Cuando las radiaciones se aplican a una dosis de 1,5 kGy, la vida útil de *T. melanosporum* se incrementa en un 25% (5 semanas), manteniéndose las características sensoriales con una aceptación general superior a 5.

Agradecimientos

Esta investigación se ha podido realizar gracias al proyecto del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) denominado “Desarrollo integral de la truficultura de Teruel”, bajo el subproyecto “Incremento de la vida comercial de la trufa negra: utilización de métodos combinados; aplicación de nuevas tecnologías para su conservación (PET-2007-13-C07-06).



7. Referencias

Adamo, M., Capitani, D., Mannina, L., Cristinzio, M., Ragni, P., Tata, A., Coppola, R., 2004. Truffles decontamination treatment by ionizing radiation. *Radiat. Phys. Chem.* 71, 165-168.

Arvanitoyannis I.S., Stratakos A., Tsarouhas P. (2009). Irradiation applications in vegetables and fruits: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49, 427-462.

Barbieri, E., Bertini, L., Rossi, I., Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Guidi, C., Zambonelli, A., Stocchi, V., 2005. New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. *FEMS Microbiol. Lett.* 247, 23-35.

Barbieri, E., Guidi, C., Bertaux J., Frey-Klett P., Garbaye J., Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Zambonelli, A., Stocchi, V., 2007. Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation. *Environ. Microbiol.* 9, 2234-2246.

Beaulieu, M., Lacroix, M., Charbonneau, R., Laberge, I., Gagnon, M., 1992. Effects of gamma irradiation dose rate on microbiological and physical quality of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Sci. Aliment.* 12, 289-303.

Bedini, S., Bagnoli, G., Sbrana, C., Leporini, C., Tola, E., Dunne, C., Filippi, C., D'Andrea, F., O'Gara, F., Nuti, M.P., 1999. *Pseudomonas* isolated from within fruit bodies of *Tuber borchii* are capable of producing biological control or phytoestimulatory compounds in pure culture. *Symbiosis* 26, 223-236.

Benoît, M.A., D'Aprano, G., Lacroix, M., 2000. Effect of γ -irradiation on phenylalanine ammonia-lyase activity, total phenolic content, and respiration of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J. Agric. Food Chem.* 48, 6312-6316.

[CAC] *Codex Alimentarius* Commission, 1984. Codex general standard for irradiated foods and recommended international code of practice for the operation of radiation facilities used for treatment of food. Vol. 15. 1st ed. Rome, Italy: CAC.

Callot G., Byé P., Raymond F., Fernandez D., Pargney J.C., Parguey-Leduc A., Janex-Favre M.C., Moussa R., Pagés L., (1999). Structure et développement de l' ascomarpe. En: Callot, G. (Ed.). *La Truffe, la Terre, la Vie*. Institut National Recherche Agronomique (INRA), Paris. pp.117-139.

Comunidad Europea, 2006. Lista de los alimentos o ingredientes alimentarios que los Estados miembros autorizan a tratar con radiación ionizante (2006/C 112/05). *Diario Oficial de la Unión Europea* (12.05.2006), C112 (05), 6-7.

Directiva 1999/3/EC de la Unión Europea de 22 de febrero de 1999, por la que se establece la lista de alimentos e ingredientes alimenticios a los que se puede tratar con radiaciones ionizantes en la Comunidad Europea. [Diario Oficial L 66, 13.3.1999].

Eastwood, D., Burton, K., 2002. Mushrooms - a matter of choice and spoiling one-self. *Microbiol. Today*, 29, 18-19.

Fратиanni, F., Di Luccia, A., Coppola, R., Nazzaro, F., 2007. Mutagenic and antimutagenic properties of aqueous and ethanolic extracts from fresh and irradiated *Tuber aestivum* black truffle: A preliminary study. *Food Chem.* 102, 471-474.

Gauthaman, S., Sharma, A., Thomas, P., 1998. Gamma irradiation effect on shelf-life, texture, polyphenol oxidase and microflora of mushroom (*Agaricus bisporus*). *J. Food Sci. Nutr.* 49, 5-10.

González-Buesa J., Ferrer-Mairal A., Oria R., Salvador M.L. (2009). A mathematical model for packaging with microperforated films of fresh-cut fruits and vegetables. *Journal of Food Engineering* 95, 158-165

Gunes, G., Hotchkiss, J.H., Watkins, C.B., 2001. Effects of gamma irradiation on the texture of minimally processed apple slices. *J. Food Sci.* 66, 63-67.

- Hagenmaier, R., Baker, R., 1997. Low-dose irradiation of cut iceberg lettuce in modified atmosphere packaging. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2864–2868.
- Han, J., Gomes-Feitosa, C.L., Castell-Perez, E., Moreira, R.G., Silva, P.F., 2004. Quality of packaged romaine lettuce hearts exposed to low-dose electron beam irradiation. *LWT Food Sci. Technol.* 37, 705–715.
- Harki E., Bouya D., Dargent R., (2006). Maturation-associated alterations of the biochemical characteristics of the black truffle *Tuber melanosporum* Vitt. *Food Chemistry* 99: 394-400.
- Jiang, T., Luo, S., Chen, Q., Shen, L., Ying, T., 2010. Effect of integrated application of gamma irradiation and modified atmosphere packaging on physicochemical and microbiological properties of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). *Food Chem.* 122, 761-767.
- Kader A.A., Saltveit M. (2003). Respiration and gas exchange. En: Bartz J.A., Brecht J.K. (Eds.), *Postharvest Physiology and Pathology of Vegetables*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 7-29.
- Koorapati, A., Foley, D., Pilling, R., Prakash, A., 2004. Electron-beam irradiation preserves the quality of white button mushroom (*Agaricus bisporus*) slices. *J. Food Sci.* 69, 25-29.
- Masson, Y., Ainsworth, P., Fuller, D., Bozkurt, H., İbanoğlu, Ş., 2002. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in homogenized mushrooms under modified atmosphere. *J. Food Eng.* 54, 125-131.
- Moore, E.R.B., Tindall, B.J., Martins Dos Santos, V.A.P., Pieper, D.H., Ramos, J.L., Palleroni, N.J., 2006. Nonmedical: pseudomonas. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosemberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (Eds.), *Prokaryotes*. Springer, New York, pp. 646-703.
- Moreno B., Gómez J., Pulido E. (2006). Tesoros de nuestros montes. Trufas de Andalucía. Fundación Gypaetus. Sevilla, España.
- Moreira, R.G., 2006. Food irradiation using electron-beam accelerators. In: *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*, vol. 3. Ed. Hui, Y.H., CRC Press. Boca Ratón, FL, pp. 124.1-124.10.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Picariello, G., Coppola, R., Reale, A., Luccia, A.D., 2007. Evaluation of gamma rays influence on some biochemical and microbiological aspects in black truffles. *Food Chem.* 103, 344-354.
- O'Connor, R.E., Mitchell, G.E. 1991. Effect of irradiation on microorganisms in strawberries. *Int. J. Food Microbiol.* 12, 247-256.
- Prakash, A., Guner, A.R., Caporaso, F., Foley, D.M., 2000. Effects of low-dose gamma irradiation on the shelf life and quality characteristics of cut romaine lettuce packaged under modified atmospheres. *J. Food Sci.* 65, 549-553.
- Real Decreto 348/2001 de 4 de abril de 2001, por el que se regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes.
- Reale, A., Sorrentino, E., Iacumin, L., Tremonte, P., Manzano, M., Maiuro, L., Comi, G., Coppola, R., Succi, M., 2009. Irradiation treatments to improve the shelf life of fresh black truffles (truffles preservation by gamma-rays). *J. Food Sci.* 74, 196-200.
- Reyes J.E., Rivera C.S., Rodríguez M., Oria R., Blanco D., (2006). Incidencia de microorganismos de interés higiosanitario en carpóforos (setas y trufas) frescos comestibles comercializados en Zaragoza. I Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria, 8-10 Mayo 2006. Sevilla, España.
- Reyna S. (2000). Trufa, truficultura y selvicultura trufera. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- Reyna S., De Miguel A., Palazón C., Hernández A., De Román M. (2004). Situación y perspectiva de la truficultura en España. *ITEA* 100, 1987-1999.

-
- Rivera, C.S., Blanco, D., Oria, R., Venturini, M.E., 2010a. Diversity of culturable microorganisms and occurrence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in *Tuber aestivum* and *Tuber melanosporum* ascocarps. *Food Microbiol.* 27, 286-293.
- Rivera, C.S., Blanco, D., Salvador, M.L., Venturini, M.E., 2010b. Shelf life extension of fresh *Tuber aestivum* and *Tuber melanosporum* truffles by modified atmosphere packaging with microperforated film. *J. Food Sci.*, 45, 4, 225-233.
- Rivera, C.S., Venturini, M.E., Blanco, D., 2008. Tolerance of fresh summer truffles (*T. aestivum*) to different levels of O₂ and CO₂. 3^o Spoleto International Convention of Truffle.
- Rivera, C.S., Blanco, D., Oria, R., Venturini, M.E., 2008. Decontamination and preservation of *Tuber aestivum*. *Acta Horticulturae*, 804, 277-282.
- Rivera Medina, C.S., 2009. Caracterización, descontaminación y conservación de *Tuber melanosporum* (trufa negra) y *Tuber aestivum* (trufa de verano). Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, España.
- Sbrana, C., Agnolucci, M., Bedini, S., Lepera, A., Toffanin, A., Giovannetti, M., Nuti, M.P., 2002. Diversity of culturable bacterial populations associated to *Tuber borchii* ectomycorrhizas and their activity on *T. borchii* mycelial growth. *FEMS Microbiol. Lett.* 211, 195-201.
- Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows 15.0 SPSS Inc, Chicago IL (2006).
- Thakur B.R., Singh R.K. (1995). Combination processes in food irradiation. *Trends in Food Science and Technology* 6, 7-11.
- Thayer D.W., Rajkowski K.T. (1999). Developments in irradiation of fresh fruits and vegetables. *Food Technology* 53, 62-65.
- Varoquaux, P., Gouble, B., Barron, C., Yildiz, F., 1999. Respiratory parameters and sugar catabolism of mushrooms (*Agaricus bisporus* Lange). *Postharvest Biol. Technol.* 16, 51-61.
- [WHO] World Health Organization, 1994. Safety and nutritional adequacy of irradiated food. Geneva, Switzerland: WHO.