



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



EFECTO DE *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI Y DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS SOBRE *LISTERIA* *MONOCYTOGENES* EN UNA BEBIDA MEZCLA DE ZUMOS Y LECHE



MÁSTER EN GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Maria Sanz Puig
Directora: M^a Dolores Rodrigo Aliaga
Codirector: Antonio Martínez López
Directora Experimental: Clara M. Belda Galbis
Centro: IATA-CSIC
Valencia, Julio 2012

EFFECTO DE *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI Y DE LAS ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS SOBRE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN UNA BEBIDA MEZCLA DE ZUMOS Y LECHE

Maria Sanz Puig, María Dolores Rodrigo Aliaga¹ (Director), Antonio Martínez López¹ (Codirector), Clara Miracle Belda Galbis¹ (Director experimental)

RESUMEN

Como alternativa al procesado térmico y al uso de aditivos químicos, la “tecnología de barreras” plantea la combinación de metodologías no térmicas con antimicrobianos naturales para obtener alimentos mínimamente procesados pero seguros. Por ello, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de *Stevia rebaudiana* Bertoni y de las altas presiones hidrostáticas sobre *Listeria monocytogenes* en una bebida mezcla de zumos y leche. Los resultados obtenidos demuestran que *S. rebaudiana* puede acelerar la inactivación de *L. monocytogenes* en la matriz desarrollada, sobre todo si ésta se conserva en refrigeración o si se somete a altas presiones hidrostáticas, dado el sinergismo detectado entre ambos métodos de conservación. En consecuencia, esta combinación podría llegar a emplearse para alargar la vida útil de bebidas refrigeradas listas para el consumo en las que, además, no debería añadirse azúcar porque *S. rebaudiana* es un edulcorante natural acalórico autorizado.

RESUM

Com alternativa al processat tèrmic i a l'ús d'additius químics, la “tecnologia de barreres” planteja la combinació de metodologies no tèrmiques amb antimicrobians naturals per obtindre aliments mínimament processats, però segurs. Per això, l'objectiu del present estudi fou avaluar l'efecte de *Stevia rebaudiana* Bertoni i de les altes pressions hidrostàtiques sobre *Listeria monocytogenes* en una beguda mescla de sucs i llet. Els resultats obtinguts demostren que *S. rebaudiana* pot accelerar la inactivació de *L. monocytogenes* en la matriu desenvolupada, sobretot si es conserva en refrigeració o si es sotmet a altes pressions hidrostàtiques donat el sinergisme detectat entre ambdós metodologies. En conseqüència, aquesta combinació podria arribar a utilitzar-se per a allargar la vida útil de begudes refrigerades llestes per al consum en les què, a més, no hauria d'afegir-se cap sucre perquè *S. rebaudiana* és un edulcorant natural acalòric autoritzat.

¹ Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC). Avda. Agustín Escardino 7, 46980, Paterna, Valencia.

ABSTRACT

As an alternative to thermal processing and chemical additives, the “hurdle technology” raises the use of non-thermal methodologies combined with natural antimicrobials in order to obtain minimally processed safe foods. For this, the aim of this study was to evaluate the effect of *Stevia rebaudiana* Bertoni and high hydrostatic pressures against *Listeria monocytogenes* in a fruit-juice and milk beverage. The obtained results show that *S. rebaudiana* can accelerate the inactivation of *L. monocytogenes* in the developed matrix, especially if it is kept under refrigeration or if it is subjected to high hydrostatic pressures due to the synergism that was detected between both preservative methods. Consequently, this combination could potentially be used to prolong the shelf life of ready-to-eat beverages in which no sugar have to be added in because *S. rebaudiana* is a non-caloric authorised natural sweetener.

Palabras clave: Tecnología de barreras, Sinergismo, *Stevia rebaudiana* Bertoni, Altas presiones hidrostáticas, *Listeria monocytogenes*, Cinéticas de inactivación.

INTRODUCCIÓN

Las toxiinfecciones alimentarias son un grave problema de salud pública y no sólo preocupan a países subdesarrollados o en vías de desarrollo. Según el Centro de Control y Prevención de Enfermedades, en Estados Unidos, cada año, 48 millones de personas sufren enfermedades asociadas al consumo de alimentos contaminados; de ellas, 128.000 son hospitalizadas y 3.000 mueren (CDC, 2011).

En consecuencia, pese a los avances logrados en materia de higiene y seguridad alimentaria, sigue siendo necesario el desarrollo de nuevas estrategias que permitan reducir y controlar la presencia de patógenos en alimentos, sin olvidar la importancia que tienen un buen sistema de vigilancia, la potenciación de buenas prácticas de higiene (*Good Hygienic Practices*; GHP) y la implementación de planes de análisis de peligros y puntos de control críticos (*Hazard Analysis and Critical Control Points*; HACCP).

Hasta ahora, la aplicación de tratamientos térmicos intensos y el uso de conservantes químicos han sido las metodologías mayoritariamente empleadas por la industria para asegurar la inocuidad de los alimentos y alargar su vida útil (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003).

Hoy ambas tecnologías resultan poco convenientes teniendo en cuenta que el consumidor actual prefiere alimentos frescos o mínimamente procesados, sin aditivos químicos de ningún tipo (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003; Ross et al., 2003).

Como alternativa, desde hace algunos años, se potencia el uso de tecnologías no térmicas que respeten las características nutricionales,

sensoriales y funcionales del producto, así como la adición de conservantes naturales de origen animal, vegetal o microbiano (Somolinos et al., 2009). Principalmente se persigue la combinación de ambas estrategias porque, en algunos casos, la aplicación conjunta es más efectiva que la aplicación por separado, con lo que se minimiza al máximo el posible efecto de éstas sobre las características del alimento (“Tecnología de barreras”; Leinster, 2000).

Entre las técnicas no térmicas desarrolladas se incluye la aplicación de altas presiones hidrostáticas (APH), capaces de inactivar microorganismos patógenos y/o alterantes (Alpas et al., 1999; Chen y Hoover, 2003; Pina-Pérez et al., 2009; Saucedo-Reyes et al., 2009) dando lugar a productos microbiológicamente estables y seguros, que además, mantienen en mayor medida sus propiedades porque la compresión adiabática del agua no comporta un aumento considerable de la temperatura (unos 3 °C por cada 100 MPa) (Renduelles et al., 2011).

Entre los conservantes naturales destacan los de origen vegetal porque, además de ser agentes bacteriostáticos y/o bactericidas, (Belda-Galbis et al., 2010; Belda-Galbis et al., 2011; Ferrer et al., 2007; Pina-Pérez et al., 2009), muchos son considerados GRAS (*Generally Recognised As Safe*) y tienen efectos positivos sobre la salud del consumidor habitual (Burt, 2004; Javanmardi et al., 2003).

Stevia rebaudiana Bertoni (*stevia*) (Figura 1) es un arbusto perteneciente a la familia *Asteraceae*, nativo de Paraguay pero también presente en zonas colindantes de Brasil y Argentina (Lemus-Mondaca et al., 2012). Sus hojas han sido utilizadas desde antaño por los indios Guaraníes para endulzar diversos alimentos porque su poder endulzante es muy superior al de la sacarosa. Ello se debe a la presencia de glicósidos diterpenos, entre los que destacan el steviósido y el rebaudiósido A (hasta 300 y 450 veces más dulces que la sacarosa, respectivamente) (Crammer e Ikan, 1986) (Figura 1).

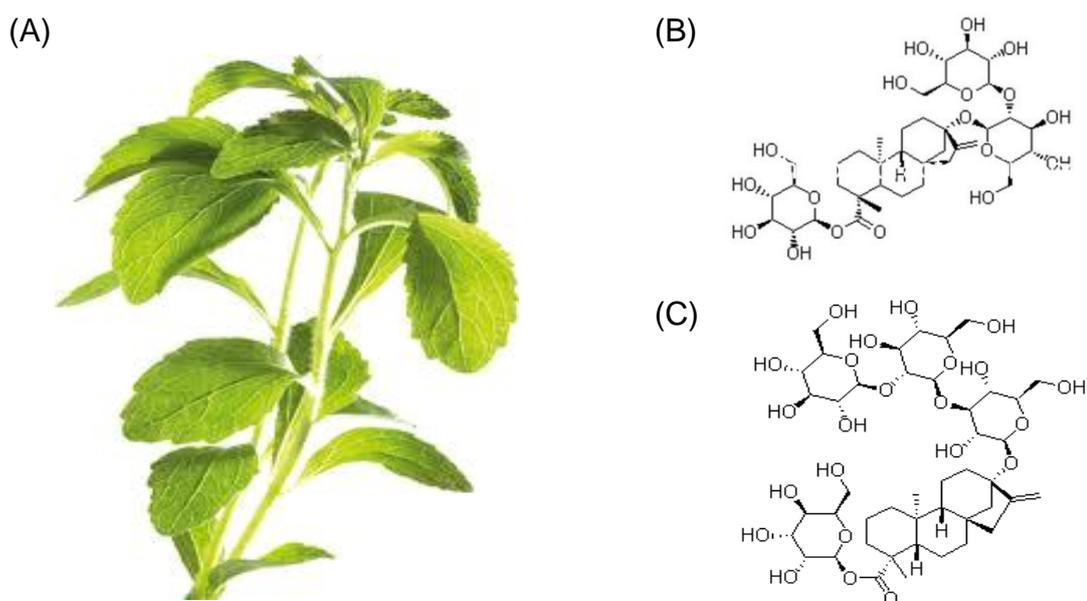


FIGURA 1. *Stevia rebaudiana* Bertoni (A) y estructuras químicas del steviósido (B) y el rebaudiósido A (C) presentes en sus hojas.

Hoy en día, extractos de las hojas son empleados como aditivos alimentarios y, además, se sabe que tienen efectos positivos sobre la salud humana, entre otras cosas, por su capacidad antioxidante, hipoglicemiante, anticariogénica, anticancerígena y antiinflamatoria (Blauth de Slavutzky, 2010; Chen et al., 2006; Das et al., 1992; Gantha et al., 2007; Jayaraman et al., 2008; Shukla et al., 2011; Zehar et al., 2006).

En Asia y Sud América, pueden adquirirse bebidas, salsas, caramelos, galletas, yogures y otros productos en cuya formulación se sustituye todo o parte del azúcar por *stevia*, sin que ello altere sus propiedades físicas (Madan et al., 2010).

En Europa y Estados Unidos, se ha autorizado recientemente el uso de esteviósidos como edulcorantes de uso alimentario por la *Food and Drug Administration* (FDA, 2008) y por la Agencia de Seguridad Alimentaria Francesa (Le Journal officiel de la République Française, 2009), en este último caso, después de que el comité de expertos de la FAO/OMS en aditivos alimentarios (JEFCA) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria mostraran una opinión positiva respecto a su seguridad (EFSA, 2010; FAO y WHO, 2008).

Dadas sus propiedades, recientemente se ha propuesto el uso de distintos extractos de *stevia* como conservante de alimentos. Para ello se han llevado a cabo estudios en los que se evalúa su actividad antimicrobiana empleando diversas metodologías.

El ajuste de los datos observados a modelos matemáticos es una de las posibilidades más interesantes porque permite generar ecuaciones con las que predecir la respuesta de un microorganismo a condiciones no probadas a partir del comportamiento mostrado bajo condiciones definidas y controladas (Ross y McMeekin, 1994). Así, puede conocerse el efecto de cualquier conservante o tecnología de conservación sobre el crecimiento y/o la inactivación bacteriana en medio de referencia y en matrices alimentarias.

Por todo lo expuesto, el principal objetivo de la presente tesis de máster fue evaluar desde un punto de vista cinético, el efecto antimicrobiano de la *stevia* y de las APH, por separado y de forma conjunta, sobre la inactivación de *Listeria monocytogenes* en una bebida compuesta por zumos y leche, teniendo en cuenta que *L. monocytogenes* es uno de los patógenos transmitidos por alimentos que más preocupa a la industria dada su ubicuidad, su capacidad para formar biofilms en superficies de todo tipo (Mørretrø y Langsrud, 2004) y su tolerancia a condiciones extremas de pH, oxígeno, temperatura y salinidad (Codex Alimentarius Commission, 2002; Gandhi and Chikindas, 2007; Mosqueda-Melgar et al., 2008).

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismo

A partir de un líofilo proporcionado por la Colección Española de Cultivos Tipo se obtuvieron múltiples viales de la cepa a estudio (*L. monocytogenes* CECT 4032), siguiéndose el método descrito por Saucedo-Reyes et al.

(2009). Su concentración celular promedio se determinó por recuento de viables en Agar Triptona Soja (TSA; Scharlab S.L., España). El valor obtenido a partir de cuatro muestras fue de $7,60 \times 10^9$ ufc/mL.

Formulación y obtención de la bebida

La bebida utilizada en el presente trabajo se formuló teniendo en cuenta el creciente interés en zumos no procedentes de concentrados, enriquecidos con leche o bebidas similares, y que, además, contienen componentes bioactivos (Sharma, 2005). Su composición pormenorizada se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1. Composición de la bebida formulada.

Ingrediente	%
Zumo de mango	10
Zumo de naranja	7,5
Zumo de papaya	32,5
Bebida de avena	20
Infusión de <i>stevia</i> /Agua	30

Para su obtención se prepararon y mezclaron en las proporciones adecuadas los zumos de mango, naranja y papaya, empleando exprimidores convencionales, equipos de molienda (FitzMill[®], FitzPatrick, USA), prensas neumáticas, tela de lino y tamices de 0,297 μ m, que, en conjunto, permitieron la producción de una mezcla filtrada y homogénea, aprovechando al máximo las piezas de fruta adquiridas.

La infusión de *stevia* se obtuvo a partir de hojas secas suministradas por la empresa Anagálide S.A. (España) y agua embotellada llevada a ebullición. Tras 30 minutos en reposo, la mezcla agua-hojas se filtró, alicuotó y almacenó a -40 °C, empleándose para la filtración un matraz kitasato, un embudo Büchner y papel de filtro (Whatman[®] N^o 1, Whatman International Ltd, UK), obteniéndose un stock concentrado de infusión de *stevia*.

La mezcla de zumos y el batido de avena (Lactavena-Santiveri[®], Santiveri[®] S.L., España) también se alicuotó y congeló a -40 °C.

Antes de ser utilizados, los zumos y la leche se descongelaban a temperatura ambiente, se mezclaban y se esterilizaban en autoclave de forma conjunta. Tras ello, en condiciones de asepsia, se añadía la infusión, previa esterilización en cámara de flujo laminar empleando filtros de 0,20 μ m (Minisart[®], Sartorius, España).

En las muestras control sin *stevia* la infusión era completamente reemplazada por agua embotellada estéril que, además, se utilizaba para diluir la infusión y obtener muestras problema con distintas concentraciones de *stevia*.

Estudio del efecto antimicrobiano de *stevia* en la bebida formulada

Con el fin de evaluar la actividad antimicrobiana de la *stevia* se obtuvieron curvas de inactivación en presencia de distintas concentraciones

de infusión. Las escogidas fueron 0, 0,5, 1,5, 2,5%, teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente por Espinosa et al. (2009) con la misma infusión, en medio de referencia.

Todas ellas se testaron a 37 y 12 °C para evaluar la actividad de la infusión a temperatura óptima de crecimiento y a temperatura de cierto abuso de refrigeración.

Cada curva se obtuvo por dilución y siembra de alícuotas tomadas a intervalos de tiempo regulares, estableciéndose un tiempo de incubación máximo de 1000 horas en caso de que no se obtuviera antes el valor mínimo fiable que puede obtenerse con esta técnica, es decir, un recuento inferior a 30 ufc en la dilución 0.

Las diluciones se efectuaron en agua de peptona estéril al 1‰ (Scharlab S.L., España), las siembras por inmersión y los recuentos en TSA (Scharlab S.L., España) transcurridas 48 horas de incubación a 37 °C.

Cada condición se ensayó al menos por triplicado siendo 1×10^5 ufc/mL el tamaño del inóculo a tiempo 0.

Estudio del efecto de las APH en ausencia y en presencia de *stevia* tras el tratamiento

La inactivación y el daño subletal generado por APH se evaluó comparando el recuento en placa obtenido en TSA con y sin sal, antes y después de la aplicación de tratamientos de intensidad y duración determinada. Esto fue posible porque en medios generales crecen todo tipo de células de viables, estén dañadas o no, mientras que en presencia de sal (NaCl; Scharlab S.L., España) sólo crecen las intactas.

Para cada tratamiento, el número de microorganismos inactivados se estableció en base a la diferencia existente entre los recuentos de viables obtenidos pre y post-tratamiento. Por otro lado, el de dañadas se determinó en base a la diferencia existente entre el recuento de viables y el de intactas, es decir, entre el recuento post-tratamiento obtenido en placas sin sal y con sal.

La concentración de NaCl empleada (5%) se estableció teniendo en cuenta las cantidades utilizadas por otros autores para llevar a cabo estudios similares (García et al., 2004; Somolinos et al., 2008).

Todos los tratamientos se aplicaron a bebida inoculada sin *stevia* o con un 2,5% de ésta, siendo aproximadamente 1×10^7 ufc/mL la concentración celular de partida y empleándose bolsas termoselladas adecuadas para tal fin.

La intensidad y duración de cada uno de ellos se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2. Intensidad y duración de los 20 tratamientos aplicados.

<u>Presión (MPa)</u>	<u>Tiempo (minutos)</u>
250	5; 10; 15; 17,5; 20
275	2,5; 5; 7,5; 10; 12,5
300	3; 4; 5; 6; 7
325	1; 2; 3; 4; 5

Estudio del efecto de las APH en ausencia y en presencia de *stevia* durante incubación a temperatura controlada

Para estudiar de forma conjunta el efecto de la *stevia* y las APH, muestras inoculadas sin *stevia* y con un 2,5% de ésta fueron tratadas e incubadas a 37 °C para obtener curvas de inactivación post-tratamiento que permitieran evaluar si la aplicación de APH potencia los efectos que la infusión tiene sobre *L. monocytogenes* a esa temperatura.

La aplicación de tratamientos y la obtención de curvas se llevaron a cabo siguiendo los protocolos anteriormente descritos, siendo aproximadamente 1×10^7 ufc/mL la concentración celular de partida.

Los tratamientos elegidos fueron: 300 MPa, 3 minutos; y 300 MPa, 1 minuto.

Análisis de resultados: Representación gráfica y ajuste a modelos matemáticos

Con los recuentos obtenidos mediante la incubación de muestras, sometidas o no a APH, se construyeron curvas de inactivación con el logaritmo de los recuentos registrados a lo largo del tiempo.

Empleando el programa Statgraphics® Centurion XV (StatPoint Technologies Inc., USA), todas ellas se ajustaron al modelo de Weibull, cuya expresión matemática es la siguiente (Peleg y Cole, 1998):

(1)

donde: t = tiempo (horas); S = fracción de supervivientes, es decir, el cociente entre N_t y N_0 , siendo N_t = concentración celular a tiempo t (ufc/mL) y N_0 = concentración celular inicial (ufc/mL); b = factor de escala y n = factor de forma.

La bondad de los ajustes se evaluó en base al coeficiente de correlación corregido (R^2 corregido) y al error cuadrático medio (MSE), teniendo en cuenta que la elección del modelo es adecuada si el valor del primero se aproxima a 1 y el del segundo a 0.

Por otro lado, a partir de los recuentos pre y post-tratamiento mediante APH, se calculó el número de células muertas, dañadas e intactas generado con cada uno de ellos y con el paso del tiempo, en caso de que las muestras tratadas se incubaran. Con ellos, se construyeron histogramas de columnas empleando el software Microsoft Office Excel® 2007 (Microsoft® Corporation, USA).

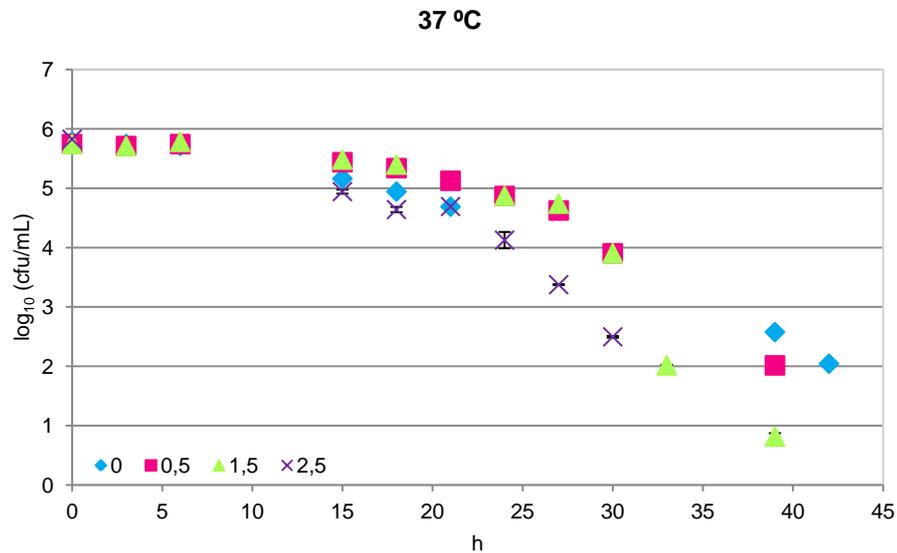
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antimicrobiana de *stevia* frente a *Listeria monocytogenes*

Uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar el efecto que tiene la adición de *stevia* sobre la inactivación de *L. monocytogenes* en una

bebida con zumo de varias frutas y leche de avena. Para ello, se obtuvieron curvas de supervivencia, a 37 y a 12 °C, en presencia de 0, 0,5, 1,5 y 2,5% de infusión de *stevia*. Las curvas obtenidas se muestran en la Figura 2.

(A)



(B)

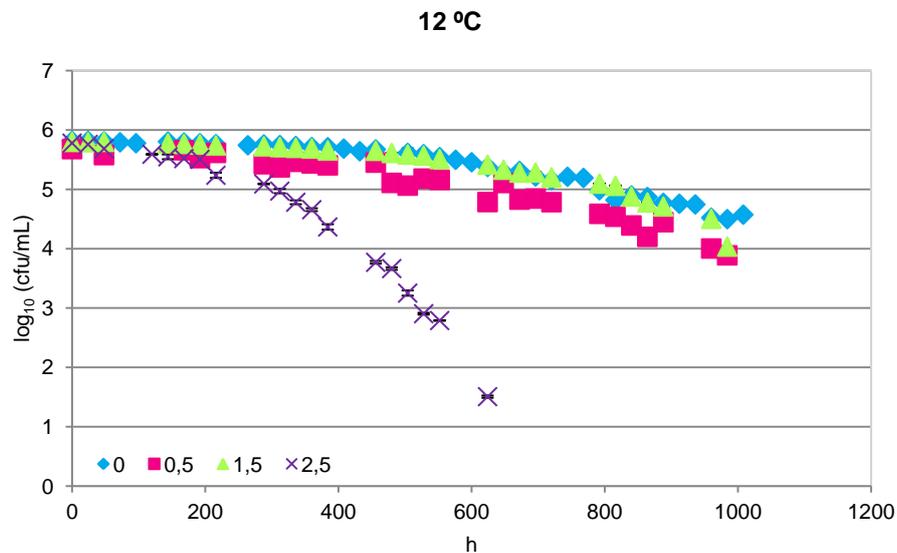


FIGURA 2. Curvas de inactivación de *L. monocytogenes* en presencia de distintas concentraciones de *stevia* (%) a distintas temperaturas. Las barras de error muestran la desviación típica asociada a cada valor.

Todas ellas fueron ajustadas al modelo de Weibull, dada su simplicidad y robustez para describir cinéticas de inactivación lineales ($n = 1$), cóncavas ($n < 1$) y convexas ($n > 1$) (Mafart et al., 2002).

En la Tabla 3 se muestran los valores de b y n obtenidos en cada caso, así como el R^2 corregido y el MSE asociado a cada ajuste.

TABLA 3. *b* y *n* en función de la temperatura y la concentración de *stevia*. Los resultados mostrados corresponden al promedio y la desviación estándar obtenidos a partir de tres repeticiones.

T (°C)	% de <i>stevia</i>	<i>b</i>	<i>n</i>	R^2 ajustado	MSE
37	0	0,051 ± 0,009	1,82 ± 0,52	0,998	0,0031
	0,5	0,041 ± 0,002	2,84 ± 0,16	0,994	0,0075
	1,5	0,038 ± 0,003	3,28 ± 0,14	0,993	0,0121
	2,5	0,055 ± 0,009	2,59 ± 0,83	0,992	0,0116
12	0	0,001 ± 0,000	2,47 ± 0,16	0,992	0,0014
	0,5	0,001 ± 0,000	2,11 ± 0,19	0,990	0,0026
	1,5	0,001 ± 0,000	2,71 ± 0,05	0,995	0,0007
	2,5	0,003 ± 0,000	2,38 ± 0,44	0,991	0,0131

A 37 °C, no se observan diferencias entre los valores de *b* obtenidos con y sin *stevia*. Este parámetro está directamente relacionado con la velocidad de inactivación e inversamente relacionado con el tiempo necesario para que acontezca la primera reducción decimal. Trabajos anteriores en medio de referencia demuestran el carácter antimicrobiano de la infusión empleada a estas concentraciones a 37 °C (Espinosa et al., 2009). Es posible que el pH ácido de la bebida (4,6) y/o la acción de algunos de los componentes presentes en los zumos de mango, naranja y papaya, enmascaren el efecto de la *stevia* en estas condiciones. A 12 °C, en cambio, *b* llega a triplicarse en presencia de un 2,5% de infusión.

Con independencia de la temperatura y de la concentración de *stevia*, todas las curvas muestran un valor de *n* superior a 1 porque todas presentan un hombro. Esto indica que es necesario un cierto tiempo de contacto entre antimicrobiano y microorganismo para que este último comience a inactivarse.

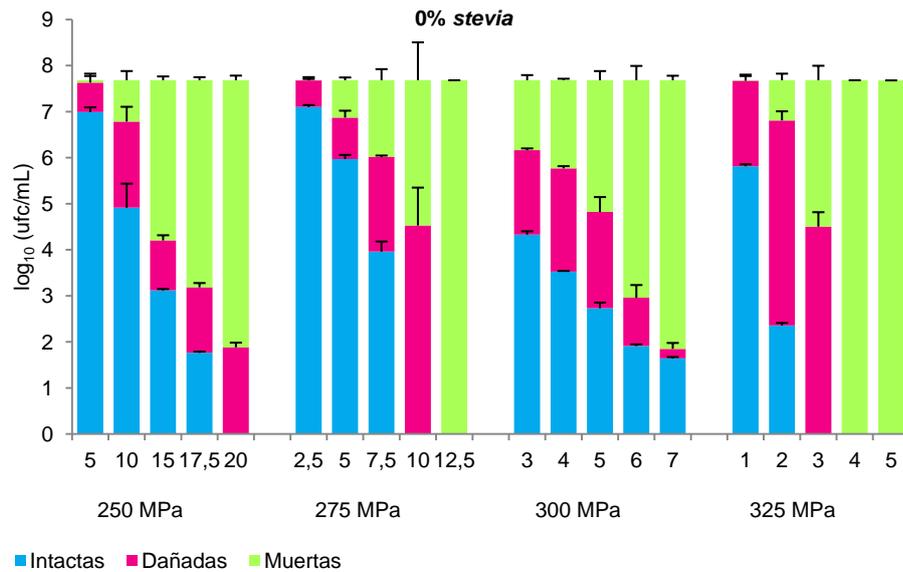
Inactivación y daño subletal provocado mediante altas presiones hidrostáticas en presencia y ausencia de *stevia*

Dado el interés que existe en la aplicación de más de un método de conservación con el fin de obtener alimentos seguros mínimamente procesados aprovechando sinergias (Leistner, 2000), se planteó evaluar el efecto logrado combinando la adición de *stevia* y el procesado mediante APH. Para ello, primero se estudió el efecto de distintos tratamientos sobre la bebida inoculada, con y sin *stevia*, siendo 2,5% la concentración escogida, puesto que parece ser la única capaz de acelerar la inactivación de *L. monocytogenes* en la matriz desarrollada.

Ciertas tecnologías de inactivación, como las APH, son capaces de generar una subpoblación de células dañadas cuya existencia es de vital importancia, sobre todo, cuando se pretende elaborar productos seguros pero poco procesados. Con el tiempo, las células dañadas pueden morir o recuperar su funcionalidad. A diferencia de las células intactas, las dañadas no crecen en medios selectivos comúnmente empleados en la industria para la detección de patógenos en producto final (Wesche et al., 2009; Wu et al., 2008). Por ello, en el presente trabajo se evaluó tanto la inactivación como el

daño subletal logrado en función del tiempo y la intensidad de tratamiento por APH, en ausencia y en presencia de *stevia*. Ambos se determinaron en base a la diferencia existente entre los recuentos obtenidos en TSA con y sin sal, pre y post-tratamiento, teniendo en cuenta que en un medio general crecen viables, estén intactas o dañadas, y que en el mismo medio suplementado con sal sólo crecen las intactas. En la Figura 3 se recogen los resultados obtenidos para cada tratamiento.

(A)



(B)

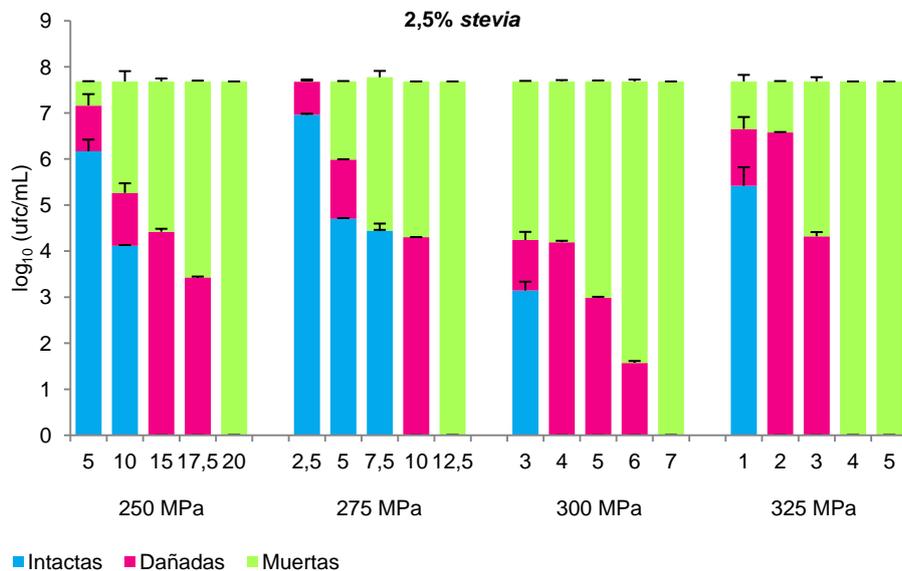


FIGURA 3. Células intactas, dañadas y muertas, en ausencia (A) y presencia (B) de *stevia*, tras diferentes tratamientos de APH. En el eje de categorías se muestran todas las combinaciones de presión (MPa) y tiempo (minutos) ensayadas. Las barras de error corresponden a la desviación estándar que se asocia a los promedios mostrados.

En ambas figuras se observa que para una misma presión, a mayor tiempo de tratamiento, mayor número de células muertas y menor número de células intactas.

Lo mismo ocurre con la presión; para un mismo tiempo de tratamiento, a mayor presión, mayor número de células muertas y menor número de células intactas. Siendo el tiempo 5 minutos, por ejemplo, a 250 MPa se consigue poca inactivación (menos de un ciclo log), mientras que a 325 MPa la inactivación es total (casi 8 ciclos log), se añada o no *stevia* a la bebida.

A igual presión y tiempo de tratamiento, en presencia de *stevia* el número de células muertas es mayor al registrado en ausencia de ésta. El número de intactas, en cambio, es menor.

Si la bebida inoculada se somete a 325 MPa durante 1 minuto, en presencia de *stevia* se reduce el número de células intactas recuperadas y se consigue inactivar a parte de la población, cosa que no ocurre en ausencia de ésta. A esa misma presión, si el tiempo de exposición pasa de 1 a 2 minutos, tras la aplicación del tratamiento, también se detectan diferencias interesantes entre las muestras control y las problema. En presencia de *stevia* la proporción viables:muertas es similar a la observada en su ausencia pero todas las viables están dañadas. Aunque las características del producto desarrollado son suficientes para la inactivación del microorganismo a estudio, estos resultados son importantes porque las células dañadas pueden inactivarse más rápidamente que las intactas y han permitido encontrar diferencias entre tratamientos que parecerían idénticos o de efectos similares si sólo se considera el número de viables post-tratamiento.

Además el estudio del daño producido es muy valioso, porque los resultados obtenidos demuestran que la *stevia* potencia el efecto generado por APH y pueden ser indicadores de efectos sinérgicos entre ambas tecnologías, aunque la magnitud del daño depende de la combinación presión-tiempo. En matrices de pH neutro, por ejemplo, la adición de *stevia* haría que un mismo tratamiento no 100% letal generara células dañadas incapaces de crecer porque la recuperación sólo puede ocurrir bajo condiciones favorables (Wesche et al., 2009; Wu et al., 2008), nunca existentes en alimentos suplementados con *stevia* ya que ésta ha demostrado ser un agente estresante cuando el microorganismo se encuentra en entornos con estas características (Espinosa et al., 2009).

Estudio del efecto de las APH en ausencia y en presencia de *stevia* durante incubación a temperatura controlada

Como se ha comentado anteriormente, es conveniente el estudio de sinergias entre estrategias de conservación no agresivas con las características sensoriales y nutricionales del alimento. Por esta razón, una vez conocido el efecto de cada una de las tecnologías consideradas, se planteó el estudio de sus efectos al ser aplicadas de forma conjunta durante una incubación a temperatura controlada.

Si bien es cierto que el estudio de la inactivación y el daño provocado por APH se llevó a cabo en presencia y ausencia de *stevia*, se requiere un

estudio más completo para establecer hasta qué punto el efecto de la combinación es positivo y para conocer cuál es el efecto que tiene la aplicación de APH sobre la actividad antimicrobiana de la infusión en cuestión.

Interesa saber qué ocurre si las muestras tratadas se incuban porque es posible que así existan diferencias entre las muestras con y sin *stevia* a temperatura óptima de crecimiento (37 °C), cosa que no ocurre si se incubaba bebida inoculada sin tratar (véase el primer apartado de esta sección).

Con esta finalidad, se escogieron dos tratamientos y las muestras tratadas, con y sin *stevia*, se incubaron a 37 °C. De este modo, podrían establecerse, además, diferencias entre los resultados observados tras la aplicación de distintos tratamientos. Los escogidos fueron: 300 MPa, 3 minutos por ser el más efectivo no 100% letal con el que se puede estudiar daño de entre los ensayados para evaluar el efecto de las APH sin incubación; y 300 MPa, 1 minuto por ser un tratamiento de igual presión pero de efectos mínimos, teniendo en cuenta de nuevo los resultados obtenidos sin incubación.

Las curvas generadas en este caso también se ajustaron al modelo de Weibull. Los valores de b y n obtenidos se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4. b y n en función del tratamiento aplicado (TTO; presión (MPa)/tiempo (minutos)) y la concentración de *stevia*. Los resultados mostrados corresponden al promedio y la desviación estándar obtenidos a partir de tres repeticiones.

TTO	% de <i>stevia</i>	b	n	R^2 ajustado	MSE
300/1	0	1,15 ± 0,25	0,50 ± 0,02	0,9922	0,0313
	2,5	5,86 ± 0,55	0,29 ± 0,01	0,9958	0,0041
300/3	0	16,05 ± 2,09	0,29 ± 0,01	0,9932	0,0749
	2,5	37,89 ± 4,63	0,22 ± 0,01	0,9902	0,1168

Para un mismo tratamiento, la incubación en presencia de *stevia* reporta valores de b mayores que los observados en ausencia de ésta. Lo mismo ocurre al aumentar el tiempo de tratamiento, con independencia de la concentración de *stevia*.

Estos resultados confirman además la existencia de un efecto sinérgico entre ambas tecnologías ya que los valores b obtenidos con la incubación de muestras sin tratar son menores (Tabla 3) y porque cuanto mayor es el tratamiento aplicado y la concentración de *stevia*, mayor es el valor de b (1,15 frente a 37,89).

Con el fin de evaluar qué ocurre con las células dañadas si se incuban en presencia de *stevia*, en cada toma de muestra se diluían y sembraban dos alícuotas; una de ellas se sembraba en TSA con sal para conocer el número de células intactas y dañadas presentes en la población a lo largo del tiempo.

A partir de los recuentos obtenidos se construyeron histogramas (Figuras 4 y 5) en los que se observa que la inactivación aumenta con el tiempo y que la proporción de células dañadas depende de éste, del tratamiento y de la concentración de *stevia*. En general, a igual tratamiento y tiempo de

incubación, la proporción de células dañadas es superior en el caso de las muestras que contienen *stevia*. Desde el punto de vista de la aplicación de la tecnología de barreras, este hecho resulta ventajoso ya que estas células dañadas serán más sensibles a estreses posteriores (por ejemplo un almacenamiento refrigerado). Por lo tanto, la presencia de *stevia* conlleva una mayor proporción de células muertas tras el tratamiento por APH y, además, que las células viables restantes se inactiven más rápidamente durante un tiempo de incubación. Si las muestras se someten a 300 MPa durante 1 minuto, en presencia de *stevia* la población tarda 24 horas en quedar completamente inactivada, mientras que en su ausencia se necesitan 48. Si el tiempo de tratamiento es de 3 minutos, curvas que duran 26 horas pasan a durar sólo 5.

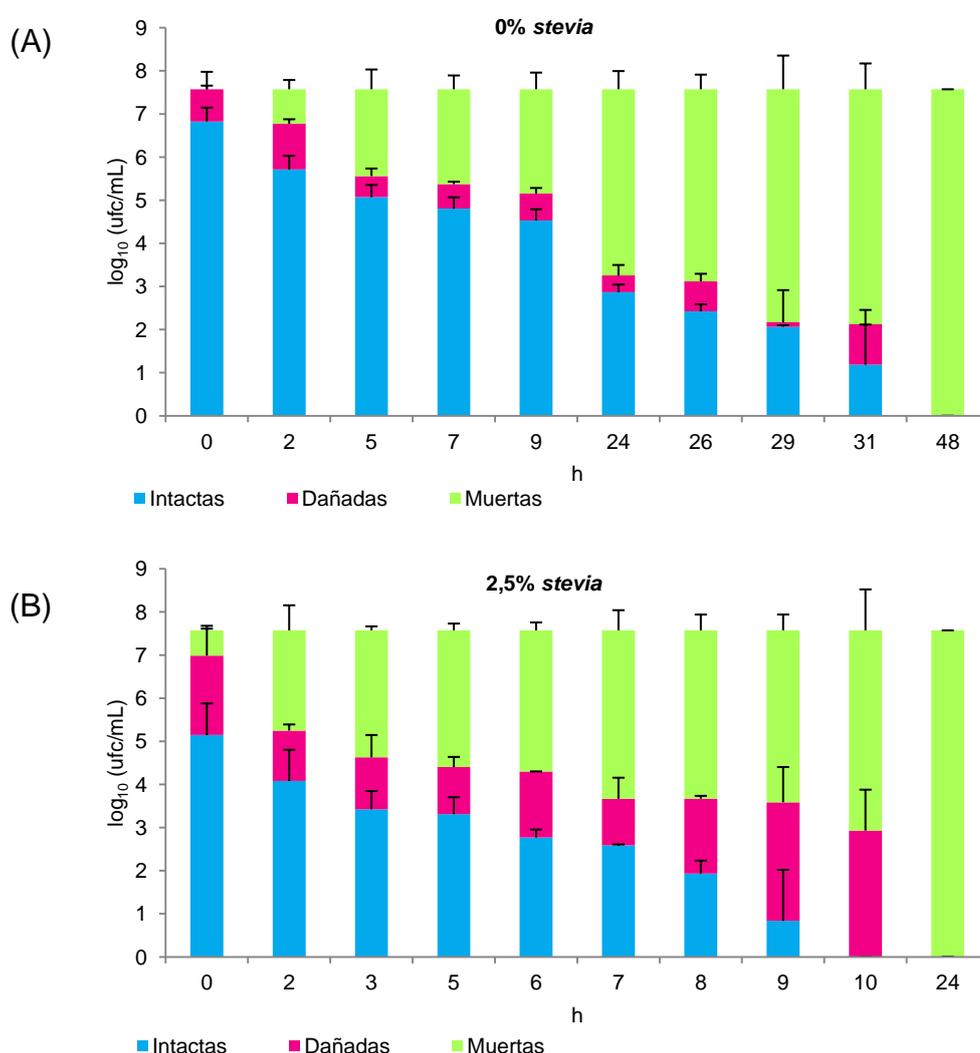
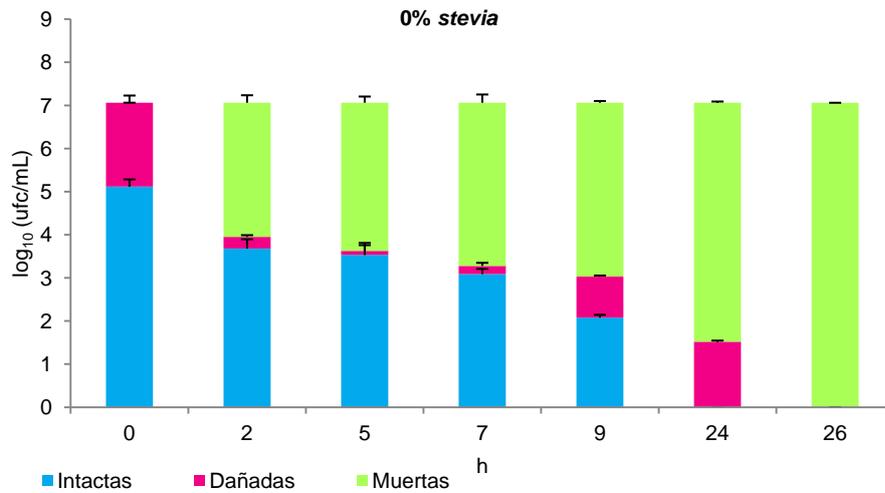


FIGURA 4. Células intactas, dañadas y muertas en función del tiempo de incubación tras someter muestras inoculadas a 300 MPa durante 1 minuto en ausencia de *stevia* (A) y en presencia de ésta (B). Las barras de error corresponden a la desviación estándar que se asocia a los promedios mostrados.

(A)



(B)

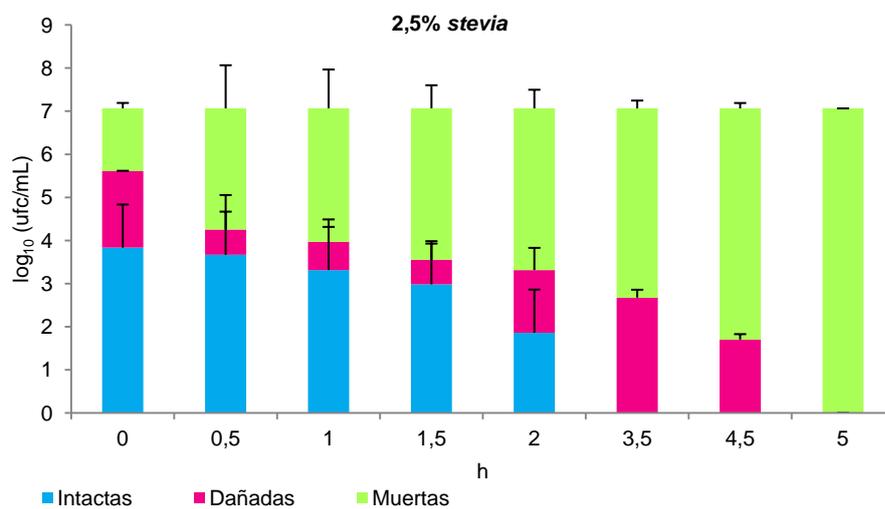


FIGURA 5. Células intactas, dañadas y muertas en función del tiempo de incubación tras someter muestras inoculadas a 300 MPa durante 3 minutos en ausencia de *stevia* (A) y en presencia de ésta (B). Las barras de error corresponden a la desviación estándar que se asocia a los promedios mostrados.

CONCLUSIONES

Con el fin de obtener alimentos sanos, sabrosos y seguros pero poco procesados se potencia la aplicación de tecnologías no térmicas y el uso de conservantes naturales.

Los resultados del presente estudio demuestran que un 2,5% de *stevia* puede acelerar la inactivación de *L. monocytogenes* en una bebida refrigerada (12 °C) compuesta por zumo de varias frutas y leche de avena.

Las altas presiones hidrostáticas también han demostrado ser un buen método para inactivar *L. monocytogenes* en más de 6 ciclos logarítmicos, garantizando la inocuidad del alimento, según los requerimientos de la Food and Drug Administration (FDA, 2003) para zumos procesados.

Combinadas ambas tecnologías potencian el efecto logrado por la otra, de modo que tratamientos poco intensos y concentraciones de *stevia* no efectivas a 37 °C pasan a ser muy adecuadas para reducir y controlar la presencia del patógeno a estudio en la matriz desarrollada.

Además, el porcentaje de células dañadas también aumenta en presencia de *stevia* siendo ventajoso para la aplicación de tecnología de barreras.

Por tanto, la adición de *stevia* puede ser una medida adicional de control microbiológico para garantizar la seguridad de productos mínimamente procesados por altas presiones hidrostáticas, cuyo valor aumenta teniendo en cuenta que la *stevia* es un edulcorante acalórico autorizado, con efectos positivos sobre la salud del consumidor habitual.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no se hubiera podido realizar sin la colaboración de muchas personas que me han aportado su ayuda, sus conocimientos y su apoyo.

En primer lugar, quiero darles las gracias a mis dos directores de tesis: María Dolores Rodrigo Aliaga y Antonio Martínez López. Gracias por haberme acogido en su grupo de investigación, por sus sugerencias, sus consejos, sus correcciones y, por supuesto, por compartir conmigo su gran calidad científica y humana.

A Clara Miracle Belda Galbis, tutora experimental de la tesina, le agradezco su inestimable ayuda, atención y recomendaciones a lo largo de del tiempo que ha durado este trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio (Chelo, Surama, María, Nieves, Cheche, Ángela) gracias también por su ayuda y amistad.

A mis amigos de la carrera, en especial a Ana, por su continuo apoyo y comprensión.

A mis compañeros del máster, especialmente a Marta, por los momentos compartidos en el laboratorio durante la realización de este proyecto.

A mis amigas de toda la vida, por estar siempre dispuestas a escucharme y darme ánimos en los peores momentos, en especial a Oreto.

A Carlos, por su continuo apoyo y ayuda, sus consejos y su paciencia infinita.

A mi familia, especialmente a mis padres y a mi hermana por su constante cariño y ánimo. Sin ellos, nada de esto hubiera sido posible.

A todos, una vez más, GRACIAS.

REFERENCIAS

- Alpas, H.; Kalchayanand, N.; Bozoglu, F.; Sikes, A.; Dunne, CP.; Ray, B. 1999. Variation in resistance to hydrostatic pressure among strains of food-borne pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (9): 4248-4251.
- Belda-Galbis, C.M.; Martínez, A.; Rodrigo, D. 2010. Antimicrobial effect of carvacrol on *Escherichia coli* K12 growth at different temperatures. Mendez-Vilas A. Science and Technology Against Microbial Pathogens: Research, Development and Evaluation. Proceedings of the International Conference on Antimicrobial Research (ICAR2010). Singapore: World Scientific Publishing; 2010; 80-84.
- Belda-Galbis, C.M.; Martínez, A.; Rodrigo, D. 2011. Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana del citral sobre *Listeria innocua* a distintas temperaturas. Proceedings of the VI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. España; Universitat Politècnica de València.
- Blauth de Slavutzky, S. 2010. *Stevia* and sucrose effect on plaque formation. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 5: 213-216.
- Burt, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in food - A review. 2004. *International Journal of Food Microbiology* 94:223-253.
- Centers for Disease Control, Prevention, 2011. Estimates of foodborne illnesses in the United States. Available at <http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>. [Consulta: 18 Junio 2012].
- Chen, H.; Hoover, DG. 2003. Modeling the combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on the inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* Scott A in whole milk. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 4: 25-34.
- Chen, J.; Jeppesen, P.; Abudula, R.; Dyrskog, S.; Colombo, M.; Hermansen, K. 2006. Stevioside does not cause increased basal insulin secretion or b-cell desensitization as does the sulphonylurea, glibenclamide: Studies in vitro. *Life Science*. 78:1748-1753.
- Codex Alimentarius Commission. 2002. Proposed draft guidelines for the control of *Listeria monocytogenes* in foods. Report nr. CX/FH 03/8. USA 2002.
- Crammer, B.; Ikan, R. 1986. Sweet glycosides from the *Stevia* plant. *Chemistry in Britain*. 22: 915-917.
- Das, S.; Das, A.; Murphy, R.; Punwani, I.; Nasution, M.; Kinghorn, A. 1992. Evaluation of the cariogenic potential of the intense natural sweeteners stevioside and rebaudioside A. *Caries Research*. 26: 363-366.
- Espinosa, J. 2009. Actividad antimicrobiana de la *Stevia rebaudiana Bertoni*. Tesis Final de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. 2010. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) Scientific Opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. *EFSA Journal* 8(4):1537
- FAO/WHO. 2008. Summary and Conclusions of the 69th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 17-26 June 2008, Rome, Italy.
- Ferrer, C.; Ramón, D.; Muguerza, B.; Marco, A.; Martínez, A. 2009. Effect of Olive Powder on the Growth and Inhibition of *Bacillus cereus*. *Foodborne pathogens and disease*. 6(1)
- Food and Drug Administration, 2008. FDA response letter GRAS Notice No. GRN 000253, 17 December 2008.
- Gandhi, M; Chikindas, M.L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113, 1-15.
- García, D.; Gómez, N.; Mañas, P.; Condón, S.; Raso, J.; Pagán, R. 2005. Occurrence of sublethal injury after pulsed electric fields depending on the micro-organism, the treatment medium ph and the intensity of the treatment investigated. *Journal of Applied Microbiology*. 99: 94-104.
- Ghanta, S.; Banerjee, A.; Poddar, A.; Chattopadhyay, S. 2007. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potencial of *Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni*, a natural sweetener. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 55: 10962-10967.
- Javanmardi, J.; Stushnoff, C.; Locke, E.; Vivanco, JM. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry* 83: 547-550.

- Jayaraman, S.; Manoharan, M.; Illanchezian, S. 2008. In-vitro antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 7:1143-1149.
- Le Journal officiel de la République française, Edition n° 0206, (6 September 2009). French Ministry of Economy, Finance and Employment. Arrête du 26 août 2009 relatif à l'emploi du rébaudioside A (extrait de *Stevia rebaudiana*) comme additif alimentaire.
- Leistner, L. 2000. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* 55:181–186.
- Lemus-Mondaca, R.; Vega-Gálvez, A.; Zura-Bravo, L.; Ah-Hen, K. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry* 132: 1121-1132.
- Madan, S.; Ahmad, S.; Singh, G.N.; Kohli, K.; Kumar, Y.; Singh, R.; Garg, M. (2010). *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. A review. *Ind J Nat Prod Resources* 1(3): 267-286.
- Mafart, P.; Couvert, O.; Gaillard, S.; Leguerinel, I. (2002) On calculating sterility in thermal preservation methods : application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, **72**, 107-113.
- Møretrø, T; Langsrud S. 2004. *Listeria monocytogenes*: Biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*. 1 (2), 107-121.
- Mosqueda-Melgar, J.; Elez-Martínez, P.; Raybaudi-Massilia, R.M.; Martín-Belloso, O. 2008. Effects of pulsed electric fields on pathogenic microorganisms of major concern in fluid foods: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48: 747-759.
- Peleg, M. and Cole, M. B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Sci*, 38, 353.
- Pina-Pérez, M.C.; Silva-Angulo, A.B.; Mugerza-Marquínez, B.; Rodrigo, D.; Martínez, A. 2009. Synergistic Effect of High Hydrostatic Pressure and Natural Antimicrobials on Inactivation Kinetics of *Bacillus cereus* in a Liquid Whole Egg and Skim Milk Mixed Beverage. *Foodborne pathogens and disease*, 6(6):649-656.
- Raso, J.; Barbosa-Cánovas, G. 2003. Nonthermal Preservation of Foods Using Combined Processing Techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(3): 265-285.
- Rendueles, E.; Omer, MK.; Alvseike, O.; Alonso-Calleja, C.; Capita, R.; Prieto, M. 2011. Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT - Food Science and Technology* 44:1251-1260
- Ross, A.I.V.; Griffiths, M.W.; Mittal, G.S.; Deeth, H.C. 2003. Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 89: 125– 138.
- Ross, T.; McMeekin, T.A. 1994. Predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology* 23: 241-264.
- Saucedo-Reyes, D.; Marco-Celdrán, A.; Pina-Pérez, MC.; Rodrigo, D.; Martínez, A. 2009. Modeling survival of high hydrostatic pressure treated stationary- and exponential-phase *Listeria innocua* cells. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 10(2):135-141.
- Sehar, I.; Kaul, A.; Bani, S.; Pal, H.; Saxena, A. 2008. Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. *Chemio-Biological Interactions*. 173: 115-121.
- Sharma, R. 2005. Market trends and opportunities for functional dairy beverages. *Austr J Dairy Technol*. 60:195–8.
- Shukla S.; Mehta, A.; Bajpai, VK. 2009 *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food and Chemical Toxicology* 47(9): 2338-2343
- Somolinos, M.; García, D.; Condón, S.; Mackey, B.; Pagán, R. 2009. Inactivation of *Escherichia coli* by citral. *Journal of Applied Microbiology*.
- Somolinos, M.; García, D.; Pagán, R.; Mackey, B. 2008. Relationship between sublethal injury and microbial inactivation by the combination of high hydrostatic pressure and citral or tert-butyl hydroquinone. *Applied and Environmental Microbiology*. 75:70-7577.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA). 2003. The Juice HACCP Regulation. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov> [Consulta:23 Junio 2012].
- Wesche; Alissa, M.; Gurtler; Joshua, B.; Marks; Bradley, P.; Ryser; Elliot, T. 2009. Stress, Sublethal Injury, Resuscitation, and Virulence of Bacterial Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection*. 72 (5):1121-1138.

Wu, V.C.H. 2008. A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*. 25: 735-744.

Recursos web

- http://www.bibliotecapleyades.net/salud/esp_salud23o.htm [Consulta: 18 Junio 2012]
- <http://merces.blogspot.es/1282937760/> [Consulta 18 junio 2012]
- http://www.natusweet.at/lccms/_00042/Stevia-Pflanzen-Steviol-Glycoside---Stev.htm?VER=120608122549&LANG=ger&MID=44 [Consulta: 20 junio 2012]
- <http://explow.com/Steviosido> [Consulta: 20 junio 2012]
- <http://explow.com/rebaudiosido> [Consulta: 20 junio 2012]
- <http://www.21food.com/products/dried-stevia-rebaudiana-bertoni-629154.html> [Consulta: 19 junio 2012]
- <http://www.greenindiaherbs.com/> [Consulta: 20 junio 2012]