



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

# **NUEVAS ESTRATEGIAS PARA GARANTIZAR LA ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DE HORCHATA DE CHUFA FRESCA**

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO  
EN CIENCIA E INGENIERIA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: Inés Calabuig Benavent

TUTORA ACADEMICA: Ana María Albors Sorolla

COTUTOR/A: Ana Fuentes López, José Manuel Barat Baviera

DIRECTORA EXPERIMENTAL: María Ruíz Rico

***Curso Académico:***

***2016 - 2017***

**VALENCIA, Septiembre 2017**

## ÍNDICE

0. Resumen -----	3
1. Introducción -----	5
2. Materiales y métodos -----	6
2.1. Materiales -----	6
2.2. Caracterización de las horchatas de chufa comerciales -----	7
2.2.1. Preparación de muestras -----	7
2.2.2. Análisis fisicoquímicos -----	7
2.2.3. Análisis microbiológicos -----	7
2.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos bioactivos frente a la flora microbiana típica de la horchata de chufa fresca -----	8
2.3.1. Preparación de las muestras -----	8
2.3.2. Estudio de la actividad anitimicrobiana de timol y vainillina	
2.3.3. Evaluación sensorial de la horchata suplementada con los compuestos bioactivos-----	9
2.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la vainillina frente <i>Escherichia coli</i> y <i>Listeria innocua</i> -----	9
2.5. Análisis estadístico -----	10
3. Resultados y discusión -----	10
3.1. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de horchata de chufa fresca y pasteurizada	
3.2. Actividad antimicrobiana de timol y vainillina incorporados a horchata de chufa fresca	
3.3. Actividad antimicrobiana de vainillina frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Listeria innocua</i> presente en horchata de chufa	
4. Conclusiones -----	20
5. Referencias -----	20

# NUEVAS ESTRATEGIAS PARA GARANTIZAR LA ESTABILIDAD MICROBIOLÓGICA DE HORCHATA DE CHUFA FRESCA

Inés Calabuig, María Ruiz-Rico, Ana Fuentes, José M. Barat, Ana M. Albors

## RESUMEN

La horchata de chufa es un alimento de aspecto lechoso, de gran valor nutricional y elevado contenido energético, obtenido mecánicamente a partir de los tubérculos *Cyperus Sculentus L.* Es un alimento altamente perecedero, debido a su alto contenido en azúcares y almidón, y la posible contaminación de la materia prima. Para garantizar su inocuidad se aplican habitualmente tratamientos de esterilización, pasteurización y congelación, que pueden provocar cambios indeseables en la calidad sensorial y nutritiva del producto. En el presente trabajo, se estudia la aplicación de compuestos bioactivos, como la vainillina y el timol, en muestras de horchata, como alternativa a los tratamientos térmicos convencionales, para garantizar la calidad microbiológica de dichos productos. Los análisis llevados a cabo en las muestras de horchata han sido determinaciones fisicoquímicas (pH, conductividad y grados brix) y microbiológicas (levaduras y mohos, enterobacterias, lactobacilos, microorganismos aerobios mesófilos, psicrófilos, *Escherichia coli* y *Listeria innocua*).

**PALABRAS CLAVES:** horchata, vainillina, timol, microorganismos, actividad antimicrobiana

## RESUM

L'orxata de chufa es un aliment d'aspecte semblant a la llet, amb gran valor nutritiu i elevat contingut energètic, que s'obté mecànicament a partir dels tubercles *Cyperus Sculentus L.* Es tracta d'un aliment fàcilment perible, pel seu contingut en sucres i mido, i la possible contaminació de la matèria primera. Per a garantir la seva innocuïtat s'apliquen convencionalment els tractaments d'esterilització, pasteurització i congelació, que poden provocar canvis indesitjables pel que fa a la qualitat sensorial i nutritiva del producte. El present treball, tracta d'estudiar l'aplicació de components bioactius, com son la vainillina i el timol en mostres d'orxata, com alternativa als tractaments tèrmics convencionals, per a garantir la qualitat microbiològica d'aquets productes. Els anàlisis duts a terme en aquestes mostres d'orxata son determinacions fisicoquímiques (pH, conductivitat y graus brix) i microbiològiques (llevats i fongs, enterobacteris, lactobacils, aerobis mesòfils, psicròfils, E.coli i listeria).

**PARAULES CLAUS:** Orxata, vainillina, timol, microorganismes, activitat antimicrobiana

## **ABSTRACT**

Tiger nut milk is a creamy drink, of high nutritional value and high energy content, obtained mechanically from *Cyperus Esculentus* L tubers. It is a highly perishable food due to its high sugar and starch content, and the possible contamination of the raw material. To guarantee its innocuousness, sterilisation, pasteurisation and freezing treatments are regularly applied, which may cause undesirable changes in the sensory and nutritional quality of the product. This paper examines the application of bioactive compounds, such as vanillin and thymol, in tiger nut milk samples as an alternative to conventional heat treatments, to ensure the microbiological quality of such products. The analyses carried out on tiger nut milk samples have been physicochemical (pH, conductivity and brix levels) and microbiological (yeasts and moulds, enterobacteria, lactobacillus, aerobic mesophilic bacteria, psychrophiles, *E. coli* and *Listeria*) determinations.

**KEYWORDS:** tiger nut milk, vanillin, thymol, microorganisms, antimicrobial activity

## 1. INTRODUCCIÓN

La horchata de chufa es un producto nutritivo de aspecto lechoso, obtenido mecánicamente a partir de los tubérculos *Cyperus Sculentus L.*, sanos, maduros, seleccionados y limpios, rehidratados, molturados y extraídos con agua potable, con o sin adición de azúcar, azúcares, o sus mezclas, con color, aroma y sabor típicos del tubérculo del que proceden, con un contenido mínimo de almidón, grasa y azúcares (RD 1338/1988, BOE, 1988).

La horchata de chufa es un alimento de gran valor nutricional y elevado contenido energético (Cortés et al., 2007). Entre sus nutrientes mayoritarios destacan los hidratos de carbono, debido a su elevado contenido en almidón y fibra dietética, que proporcionan prebióticos para las bacterias del colon, podrían ser eficaces en el tratamiento y prevención de muchas enfermedades incluyendo cáncer de colon, enfermedad coronaria, obesidad, y diabetes. Es un alimento con un interesante perfil en ácidos grasos, concretamente ácidos grasos monoinsaturados (dentro de los que destaca el ácido oleico) y poliinsaturados (principalmente ácido linolénico) (Sánchez-Zapata et al., 2012). Es fuente de aminoácidos no esenciales y de minerales, principalmente potasio y el fósforo (Torán et al., 2002).

Es un alimento altamente perecedero, ya que su alto contenido en azúcares y almidón, hacen que la horchata sea un medio idóneo para el desarrollo de microorganismos. Además, su alteración está también condicionada por la carga microbiana procedente de las condiciones de cultivo, cosecha y almacenamiento de los tubérculos de la chufa (Cortés et al., 2007).

La legislación establece que para la conservación de la horchata únicamente pueden emplearse tratamientos físicos autorizados (BOE, 1988). Entre estos tratamientos, la esterilización, pasteurización y congelación son los más habituales. La aplicación de estos tratamientos garantiza la inocuidad del producto y alarga la vida útil del alimento, pero conllevan cambios indeseables en la calidad sensorial y nutritiva del producto (Cortés et al., 2007). En el caso de los tratamientos de esterilización y pasteurización, cuando la horchata es tratada térmicamente los granos de almidón pierden su estructura cristalina y absorben agua, provocando un incremento en la viscosidad, de ahí la necesidad de utilizar durante el procesado de la horchata enzimas amilolíticas. Por todo ello, la industria alimentaria intenta buscar tratamientos alternativos para mejorar la calidad microbiológica de la horchata de chufa sin afectar a las propiedades sensoriales y nutricionales de esta bebida (Cortés et al., 2007).

En los últimos años se están desarrollando técnicas físicas, que no implican un tratamiento térmico, como los campos de pulsos eléctricos (Oms-Oliu et al., 2010), las altas presiones (Mújica-Paz et al., 2011) o membranas de filtración (Papafotopoulou-Patrinou et al., 2016). Sin embargo, suelen ser tecnologías muy costosas con cierto grado de complejidad. Otros estudios como los de Ribes, et al., (2017) o Gisbert et al., (2015), evalúan los sistemas microestructurados de sílice como soporte con función antimicrobiana. Así mismo, se ha propuesto la adición de compuestos antimicrobianos naturales como alternativa a los tratamientos de conservación convencionales. Algunos autores tal como Rosaria-Corbo et al., (2009) han planteado la combinación de antimicrobianos naturales con otras técnicas (HHP, altas presiones hidrostáticas) resultando en un aumento de la vida útil

más alto que la simple adición de los efectos de la presión y antimicrobianos individualmente.

Los compuestos activos de aceites esenciales presentan actividad antimicrobiana probada frente a diversos microorganismos (Hyldgaard et al., 2012). La actividad antimicrobiana de componentes fenólicos de aceites esenciales, como el timol o la vainillina, ha sido atribuida a su interacción con las membranas celulares microbianas, causando la pérdida de iones y del contenido citoplasmático, que conlleva la disrupción de la membrana bacteriana, y por tanto, la muerte celular (Reyes-Jurado et al., 2015; Ruiz-Rico et al., 2017). El uso de estos compuestos bioactivos se ha estudiado ampliamente, pero su aplicación en alimentos se ve limitada por la escasa solubilidad en agua, la elevada volatilidad que disminuye la eficacia, las particulares propiedades sensoriales, y la posible interacción con componentes de los alimentos (Burt, 2004).

Estos compuestos bioactivos han sido incorporados a diversos alimentos con el fin de estudiar su efectividad como agentes de conservación, pero la incorporación a horchata de chufa como alternativa al tratamiento térmico para prolongar la vida útil de la horchata garantizando su estabilidad microbiológica y la inocuidad del producto no ha sido estudiada hasta el momento. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de timol y vainillina incorporados a horchata de chufa fresca, frente a los microorganismos alterantes típicos de este producto (mohos y levaduras, bacterias ácido lácticas, aerobios mesófilos y psicrófilos, y enterobacterias) así como frente a dos potenciales bacterias patógenas (*Escherichia coli* y *Listeria innocua*), en comparación con el tratamiento térmico convencional (pasteurización).

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Materiales**

Con el objetivo de establecer las características fisicoquímicas y microbiológicas de las horchatas existentes en el mercado se analizaron diferentes muestras de horchata fresca (sin tratamiento térmico) y horchatas comerciales sometidas a tratamiento térmico de conservación. Las muestras de horchata fresca correspondieron a una muestra adquirida en un establecimiento de restauración de la provincia de Valencia y una muestra adquirida a una empresa elaboradora que comercializa su producto on-line. Se analizó también una muestra de horchata pasteurizada, adquirida en un supermercado de la ciudad de Valencia y que en el punto de venta se presentaba envasada en botella de vidrio y bajo condiciones de refrigeración. Así mismo, se adquirieron muestras de horchata esterilizada comercial para llevar a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos de estudio. Tras la recogida o compra, las muestras de horchata adquiridas se mantuvieron hasta el momento de análisis bajo condiciones de refrigeración. El timol fue adquirido en Sigma Aldrich (Madrid, España) y la vainillina fue proporcionada por Ventós (Barcelona, España). Los medios de cultivo para los ensayos microbiológicos fueron adquiridos en Scharlab (Barcelona, España).

## **2.2. Caracterización de las horchatas de chufa comerciales**

### **2.2.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

Las distintas horchatas de chufa analizadas para este trabajo fueron mantenidas en condiciones asépticas y 50 mL de las diferentes bebidas fueron distribuidas en matraces Erlenmeyer de vidrio, los cuales fueron inmediatamente almacenadas en refrigeración (8 °C) durante un periodo de 7 días, llevándose a cabo las determinaciones fisicoquímicas y microbiológicas a los 0, 1 y 3 días de almacenamiento. Cada día de muestreo se analizaron 3 de estos matraces.

### **2.2.2. ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS**

Cada día de muestreo se determinaron los parámetros de pH, °Brix y conductividad. El pH de las muestras se midió directamente s empleando un pH-metro Crison micropH 2001 (Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España). Para determinar el contenido en azúcar de la horchata, se determinaron los °Brix, mediante un refractómetro (Bellingham and Stanley mod. RFM300+, Kent, Reino Unido). La determinación de la conductividad se realizó mediante un conductímetro Mettler Toledo mod. S20 seven easy (Mettler Toledo S.A.E, Aldaida, España). De cada una de las muestras de horchata se tomaron nueve mediciones de cada uno de los parámetros, a partir de las cuales se calcularon los valores promedio.

### **2.2.3. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS**

Para llevar a cabo los análisis microbiológicos, se prepararon diluciones decimales seriadas en agua de peptona, tal y como se describe en la Norma UNE EN-ISO 6887-3 (AENOR, 2004). A partir de estas diluciones de la horchata se llevó a cabo la siembra en placa con el objetivo de establecer la presencia de microorganismos que suelen estar presentes en dicha matriz alimentaria como son los microorganismos aerobios mesófilos y psicrófilos, enterobacterias, bacterias ácido lácticas, y mohos y levaduras.

Para la enumeración de microorganismos aerobios totales se realizó la siembra en profundidad de 1 mL de la muestra en agar Plate Count (PCA), con incubación de las placas a 30 °C durante 72 h. Para los microorganismos psicrótrofos, las muestras se sembraron en PCA y se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) tras la incubación a 10 °C durante 5 días. Para la determinación de enterobacterias, se llevó a cabo la siembra de 1 mL de muestra en placa, sobre los que se adicionaron dos capas del medio de cultivo VRBD (Violet Red Bile Dextrose Agar), y se llevó a cabo el recuento tras incubación a 37°C durante 48 h. Para la enumeración de bacterias ácido lácticas se realizó la siembra en profundidad con doble capa de agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y se llevó a cabo el recuento tras la incubación a 37 °C durante 48 h. Por último, para el recuento de mohos y levaduras se realizó siembra de 0,1 mL de muestra en la superficie de agar de patata dextrosa (PDA) y se incubaron las placas 72 h a 25 °C (Corrales et al., 2012).

### **2.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos bioactivos frente a la flora microbiana típica de la horchata de chufa fresca**

Una vez caracterizadas las distintas muestras de horchata se llevó a cabo el estudio de la influencia de timol y vainillina incorporados a esta bebida vegetal sobre los microorganismos alterantes de la horchata. Para ello, se realizó una evaluación de la susceptibilidad microbiana de microorganismos aerobios mesófilos y psicrófilos, enterobacterias, bacterias ácido lácticas y mohos y levaduras tras el almacenamiento de la horchata fresca suplementada con un amplio rango de concentraciones de los compuestos antimicrobianos naturales. De forma paralela, se llevó a cabo una evaluación sensorial de las distintas muestras de horchata con el fin de establecer el rango de concentraciones de timol y vainillina incorporados a la horchata que pueden ser considerados aceptables por el consumidor.

#### **2.3.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Para la preparación de las muestras, 25 mL de la horchata fresca se introducida en matraces Erlenmeyer, a los que se adicionaron las cantidades necesarias de los compuestos antimicrobianos naturales (timol y vainillina) para obtener las concentraciones de estudio de los compuestos bioactivos incorporado a la horchata de chufa. Los matraces fueron almacenados en refrigeración (8°C) durante un periodo de 7 días, llevándose a cabo las determinaciones microbiológicas a los 0, 1, 3 y 7 días de almacenamiento (0, 24, 72 y 168 horas respectivamente). Así mismo, se prepararon muestras control (sin adición de compuestos antimicrobianos) para establecer el crecimiento de los microorganismos en ausencia de tratamiento.

#### **2.3.2. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANITIMICROBIANA DE TIMOL Y VAINILLINA**

Como estudio preliminar se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana de timol y vainillina a concentraciones iguales y superiores a la concentración mínima bactericida obtenida en los ensayos *in vitro* en caldo de cultivo del estudio de Ruiz-Rico et al. (2017). Para ello, se estudió el efecto inhibitorio de los compuestos bioactivos sobre la flora de horchata de chufa fresca a concentraciones de 2, 5, 10 y 20 mg/mL, para la vainillina, y concentraciones de 0,2, 0,5, 1 y 2 mg/mL, para el timol.

Tras el análisis de los resultados obtenidos y la evaluación sensorial de las muestras, se procedió a descartar el timol como agente antimicrobiano en horchata y se llevó a cabo el estudio de la actividad antimicrobiana de vainillina a concentraciones de 2,5, 5, 7,5 y 10 mg/mL sobre los microorganismos alterantes de horchata fresca a lo largo del período de almacenamiento del alimento.

### 2.3.3. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LA HORCHATA SUPLEMENTADA CON LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS

El timol y la vainillina son compuestos orgánicos con características organolépticas muy particulares (fuerte aroma y sabor), por lo que su incorporación a la horchata afecta el perfil sensorial de este alimento. Por tanto, es fundamental la evaluación sensorial de la horchata suplementada con las diferentes concentraciones de los compuestos bioactivos para establecer el rango de concentraciones aceptable sensorialmente.

La evaluación sensorial se llevó a cabo por cuatro jueces entrenados. La selección, entrenamiento y control de los catadores fueron llevados a cabo considerando los criterios establecidos en la norma ISO 8586:2012 (AENOR, 2014). El análisis sensorial se llevó a cabo con el objetivo de establecer la cantidad mayor de compuesto bioactivo incorporada en la horchata que era aceptada por los catadores. En este caso, se determinaron como valores límite de incorporación, 10mg/ml de vainillina y 0mg/ml de timol, a partir de los cuales se considera que la incorporación del compuesto otorga al producto final (horchata de chufa) características organolépticas inaceptables.

### 2.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la vainillina frente *Escherichia coli* y *Listeria innocua*

Una vez estudiada la actividad antimicrobiana de la vainillina frente a la típica flora alterante de la horchata fresca, se procedió a evaluar la capacidad inhibitoria del compuesto activo frente a dos bacterias modelo de potenciales bacterias patógenas que podrían contaminar la horchata. El estudio de la actividad antimicrobiana de la vainillina incorporada a horchata sobre microorganismos patógenos fue realizado usando como microorganismos modelo una bacteria Gram-positiva como *Listeria innocua* y una bacteria Gram-negativa como *Escherichia coli*. Las cepas de *L. innocua* (CECT 910) y *E. coli* K12 (CECT 433) fueron obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT; Valencia, España). Para el crecimiento de las bacterias se usó agar Plate Count (PCA) y caldo de tripticosa soja (TSB). Para la preparación del inóculo se tomó una colonia de las bacterias crecidas en PCA con un asa de siembra y se introdujo en un tubo de 10 mL TSB, el cual fue incubado durante 24 h a 37 °C con el objetivo de obtener un inóculo con una densidad de  $1 \times 10^9$  células/mL.

La preparación de las muestras de horchata se llevó a cabo mediante la distribución de horchata estéril en matraces Erlenmeyer (25 mL) sobre los que se adicionó la vainillina a concentraciones de 4, 8 y 16 mg/mL. Una vez preparados los matraces, se procedió a inocular las muestras de horchata con el microorganismo de estudio obteniendo las densidades de inóculo finales de  $10^2$  y  $10^4$  UFC/mL. Las muestras inoculadas fueron almacenadas en refrigeración (8 °C) durante 3 días. La actividad antimicrobiana fue evaluada a tiempo 0, 1, 3 y 7 días mediante la siembra en superficie de 0,1 mL de las muestras de horchata en los medios selectivos de agar Palcam suplementado con antibióticos y Tryptone Bile X-Glucuronide (TBX), para *L. innocua* y *E. coli* respectivamente, y agar PDA para el recuento de mohos y levaduras. Tras la incubación de las placas a 37 °C durante 24-48 h para las bacterias y 25 °C durante 72 h para los mohos y levaduras, se procedió al recuento.

## 2.5. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el programa Statgraphics Plus v.5.1 (Manugistics, Rockville, MD, USA). Con el objetivo de comprobar el efecto de la adición de vainillina y timol durante el tiempo almacenamiento sobre cada uno de los parámetros evaluados, se llevó a cabo un análisis de la varianza multifactorial (ANOVA multifactorial), donde se consideraron como variables los diferentes parámetros fisicoquímicos y microbiológicos y como factores la concentración de compuesto bioactivo y el tiempo de almacenamiento.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de horchata de chufa fresca y pasteurizada

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica de las diferentes horchatas comerciales. Las muestras analizadas corresponden a una horchata pasteurizada comprada en una superficie comercial, realizando los análisis a las 24 horas de su adquisición. También se obtuvieron dos muestras a un fabricante (horchata pasteurizada y fresca), y en ambos casos las mediciones se llevaron a cabo 24 horas después de su recogida, y tras su almacenamiento en refrigeración durante 72 horas.

**Tabla 1.** Parámetros físico-químicos de horchatas.

Muestra	Tratamiento	Tiempo (h)	°Brix	pH	Conductividad (s/cm)
Horchata superficie comercial	Pasteurizada	24	19,2 ± 0,3	6,57 ± 0,12	2,23 ± 0,009
	Fresca	24	19,2 ± 0,19	6,53 ± 0,05	2,16 ± 0,02
Horchata fabricante	Pasteurizada	24	7,05 ± 0,27	6,80 ± 0,14	3,52 ± 0,01
	Fresca	72	6,5 ± 0,3	6,70 ± 0,01	3,90 ± 0,02
	Pasteurizada	72	7,9 ± 0,3	6,93 ± 0,01	3,10 ± 0,03

Respecto a los parámetros físico-químicos analizados, se encontraron algunas diferencias significativas entre la horchata fresca y pasteurizada, siendo de especial relevancia las diferencias encontradas en la horchata de fabricante, en las determinaciones llevadas a cabo a las 24 horas de su adquisición (en la tabla 1, puede observarse que los valores obtenidos en la determinación de azúcares presentes, son de 7,05 ± 0,27 °Brix para la horchata pasteurizada, mientras que para la horchata fresca son de 19,2 ± 0,19 °Brix.

Los recuentos microbiológicos de las muestras de horchata fresca procedente de horchatería, y de las muestras de horchata fresca y pasteurizada antes mencionadas, se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Recuentos microbiológicos (log UFC/mL) de las muestras de horchata de chufa fresca (promedio  $\pm$  desviación estándar)

Muestra	Tratamiento	Tiempo (h)	EB*	MS*	LB*	M+L*	PSI*
Horchata Horchatería	Fresca	0	4,19 (0,21)	4,75 (0,02)	3,78 (0,45)	2,99 (0,02)	-
		24	-	7,23 (0,25)	6,24 (0,17)	6,95 (0,05)	-
Horchata Superficie Comercial	Pasteurizada	0	-	3,11	1,207	-	3,07
		24	3,48 (0,28)	-	-	-	2,80 (0,16)
Horchata Fabricante	Fresca	0	0,62 (0,10)	2,87 (0,24)	-	2,23 (0,20)	2,21 (0,06)
		24	5,05 (0,77)	5,49 (0,08)	4,25 (0,01)	5,36 (0,05)	4,22 (0,02)
	Pasteurizada	0	0,99 (0,70)	3,84 (0,21)	0,88 (0,10)	3,1 (0,2)	3,20 (0,03)
		24	5,79 (0,15)	6,22 (0,01)	5,59	5,24 (0,10)	2,88 (0,15)

\*EB (enterobacterias), MS (microorganismos aerobios mesófilos), LB (lactobacilos), M+L (levaduras y mohos), PSI (psicrófilos).

Los valores obtenidos en la caracterización microbiológica de la horchata, son similares a las muestras analizadas en otros estudios como el de Sebastia et al., (2012), en el que se llevó a cabo un análisis microbiológico de 24 muestras de horchata fresca, y se encontraron valores de incidencia del 62% para levaduras, mohos, y enterobacterias, 46% para bacterias ácido lácticas y del 67% para microorganismos aerobios mesófilos). Dichos resultados indican que se trata de un producto con elevada carga microbiana.

Cabe destacar que la legislación (RD 1338/1988, BOE, 1988) establecía en los recuentos un límite de  $1 \times 10^2$  UFC/ml para enterobacterias, y  $7 \times 10^5$  UFC/ml para aerobios mesófilos, para la horchata de chufa fresca, y en la horchata de chufa pasteurizada, lo mismo para enterobacterias ( $1 \times 10^2$  UFC/ml) y  $2,5 \times 10^5$  UFC/ml para aerobios mesófilos; aunque dichas disposiciones relativas a los criterios microbiológicos de la horchata de chufa se derogaron posteriormente (135/2010, BOE, 2010).

Algunos autores realizan análisis microbiológicos a productos similares a la horchata de chufa fresca, como Marulanda Botero & Pérez Acosta (2007), los cuales obtienen en los recuentos llevados a cabo en bebidas de soja (producidas por la empresa Zohar), unos resultados con rangos situados entre 11 y 20 UFC/ml para los microorganismos aerobios mesófilos.

### 3.2. Actividad antimicrobiana de timol y vainillina incorporados a horchata de chufa fresca

Las tablas 3, 4 y 5 muestran los valores obtenidos en los recuentos microbianos realizados a las muestras de horchata control (sin timol) y las muestras de horchata suplementadas con los compuestos bioactivos.

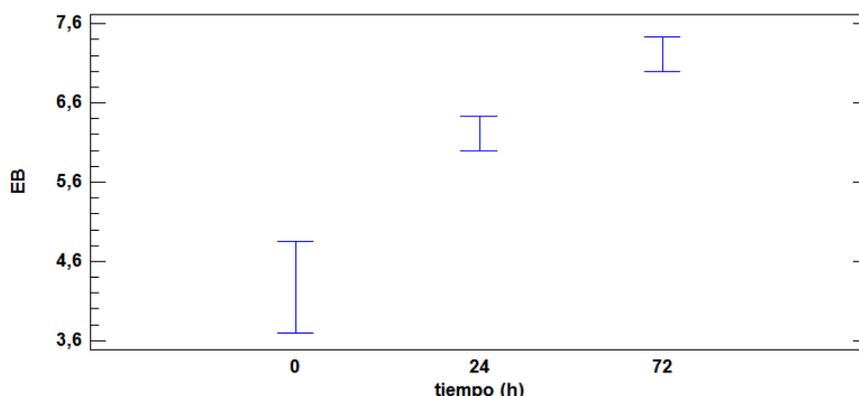
En la tabla 3 se presentan los resultados para el estudio del efecto inhibitorio del timol a distintas concentraciones sobre la horchata tras 0, 24 y 72 horas en refrigeración. Se ha observado que, en el intervalo de concentraciones de timol ensayadas, el compuesto no ha producido una variación significativa en los recuentos de enterobacterias. Además, durante el periodo de estudio se observa un aumento significativo de EB (enterobacterias), MS (microorganismos aerobios mesófilos) y LB (lactobacilos) a lo largo del tiempo de almacenamiento en refrigeración aún en presencia de timol en la horchata.

**Tabla 3.** Resultados del análisis microbiológico de horchata de chufa fresca con timol (media del log 10 UFC/g y desviación estándar).

Tiempo (h)	Concentración (mg/ml)	EB*	MS*	LB*	PSI*	M+L*
0	0	4,4 <sup>a</sup>	6,3 <sup>a</sup>	-	4,47 <sup>a</sup>	6,30 <sup>ab</sup>
		(0,3)	(0,3)			(0,12)
24	0	6,2 <sup>b</sup>	7,06 <sup>a</sup>	4,8 <sup>a</sup>	7,46 <sup>b</sup>	6,62 <sup>a</sup>
		(0,4)	(0,84)	(0,03)	(0,03)	(0,23)
72	0	7,48 <sup>c</sup>	7,63	6,69 <sup>b</sup>	4,46 <sup>a</sup>	6,16
		(0,15)	(0,02)	(0,07)	(0,16)	(0,38)
24	0,2	6,2 <sup>b</sup>	6,07 <sup>a</sup>	5,12 <sup>a</sup>	7,02 <sup>b</sup>	7,2 <sup>a</sup>
		(0,9)	(0,57)	(0,03)	(0,02)	(0,8)
	0,5	6,4 <sup>b</sup>	6,88 <sup>a</sup>	5,07 <sup>a</sup>	7,3 <sup>b</sup>	6,8 <sup>a</sup>
		(0,8)	(0,82)	(0,12)	(0,3)	(0,4)
72	1	6,2 <sup>b</sup>	6,79 <sup>a</sup>	5,31 <sup>a</sup>	7,08 <sup>b</sup>	6,18 <sup>a</sup>
		(0,90)	(0,63)	(0,21)	(0,55)	(0,04)
72	2	6,2 <sup>b</sup>	6,96 <sup>a</sup>	5,16 <sup>a</sup>	7,53 <sup>b</sup>	6,46 <sup>a</sup>
		(0,5)	(0,70)	(0,10)	(0,09)	
	0,2	7,34 <sup>c</sup>	7,78 <sup>b</sup>	6,25 <sup>b</sup>	6,25 <sup>a</sup>	5,47 <sup>b</sup>
		(0,16)	(0,16)	(0,06)		
72	0,5	6,95 <sup>c</sup>	7,69 <sup>b</sup>	6,41 <sup>b</sup>	6,41 <sup>a</sup>	5,47 <sup>b</sup>
		(0,14)	(0,08)	(0,14)	(0,19)	
72	1	7,18 <sup>c</sup>	7,57 <sup>b</sup>	6,9 <sup>b</sup>	6,90	5,47 <sup>b</sup>
		(0,02)	(0,38)	(0,3)		
72	2	7,13 <sup>c</sup>	7,13 <sup>b</sup>	6,3 <sup>b</sup>	6,3 <sup>a</sup>	6,09 <sup>b</sup>
		(0,09)	(0,11)	(0,5)	(0,4)	(0,43)

\*EB (enterobacterias), MS (microorganismos aerobios mesófilos), LB (lactobacilos), M+L (levaduras y mohos), PSI (psicrófilos). Superíndices de a-c muestran diferencias significativas en la variable tiempo para una misma columna.

En la figura 1, se muestra la tendencia mencionada, a modo de ejemplo para el caso del recuento de enterobacterias, mostrando la pérdida de calidad microbiológica de la horchata en presencia de timol con el tiempo de almacenamiento.



**Figura 1.** Media e intervalos LSD al 95% de los recuentos microbianos de enterobacterias (EB, log 10 UFC/g) en horchata con incorporación de timol durante el almacenamiento en refrigeración.

En las tablas 4 y 5 se muestran los valores obtenidos en los ensayos con incorporación de vainillina en horchata durante su almacenamiento en refrigeración. En primer lugar, se muestran los resultados para la primera serie experimental, con niveles del compuesto antimicrobiano entre 0-20 mg/mL (tabla 4).

**Tabla 4.** Resultados para la serie experimental 1 del análisis microbiológico de horchata de chufa fresca con vainillina (media del log 10 UFC/g  $\pm$  desviación estándar).

Tiempo (h)	Concentración (mg/ml)	EB*	MS*	LB*	PSI*	M+L*
0	0	4,38 <sup>x</sup> (0,33)	6,31 <sup>a</sup> (0,30)	-	4,47	6,30 <sup>a</sup> (0,12)
	0	6,16 <sup>y</sup> (0,38)	7,06 <sup>a</sup> (0,84)	4,8 <sup>ayz</sup> (0,03)	7,46 (0,03)	6,62 <sup>b</sup> (0,23)
24	2	6,12 <sup>y</sup> (0,49)	6,76 <sup>a</sup> (0,64)	4,86 <sup>ay</sup> (0,01)	6,46	6,21 <sup>b</sup> (0,22)
	5	6,02 <sup>y</sup> (0,13)	6,8 <sup>a</sup> (0,18)	4,96 <sup>az</sup> (0,01)	7,19	6,44 <sup>b</sup> (0,01)
	10	5,02 <sup>y</sup> (0,76)	6,52 <sup>b</sup> (0,78)	4,69 <sup>ax</sup> (0,02)	4,71	5,9 <sup>b</sup> (0,5)
	20	5,18 <sup>y</sup> (0,16)	5,88 <sup>b</sup> (0,54)	4,56 <sup>aw</sup> (0,04)	6,30	5,31 <sup>b</sup> (0,12)
	0	7,48 <sup>z</sup> (0,15)	7,63 <sup>a</sup> (0,02)	6,69 <sup>by</sup> (0,07)	4,46 (0,16)	6,2 <sup>a</sup> (0,4)
72	2	6,54 <sup>z</sup> (0,68)	6,18 <sup>a</sup> (0,04)	5,69 <sup>bx</sup> (0,30)	5,15 (0,18)	5,47 <sup>a</sup>
	5	5,9 <sup>z</sup> (0,55)	6,47 <sup>a</sup>	5,68 <sup>bx</sup> (0,06)	5,24 (0,33)	5,41 <sup>a</sup> (0,09)
	10	-	-	4,46 <sup>bw</sup> (0,06)	4,47	4,46 <sup>a</sup> (0,26)
	20	-	-	4,56 <sup>bw</sup> (0,03)	3,18 (1,83)	4,33 <sup>a</sup> (0,25)

\*EB (enterobacterias), MS (microorganismos aerobios mesófilos), LB (lactobacilos), M+L (levaduras y mohos), PSI (psicrófilos). Superíndices a-d muestran diferencias significativas en los valores por la variable concentración en una misma columna. Superíndices w-z muestran diferencias significativas en los valores por la variable tiempo en una misma columna.

**TABLA 5.** Resultados para la serie experimental 2 del análisis microbiológico de horchata de chufa fresca con vainillina (media del log 10 UFC/g  $\pm$  desviación estándar).

<b>Tiempo (h)</b>	<b>Concentración (mg/ml)</b>	<b>EB*</b>	<b>MS*</b>	<b>LB*</b>	<b>PSI*</b>	<b>M+L*</b>
<b>0</b>	0	-	6,19 (0,05)	5,11 (0,08)	-	5,68 (0,03)
	0	5,9 <sup>a</sup> (0,5)	6,47 <sup>ab</sup>	5,6 (0,2)	6,62 <sup>a</sup> (0,13)	6,35 <sup>b</sup> (0,01)
<b>24</b>	2,5	5,3 <sup>ab</sup> (0,3)	6,2 <sup>a</sup> (0,9)	5,34 <sup>a</sup> (0,11)	6,32 <sup>a</sup> (0,45)	5,44 <sup>a</sup> (0,14)
	5	3,97 <sup>c</sup> (0,10)	6,65 <sup>ab</sup> (0,02)	5,2 <sup>a</sup> (0,2)	6,1 <sup>a</sup> (0,2)	5,7 <sup>ab</sup> (0,3)
	7,5	4,9 <sup>bc</sup> (0,6)	7,3 <sup>ab</sup> (0,2)	5,36 <sup>a</sup> (0,14)	6,02 <sup>a</sup> (0,12)	5,9 <sup>ab</sup> (0,4)
	10	4,35 <sup>bc</sup> (0,14)	7,50 <sup>b</sup> (0,07)	5,28 <sup>a</sup> (0,08)	5,6 <sup>a</sup> (0,8)	6,0 <sup>ab</sup> (0,4)
	0	5,3 <sup>ab</sup> (0,9)	8,34 <sup>a</sup> (0,04)	6,33 <sup>a</sup> (0,01)	8,6 <sup>a</sup> (0,2)	7,4 <sup>d</sup> (0,2)
<b>72</b>	2,5	5,2 <sup>a</sup> (0,4)	6,4 <sup>b</sup> (0,2)	5,5 <sup>a</sup> (0,6)	5,1 <sup>a</sup> (1,9)	5,73 <sup>ab</sup> (0,47)
	5	5,2 <sup>a</sup> (0,3)	6,47 <sup>b</sup>	6,1 <sup>a</sup> (0,5)	4,67 <sup>a</sup> (1,12)	6,03 <sup>bc</sup> (0,2)
	7,5	4,2 <sup>a</sup> (0,2)	6,47 <sup>b</sup>	5,8 <sup>a</sup> (0,7)	5,9 <sup>a</sup> (0,5)	6,47 <sup>c</sup>
	10	4,87 <sup>a</sup> (0,04)	6,47 <sup>b</sup>	5,92 <sup>a</sup> (0,01)	5,6 <sup>a</sup> (0,5)	5,1 <sup>a</sup> (0,3)
	0	-	7,79 <sup>a</sup> (0,19)			7,31 <sup>a</sup> (0,06)
<b>168</b>	2,5	5,24 <sup>a</sup> (0,01)	7,1 <sup>b</sup> (0,2)	5,6 <sup>a</sup> (0,7)	-	6,9 <sup>ab</sup> (0,9)
	5	4,75 <sup>ab</sup> (0,07)	6,94 <sup>b</sup> (0,05)	5,7 <sup>a</sup> (0,2)	-	6,4a <sup>bc</sup> (0,07)
	7,5	4,6 <sup>ab</sup> (0,5)	6,56 <sup>c</sup> (0,01)	5,23 <sup>a</sup> (0,07)	-	6,0 <sup>bc</sup> (0,5)
	10	4,41 <sup>b</sup> (0,13)	6,6 <sup>c</sup> (0,2)	5,0 <sup>a</sup> (0,2)	-	5,5 <sup>c</sup> (0,3)

\*EB (enterobacterias), MS (microorganismos aerobios mesófilos), LB (lactobacilos), M+L (levaduras y mohos), PSI (psicrófilos). Superíndices a-c, para un mismo tiempo de almacenamiento, muestran diferencias significativas en los valores por efecto de la concentración.

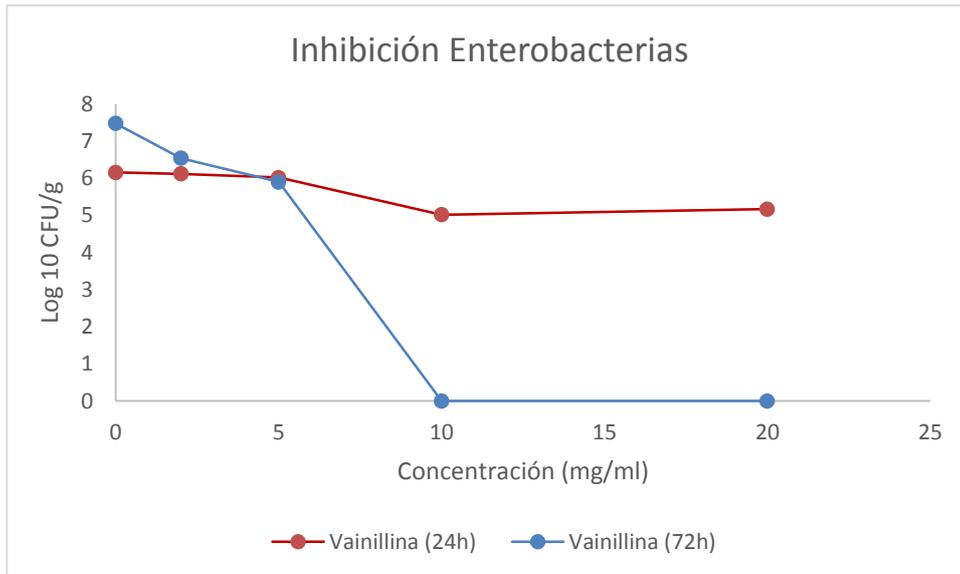
En la tabla 5, se muestra la serie experimental con niveles de concentración en vainillina entre 0-10 mg/mL. Los recuentos de EB, PSI y M+L disminuyeron significativamente al aumentar la presencia de vainillina en la horchata. En MS y LB hay una pérdida significativa de calidad microbiológica con el tiempo de almacenamiento aún en presencia del compuesto antimicrobiano. Estos efectos no son fácilmente describibles puesto que la actividad antimicrobiana de la vainillina depende del tiempo, del medio de cultivo y del microorganismo objeto de estudio.

**TABLA 5.** Resultados para la serie experimental 2 del análisis microbiológico de horchata de chufa fresca con vainillina (media del log 10 UFC/g  $\pm$  desviación estándar).

Tiempo (h)	Concentración (mg/ml)	EB*	MS*	LB*	PSI*	M+L*
0	0	-	6,19 (0,05)	5,11 (0,08)	-	5,68 (0,03)
	0	5,9 <sup>a</sup> (0,5)	6,47 <sup>ab</sup>	5,6 (0,2)	6,62 <sup>a</sup> (0,13)	6,35 <sup>b</sup> (0,01)
24	2,5	5,3 <sup>ab</sup> (0,3)	6,2 <sup>a</sup> (0,9)	5,34 (0,11)	6,32 <sup>a</sup> (0,45)	5,44 <sup>a</sup> (0,14)
	5	3,97 <sup>c</sup> (0,10)	6,65 <sup>ab</sup> (0,02)	5,2 (0,2)	6,13 <sup>a</sup> (0,24)	5,7 <sup>ab</sup> (0,25)
	7,5	4,9 <sup>bc</sup> (0,6)	7,3 <sup>ab</sup> (0,2)	5,36 (0,14)	6,02 <sup>a</sup> (0,12)	5,9 <sup>ab</sup> (0,4)
	10	4,35 <sup>bc</sup> (0,14)	7,50 <sup>b</sup> (0,07)	5,28 (0,08)	5,59 <sup>a</sup> (0,76)	6,0 <sup>ab</sup> (0,4)
	0	5,3 <sup>ab</sup> (0,9)	8,34 <sup>a</sup> (0,04)	6,33 (0,01)	8,62 <sup>a</sup> (0,15)	7,4 <sup>d</sup> (0,2)
72	2,5	5,2 <sup>a</sup> (0,4)	6,4 <sup>b</sup> (0,2)	5,5 (0,6)	5,09 <sup>a</sup> (1,94)	5,73 <sup>ab</sup> (0,47)
	5	5,2 <sup>a</sup> (0,3)	6,47 <sup>b</sup>	6,1 (0,5)	4,67 <sup>a</sup> (1,12)	6,03 <sup>bc</sup> (0,2)
	7,5	4,2 <sup>a</sup> (0,2)	6,47 <sup>b</sup>	5,8 (0,7)	5,9 <sup>a</sup> (0,50)	6,47 <sup>c</sup>
	10	4,87 <sup>a</sup> (0,04)	6,47 <sup>b</sup>	5,92 (0,01)	5,63 <sup>a</sup> (0,54)	5,1 <sup>a</sup> (0,3)
	0	-	7,79 <sup>a</sup> (0,19)			7,31 <sup>a</sup> (0,06)
168	2,5	5,24 <sup>a</sup> (0,01)	7,1 <sup>b</sup> (0,2)	5,6 (0,7)	-	6,9 <sup>ab</sup> (0,9)
	5	4,75 <sup>ab</sup> (0,07)	6,94 <sup>b</sup> (0,05)	5,7 (0,2)	-	6,4a <sup>bc</sup> (0,07)
	7,5	4,6 <sup>ab</sup> (0,5)	6,56 <sup>c</sup> (0,01)	5,23 (0,07)	-	6,0 <sup>bc</sup> (0,5)
	10	4,41 <sup>b</sup> (0,13)	6,6 <sup>c</sup> (0,2)	5,0 (0,2)	-	5,5 <sup>c</sup> (0,3)

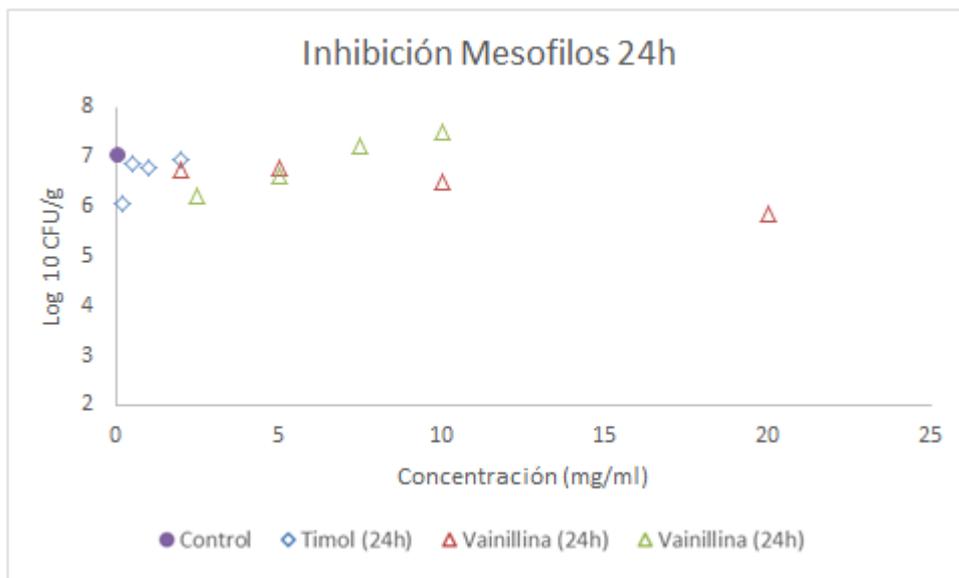
\*EB (enterobacterias), MS (microorganismos aerobios mesófilos), LB (lactobacilos), M+L (levaduras y mohos), PSI (psicrófilos). Superíndices a-c, para un mismo tiempo de almacenamiento, muestran diferencias significativas en los valores por efecto de la concentración.

En las siguientes figuras describimos el comportamiento de los distintos microorganismos ante la presencia de vainillina y a distintos tiempos. En la figura 2 podemos observar que para enterobacterias a las 24h un descenso del recuento por efecto de la concentración, mientras que a las 72h se produce un descenso más acusado a una misma concentración del compuesto.



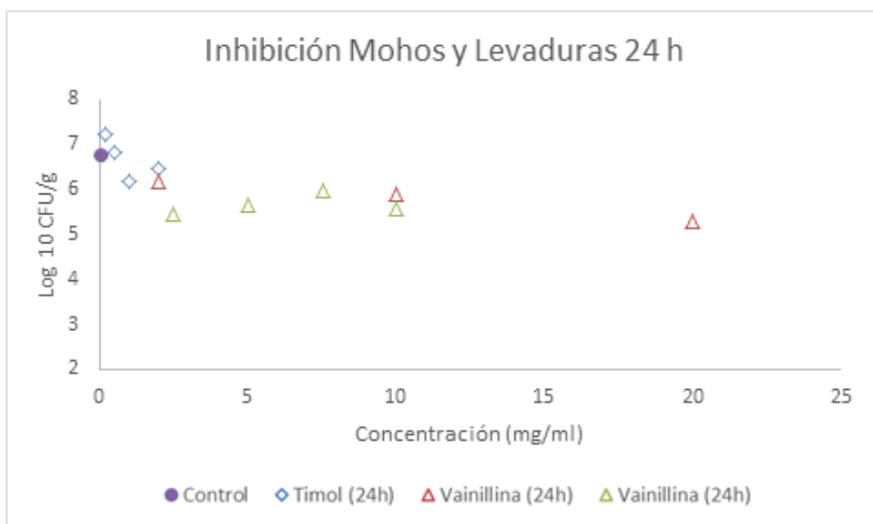
**Figura 2.** Efecto inhibitorio de las distintas concentraciones de vainillina en los recuentos microbianos de enterobacterias (log 10 UFC/g ± desviación estándar) a las 24 y 72 horas.

Para los microorganismos –figura 3- aerobios mesófilos, el resultado obtenido en la muestra control es de 6,31 log 10 UFC, avanzando hasta 7,63 tras 72 horas. Adicionando 10mg/ml de vainillina, conseguimos que a las 72 horas se mantenga en un valor de 7,5. De forma que para los aerobios mesófilos a medida que se incrementa la concentración de vainillina, disminuye el crecimiento de dichos microorganismos.



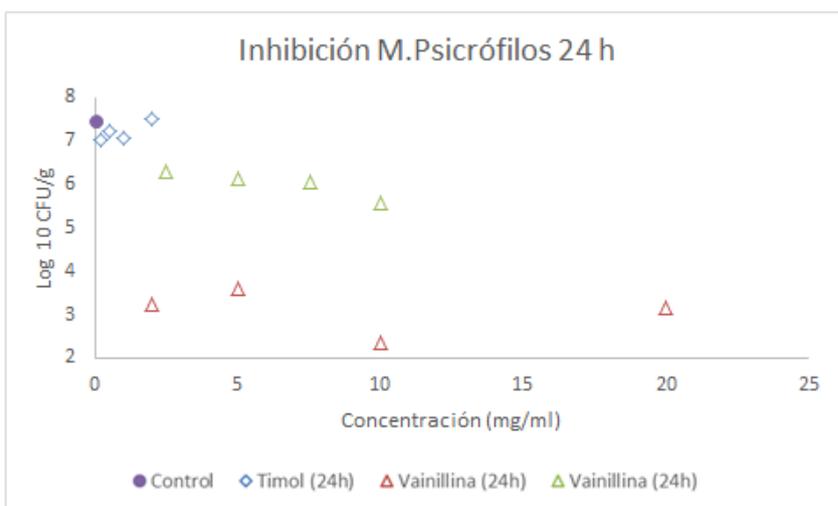
**Figura 3.** Efecto inhibitorio de la incorporación de distintas concentraciones de timol y vainillina en los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos (log 10 UFC/g ± desviación estándar) a las 24 horas.

Por lo que respecta a los mohos y levaduras, al inicio la muestra control presenta 6,30 log 10 UFC, incrementándose hasta 6,78 pasadas 24 horas. En la figura 4, vemos que con la incorporación de 10mg/ml de vainillina no conseguimos la disminución de los valores.



**Figura 4.** Efecto inhibitorio de la incorporación de distintas concentraciones de timol y vainillina en los recuentos de mohos y levaduras (log 10 UFC/g  $\pm$  desviación estándar) a las 24 horas.

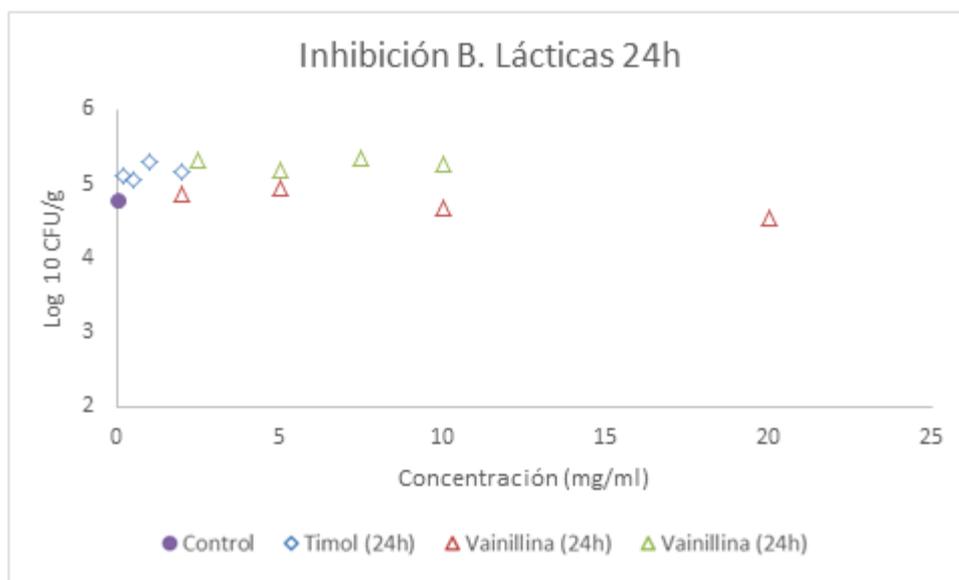
La figura 5 permite ver el efecto inhibitorio de la incorporación de la vainillina sobre los microorganismos psicrófilos, puesto que a medida que incrementamos su concentración disminuyen los recuentos, que a su vez son en todos los casos inferiores a la muestra control.



**Figura 5.** Efecto inhibitorio de la incorporación de distintas concentraciones de timol y vainillina en los recuentos de microorganismos psicrófilos (log 10 UFC/g  $\pm$  desviación estándar) a las 24 horas.

Por último, para las bacterias ácido lácticas no se observan en ninguno de los tiempos estudiados diferencias significativas entre las muestras a las

que se les ha incorporado el compuesto bioactivo (timol o vainillina) y las muestras control. La figura 6, permite ver dicho efecto para tiempo 24 horas.



**Figura 6.** Efecto inhibitorio de la incorporación de distintas concentraciones de timol y vainillina en los recuentos de bacterias ácido lácticas (log 10 UFC/g  $\pm$  desviación estándar) a las 24 horas.

### 3.3. Actividad antimicrobiana de vainillina frente a *Escherichia coli* y *Listeria innocua* presente en horchata de chufa

Los productos frescos de origen vegetal pueden ser un vehículo para la transmisión de patógenos bacterianos que inducen enfermedades humanas, como por ejemplo *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. Estos pueden contaminarse durante su recolección o procesamiento. Las fuentes potenciales de contaminación incluyen el suelo, el agua, las heces de origen humano y animal, el equipo de cosecha, el transporte y el procesamiento (Berthold-Pluta et al., 2017).

Algunos autores, han llevado a cabo estudios similares en otros productos vegetales. Simforian et al., (2015) en experiencias realizadas sobre zumos de fruta fresca, observaron que el recuento total en las placas osciló entre 2,32 y 8,54 (Log UFC / ml), y alrededor del 72,2% de las muestras de zumo tenían recuentos superiores a los recomendados por el Codex. Concretamente, la prevalencia de *Escherichia coli* en los zumos fue del 80% con un rango entre 0,0 y 5,0 (log MPN / ml).

En los últimos años, el porcentaje de intoxicaciones alimentarias inducidas por el consumo de zumos y otros productos derivados contaminados en la UE se situó en el 7,1% en 2014 (EFSA, 2015). Con el objetivo de reducir el riesgo de dichas intoxicaciones alimentarias, a la vez que aumentar la vida útil de la horchata de chufa fresca, en este trabajo se han aplicado diferentes concentraciones del compuesto antimicrobiano vainillina, obteniendo los siguientes resultados microbiológicos mostrados en las tablas 4 y 5.

TABLA 6. Efecto de las diferentes concentraciones de vainillina frente diferentes densidades de inóculo de *Listeria innocua*. Medias (log 10 UFC/g) de las dos replicas ± desviación estándar.

Densidad de inóculo	Tiempo (h)	Concentración de vainillina (mg/g)			
		0	4	8	16
$10^2$	0	1,13 (0,03)			
	24	0,79 (0,02)	2,15 (0,13)	2,21 (0,21)	1,96 (0,13)
	72	1,06 (0,11)	0,96 (0,08)	0,96 (0,016)	0,85 (0,06)
$10^4$	0	2,99 (0,010)			
	24	2,85 (0,10)	2,79 (0,13)	2,62 (0,03)	2,76 (0,013)
	72	3,00 (0,08)	2,70 (0,05)	2,71 (0,16)	2,57 (0,10)

Para el caso de *Listeria innocua*, vemos que a medida que aumenta la concentración de vainillina, la tendencia es la disminución de los recuentos obtenidos. Por ejemplo, durante los recuentos llevados a cabo en tiempo 24 horas, vemos que para la densidad de inóculo de  $10^4$ , a medida que incrementamos la concentración de vainillina, disminuyen los valores (log 10 UFC/g) desde  $2,85 \pm 0,10$  en la muestra control (sin vainillina) hasta  $2,76 \pm 0,013$  para 16mg/ml de vainillina incorporados.

TABLA 7. Efecto de las diferentes concentraciones de vainillina frente diferentes densidades de inóculo de *Escherichia Coli*. Medias (log 10 UFC/g) de las dos replicas ± desviación estándar.

Densidad de inóculo	Tiempo (h)	Concentración de vainillina (mg/g)			
		0	4	8	16
$10^2$	0	2,02 (0,03)			
	24	1,92 (0,16)	1,71 (0,01)	1,72 (0)	1,34 (0,02)
	72	1,89 (0,07)	-	-	-
$10^4$	0	3,46 (0,016)			
	24	3,47 (0)	3,50 (0,01)	3,35 (0,16)	3,39 (0,06)
	72	4,06 (0)	2,37 (0)	2,27 (0,07)	2,11 (0,01)

En el caso de *Escherichia Coli*, también se observa dicha tendencia de descenso a las 24 horas, en ambas densidades de inóculo ( $10^2$  y  $10^4$ ), vemos que se produce una disminución en los valores (log 10 UFC/g). Para densidad de inóculo  $10^2$  se produce una disminución de los valores desde  $1,92 \pm 0,16$  en la muestra control, hasta  $1,34 \pm 0,02$  en la muestra con incorporación de 16mg/ml de vainillina. Para la densidad de inóculo de  $10^4$  se produce una disminución de los valores desde  $3,47 \pm 0$  en la muestra control, hasta  $3,39 \pm 0,06$  en la muestra a la que se le han adicionado 16mg/ml de vainillina.

## 4. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha planteado el uso de compuestos naturales para la estabilización de horchata como alternativa a los tratamientos térmicos habituales, mostrándose que se trata de un procesamiento no térmico alternativo útil y con buenas perspectivas de futuro. La aplicación de vainillina, podría resultar beneficiosa para la retención de la calidad microbiológica del producto estudiado y en los intervalos de concentración aplicados. Los ensayos realizados con timol no mostraron un claro efecto inhibitor en el intervalo de concentraciones ensayado para este compuesto. Sin embargo, la incorporación de vainillina proporcionó mayor estabilidad microbiológica a las muestras de horchata de chufa durante el almacenamiento. Esto se evidenció por los menores recuentos microbianos en las muestras a las que se le incorporó vainillina, en comparación con las muestras control.

## 5. REFERENCIAS

- Abril Gisbert, B. (2015). Desarrollo de sistemas microestructurados de sílice como soporte con función antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*. TFG-ETSIAMN (UPV) Disponible on line: <http://hdl.handle.net/10251/54185>
- Bado, S., Bazongo, P., Son, G., Kyaw, M. T., Forster, B. P., Nielen, S., ... & Bassolé, I. H. N. (2015). Physicochemical characteristics and composition of three morphotypes of *Cyperus esculentus* tubers and tuber oils. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2015.
- Berthold-Pluta, A., Garbowska, M., Stefańska, I., & Pluta, A. (2017). Microbiological quality of selected ready-to-eat leaf vegetables, sprouts and non-pasteurized fresh fruit-vegetable juices including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiology*, 65, 221-230.
- BOE (1988). Real Decreto 1338/1988, de 28 de octubre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración y Venta de Horchata de Chufa.
- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antimicrobial properties and potential applications in food – A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94:223–253.
- Codina Torella I, Guamis B, Trujillo AJ (2015). Characterization and comparison of tiger nuts (*Cyperus esculentus* L.) from different geographical origin: physico-chemical characteristics and protein fractionation. *Industrial Crops and Products*, 65, 406-414.
- Codina Torella, I., Trujillo Mesa, A. J., & Guamis López, B. (2014). Optimización del proceso de elaboración y aplicación de la homogenización a ultra alta presión como tecnología de conservación de licuado de chufa.
- Codina-Torrella, I., Guamis, B., Ferragut, V., & Trujillo, A. J. (2017). Potential application of ultra-high pressure homogenization in the physico-chemical stabilization of tiger nuts' milk beverage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 40, 42-51.
- Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Campaniello, D., D'Amato, D., Speranza, B., & Sinigaglia, M. (2009). Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches—a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(2), 223-241.

- Cortés Fenollar, C. (2007). Estudio de parámetros nutritivos y de calidad en alimentos líquidos de origen vegetal procesados por tecnologías no térmicas. Tesis Doctoral en Farmacia. Universidad de Valencia. 368 pp.
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Gasson, M. J., & Narbad, A. (2005). Structure– Function Analysis of the Vanillin Molecule and Its Antifungal Properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(5), 1769-1775.
- Fitzgerald, D. J., Stratford, M., Gasson, M. J., Ueckert, J., Bos, A., & Narbad, A. (2004). Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. *Journal of applied microbiology*, 97(1), 104-113.
- López-Cortés, I., Salazar-García, D. C., Malheiro, R., Guardiola, V., & Pereira, J. A. (2013). Chemometrics as a tool to discriminate geographical origin of *Cyperus esculentus* L. based on chemical composition. *Industrial Crops and Products*, 51, 19-25.
- Marulanda Botero, A. M., & Pérez Acosta, J. C. (2007). Evaluación técnica y aceptación del mercado de dos nuevos productos a base de soya: leche de soya y semillas de soya tostadas, procesadas por la microempresa ZOHAR (Bachelor's thesis, Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira).
- Mújica-Paz, H.; Valdez-Fragoso, A.; Samson, C. T.; Welti-Chanes, J.; Torres, J. A. 2011. High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6):969.
- Obaidat, M. M., Alu'Datt, M. H., Salman, A. E. B., Obaidat, H. M., Al-Zyoud, A. A., Al-Saleh, O. K., & Abu Al'anaz, B. (2015). Inactivation of nondesiccated and desiccated *Cronobacter Sakazakii* and *Salmonella* spp. at low and high inocula levels in reconstituted infant milk formula by vanillin. *Food Control*, 50, 850-857.
- Oms-Oliu, G.; Martín-Belloso, O.; Soliva-Fortuny, R. 2010. Pulsed light treatments for food preservation. A review. *Food and Bioprocess Technology*, 3(1):13.
- Papafotopoulou-Patrinou, E.; Gialleli, A. I.; Kallis, M.; Plessas, S.; Alexopoulos, A.; Mantzourani, I.; Bezirtzoglou, E.; Bekatorou, A.; Kanellaki, M.; Koutinas, A. A. 2016. Microbiological assessment of tubular cellulose filters used for liquid foods cold pasteurization. *LWT-Food Science and Technology*, 67:151-158.
- Reyes-Jurado, F., Franco-Vega, A., Ramírez-Corona, N., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). Essential oils: antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling. *Food Engineering Reviews*, 7(3), 275-297.
- Ribes, S., Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Fuentes, A., Talens, P., Martínez-Máñez, R., & Barat, J. M. (2017). Eugenol and thymol immobilised on mesoporous silica-based material as an innovative antifungal system: application in strawberry jam. *Food Control*.
- Ruiz-Rico, M., Pérez-Esteve, É., Bernardos, A., Sancenón, F., Martínez-Máñez, R., Marcos, M. D., & Barat, J. M. (2017). Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles. *Food Chemistry*, 233, 228-236.
- Ruiz-Rico, M.; Pérez-Esteve, É.; Bernardos, A.; Sancenón, F.; Martínez-Máñez, R.; Marcos, M. D.; Barat, J. M. 2017. Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles. *Food Chemistry*, 233: 228–236.
- Ruiz-Rico, M., Daubenschütz, H., Pérez-Esteve, É., Marcos, M. D., Amorós, P., Martínez-Máñez, R., & Barat, J. M. (2016). Protective effect of mesoporous silica particles on encapsulated folates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 105, 9-17.

- Sánchez-Zapata, E., Fernández-López, J., & Angel Pérez-Alvarez, J. (2012). Tiger nut (*Cyperus esculentus*) commercialization: health aspects, composition, properties, and food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(4), 366-377.
- Sebastia, N., El-Shenawy, M., Manes, J., & Soriano, J. M. (2012). Assessment of microbial quality of commercial and home-made tiger-nut beverages. *Letters in applied microbiology*, 54(4), 299-305.
- Simforian, E., Nonga, H. E., & Ndabikunze, B. K. (2015). Assessment of microbiological quality of raw fruit juice vended in Dar es Salaam City, Tanzania. *Food Control*, 57, 302-307.