

Rev. Cienc. Tecnol.

Año 10 / N° 10b / 2008 / 15-19

EFFECTOS DE DIFERENTES FACTORES DE ESTRÉS SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN MANDIOCA PRESERVADA

Luis A. Brumovsky, Raquel M. Fretes

EFFECTS OF DIFFERENT STRESS FACTORS ON THE SURVIVAL OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN CASSAVA ROOTS PRESERVED BY HURDLE TECHNOLOGY

ABSTRACT

The effect of the combination of the following stress factors was studied: reduction of water activity ($a_w = 0.95$), pH decrease (4.0 and 4.5) and potassium sorbate and sodium benzoate addition (0, 400, 800 and 1200 ppm) on the survival of *Staphylococcus aureus* in cassava roots preserved by hurdle technology.

In all the experiences, the number of cells during the storage was reduced, until an "auto-sterilisation" effect was achieved. It was observed that in cassava roots preserved by this methodology ($a_w=0.95$ and $pH=4.0$), concentration of preservatives of 800 ppm was convenient. Under these conditions, the inoculum was destroyed after a period of 2 to 3 days. At pH 4.5, a more significant stressant effect was obtained with 1200 ppm of preservatives, and 5 days were necessary to destroy the inoculum.

KEY WORDS: Hurdle technology, Cassava, *Staphylococcus aureus*.

RESUMEN

Se estudió el efecto de la combinación de los siguientes factores de estrés: reducción de la actividad acuosa ($a_w=0.95$), disminución del pH (4,0 y 4,5) y adición de sorbato de potasio y benzoato de sodio (0, 400, 800 y 1200 ppm) sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus* en raíces de mandioca preservadas por tecnología de obstáculos.

En todas las experiencias, se redujo el número de células durante el almacenamiento hasta lograr una "auto-esterilización". Se observó que en raíces de mandioca preservadas por esta metodología, a una $a_w=0.95$ y un $pH=4.0$; es conveniente utilizar 800 ppm de conservantes. En estas condiciones, se produce la destrucción del inóculo entre los 2 y 3 días. A pH 4,5, el efecto estresante más significativo, se obtuvo con 1200 ppm de conservantes, requiriéndose 5 días para destruir el inóculo.

PALABRAS CLAVE: Tecnología de obstáculos, Mandioca, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCCIÓN

En la provincia de Misiones, se producen anualmente, alrededor de 140.000 toneladas de raíces de mandioca, destinadas al uso alimentario y a la fabricación de fécula. Desafortunadamente, el tiempo máximo de conservación de la raíz, luego de la cosecha, es muy corto, aproximadamente 2 a 3 días, produciéndose a continuación 2 tipos de deterioro, conocidos como: deterioro primario o "vascular streaking", asociado con procesos fisiológicos endógenos [1] y deterioro secundario, debido a la acción de microorganismos [2]. Luego de este período, la raíz se vuelve inaceptable, tanto para el consumo humano, como para el uso industrial [3].

Estos deterioros, constituyen un serio problema para el consumo del producto fresco, por lo que el mercado se ve reducido a zonas cercanas a la de producción, ya que la raíz se deteriora durante su distribución y/o comercialización. Por lo tanto una solución sencilla y económica a este problema, podría ser la preservación de las raíces utilizando "Tecnología de Obstáculos".

Al desarrollar un nuevo producto, como es el caso de mandioca preservada por tecnología de obstáculos,

es necesario evaluar los riesgos microbiológicos. Esto es importante, si se cuenta con escasa información sobre la conducta del microorganismo y su respuesta de crecimiento o inhibición en las condiciones del alimento en cuestión. Es posible entonces, que la aplicación del reto microbiano (inoculación y prueba), pueda proveer esta información básica y necesaria. Una bacteria patógena capaz de resistir valores de a_w reducidos es *Staphylococcus aureus*, que podría contaminar el producto durante el procesamiento y representar un problema en el modelo de conservación propuesto.

El objetivo del presente trabajo fue investigar la respuesta de la combinación de varios factores de estrés (a_w , pH y conservantes) sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus* inoculado en raíces de mandioca conservada por Tecnología de Obstáculos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Raíz de mandioca: (Manihot esculenta Crantz), variedad blanca, procedente de Gobernador Roca, Misiones, Argentina.

Aditivos: Jarabe de maíz, sorbato de potasio, benzoato de sodio y ácido cítrico, todos de grado alimenticio. Cloruro de sodio de grado analítico.

Microorganismo: *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 de la colección de cultivos de Pennsylvania State University. Estados Unidos.

Determinación del contenido de agua y pH: El contenido de agua de las raíces de mandioca se determinó gravimétricamente por secado en estufa de aire a $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. El pH de las muestras de jarabe y de las raíces de mandioca se determinó mediante un medidor de pH marca ORION modelo SA 210.

Preparación del inóculo: Se preparó por repique de una colonia de *Staphylococcus aureus*, proveniente de un cultivo en placa con agar Baird–Parker en 10 ml de caldo infusión cerebro corazón, el cual se incubó a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 20 horas, con el fin de alcanzar una concentración de bacterias comprendida entre 10^{10} y 10^{11} ufc/ml. La concentración de la suspensión fue chequeada realizando el conteo en placas de Petri con agar Baird–Parker, por siembra en superficie de 0,1 ml. Las distintas diluciones se realizaron en agua peptonada estéril al 0,1 %.

Recuento de *Staphylococcus aureus*: Jarabe: método de recuento en placa de Petri por siembra en superficie de 0,1 ml del jarabe. Mandioca: método de recuento en placa de Petri por siembra en superficie de 0,1 ml de un homogenato de raíz de mandioca con agua peptonada estéril al 0,1 %. Las diluciones en ambos casos se realizaron con agua peptonada estéril al 0,1 %. El medio de cultivo utilizado fue agar Baird–Parker, con el agregado de yema de huevo y telurito. Se incubaron 36 ± 2 horas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Análisis estadístico: Para estudiar el efecto del pH y la concentración de conservantes en un medio de aw reducida, se utilizó un diseño factorial de dos factores sin repeticiones, realizándose 8 experiencias: Exp. 1 (pH = 4,0 y 1200 ppm de conservantes); Exp. 2 (pH = 4,0 y 800 ppm de conservantes); Exp. 3 (pH = 4,0 y 40 ppm de conservantes); Exp. 4 (pH = 4,0 y 0 ppm de conservantes); Exp. 5 (pH = 4,5 y 1200 ppm de conservantes); Exp. 6 (pH = 4,5 y 800 ppm de conservantes); Exp. 7 (pH = 4,5 y 400 ppm de conservantes) y Exp. 8 (pH = 4,5 y 0 ppm de conservantes). En todos los casos la aw se redujo a 0,95 utilizando cloruro de sodio y jarabe de maíz. La temperatura de almacenamiento fue $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Preparación de las experiencias: a) Se preparó el jarabe adicionando la cantidad suficiente de los agentes humectantes, para obtener la actividad acuosa de 0,95; luego se agregaron los conservantes (en todos los casos 50 % sorbato de potasio y 50 % de benzoato de sodio) Este jarabe se esterilizó por filtración con membrana (tamaño de poro $0,45 \mu\text{m}$) y se colocó en recipientes de vidrio estériles con tapa. b) Se utilizaron raíces con diámetros de aproximadamente 4 cm y se lavaron con agua potable. Después se sumergieron durante 5 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (200 ppm). c) Se extrajo la cáscara

y se las cortó en trozos de 5 cm de longitud. Luego se pesaron 200 g $\pm 0,01$ g de raíces. d) Se sumergieron estas raíces durante 5 minutos, en una solución de hipoclorito de sodio (150 ppm), luego se enjuagaron con abundante agua destilada estéril y se adicionaron al jarabe preparado en el punto (a). e) Se ajustó el pH de las 8 formulaciones con solución de ácido cítrico (40 % p/v) hasta estabilizarlo al valor de diseño de cada experiencia. f) Después de alcanzado el equilibrio, se inoculó con 0,3 ml del caldo infusión cerebro corazón con las cepas de *Staphylococcus aureus*. La concentración inicial del inóculo se verificó por recuento en placa.

Las cantidades de raíz de mandioca, cloruro de sodio y jarabe de maíz requeridas para producir una aw de 0,95 se calcularon a partir de balances de masa; donde la aw del jarabe de maíz se determinó a partir de un gráfico realizado por Chirife [4], la aw del cloruro de sodio se calculó por medio de la ecuación de Pitzer [5] y la aw de equilibrio del sistema se calculó utilizando la ecuación de Ross [6]:

$$aw_{\text{equilibrio}} = (aw)_{\text{Cloruro de sodio}} \times (aw)_{\text{JM}} \times (aw)_{\text{mandioca}}$$

donde $(aw)_{\text{Cloruro de sodio}}$ es la actividad de agua de la solución de cloruro de sodio (0,96); $(aw)_{\text{JM}}$ es la actividad de agua del jarabe de maíz (0,99) y $(aw)_{\text{mandioca}}$ es la actividad de agua de la raíz de mandioca fresca, a los fines prácticos, se consideró igual a 1. Los valores de aw predichos en las formulaciones, se chequearon experimentalmente utilizando un higrómetro modelo Decagon CX–1 (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA). La relación “peso del jarabe / peso de raíz de mandioca” en todas las experiencias fue de 1,74.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El pH del jarabe de todas las experiencias se fue incrementando durante el almacenamiento, obteniéndose el mínimo incremento de 0,12 unidades de pH en la experiencia 2 y el máximo incremento de 0,38 unidades de pH en la experiencia 8.

Los recuentos de *Staphylococcus aureus* en las distintas experiencias del jarabe y la mandioca se indican en la Figura 1. Se utilizó un análisis de regresión lineal para ajustar el log (N/No) en el jarabe y el log del número de células sobrevivientes en la mandioca versus tiempo, resultando el ajuste muy significativo en todos los casos ($p < 0,01$). Los valores de los coeficientes de determinación se indican en la correspondiente figura.

En la Tabla 1 se presentan los valores de las pendientes calculadas a partir de regresión lineal con los datos de las Figura 1–4 (Jarabe y mandioca). En las mismas, se indican también, los valores de los límites superior e inferior de cada intervalo de confianza (95 %); los mismos fueron calculados mediante la prueba de Student.

Efectuando una comparación entre los valores de las pendientes y sus intervalos de confianza (95 %) de la Tabla 1, para el jarabe, se puede inferir lo siguiente:

A pH = 4,0 no existe diferencia significativa entre las pendientes de las experiencias 1 (1200) y 2 (800) ni entre las experiencias 3 (400) y 4 (0 ppm). En cambio se observan diferencias significativas entre las pendientes de las experiencias 1 (1200) y 3 (400); 1 (1200) y 4 (0 ppm); 2 (800) y 3 (400); y 2 (800) y 4 (0 ppm).

A pH = 4,5 se observa que no existen diferencias significativas entre las pendientes de las experiencias 6 (800) y 7 (400). En cambio se aprecian diferencias significativas entre las pendientes de las experiencias 5 (1200) y 6 (800); 5 (1200) y 8 (0 ppm); y entre las experiencias 6 (800) y 8 (0 ppm).

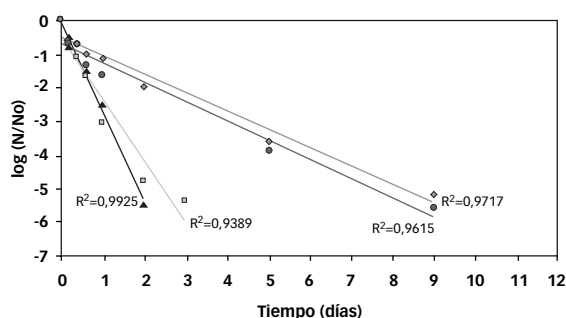


FIGURA 1. Efecto de los factores de estrés: conservantes (sorbato de potasio y benzoato de sodio) a una $a_w = 0,95$ y un pH = 4,0 sobre el conteo de células sobrevivientes de *S. aureus* en el jarabe. Referencias: ▲ 1200 ppm, — predicho (1200 ppm); □ 800 ppm, — predicho (800 ppm); ● 400 ppm, — predicho (400 ppm); ◆ control, — predicho (control).

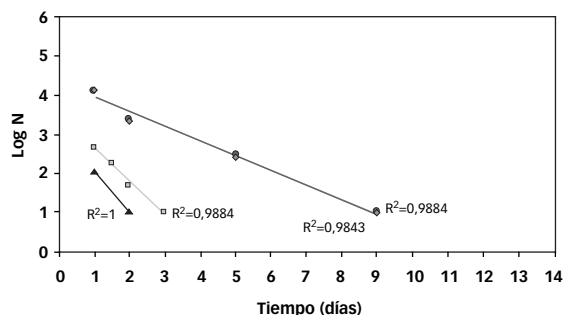


FIGURA 3. Efecto de los factores de estrés: conservantes (sorbato de potasio y benzoato de sodio) a una $a_w = 0,95$ y un pH = 4,0 sobre el conteo de células sobrevivientes de *S. aureus* en la mandioca. Referencias: ▲ 1200 ppm, — predicho (1200 ppm); □ 800 ppm, — predicho (800 ppm); ● 400 ppm, — predicho (400 ppm); ◆ control, — predicho (control).

Efectuando una comparación entre las pendientes de las experiencias a diferentes valores de pH se puede ver que no existen diferencias significativas entre las pendientes de las experiencias 3 (400), 4 (0 ppm) a pH = 4,0 y las experiencias 6 (800), 7 (400), 8 (0 ppm) a pH = 4,5. En cambio se observan diferencias significativas entre la experiencia 2 (pH = 4,0–800) y la 5 (pH = 4,5–800).

La mayor inhibición en el jarabe se presenta en las experiencias 1 (pH = 4,0–1200 ppm) y la 2 (pH = 4,0–800), presentando estas dos experiencias, equivalente efecto estresante en la disminución del número de células supervivientes. Es decir, a pH = 4,0 no habría diferencia en utilizar 1200 ppm de conservantes que 800 ppm.

Efectuando un análisis similar (comparación de valores de pendientes y sus correspondientes intervalos de con-

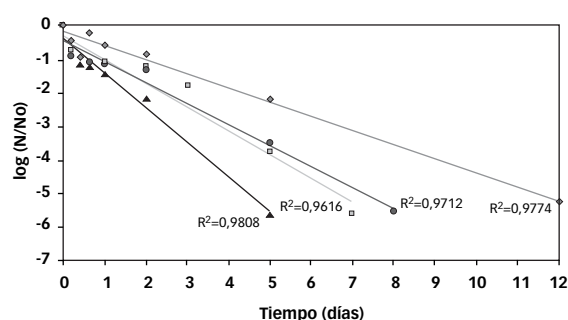


FIGURA 2. Efecto de los factores de estrés: conservantes (sorbato de potasio y benzoato de sodio) a una $a_w = 0,95$ y un pH = 4,5 sobre el conteo de células sobrevivientes de *S. aureus* en el jarabe. Referencias: ▲ 1200 ppm, — predicho (1200 ppm); □ 800 ppm, — predicho (800 ppm); ● 400 ppm, — predicho (400 ppm); ◆ control, — predicho (control).

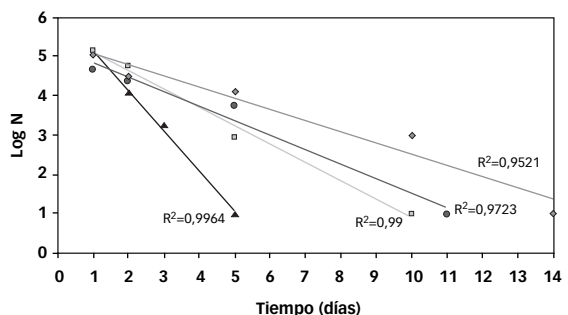


FIGURA 4. Efecto de los factores de estrés: conservantes (sorbato de potasio y benzoato de sodio) a una $a_w = 0,95$ y un pH = 4,5 sobre el conteo de células sobrevivientes de *S. aureus* en la mandioca. Referencias: ▲ 1200 ppm, — predicho (1200 ppm); □ 800 ppm, — predicho (800 ppm); ● 400 ppm, — predicho (400 ppm); ◆ control, — predicho (control).

Tabla 1. Valor promedio de la pendiente, error estándar (Sb), límites máximo (Ls) y mínimo (Li) del intervalo de confianza (95 %) de dicha pendiente, para el jarabe y mandioca de cada experiencia.

Exp.	pH-ppm	Jarabe				Mandioca			
		Pendiente	Sb	Ls	Li	Pendiente	Sb	Ls	Li
1	4,0–1200	-2,679	0,114	-2,363	-2,995	-1,041	—	—	—
2	4,0–800	-1,850	0,210	-1,267	-2,433	-0,862	0,066	-0,578	-1,146
3	4,0–400	-0,574	0,047	-0,459	-0,689	-0,375	0,029	-0,250	-0,500
4	4,0–0	-0,547	0,038	-0,454	-0,640	-0,373	0,033	-0,231	-0,515
5	4,5–1200	-1,031	0,064	-0,866	-1,196	-1,015	0,043	-0,829	-1,202
6	4,5–800	-0,704	0,060	-0,562	-0,846	-0,469	0,033	-0,327	-0,611
7	4,5–400	-0,620	0,043	-0,515	-0,725	-0,368	0,044	-0,179	-0,557
8	4,5–0	-0,414	0,026	-0,350	-0,478	-0,283	0,037	-0,165	-0,401

fianza) de la Tabla 1, para la mandioca, se puede observar que a pH = 4,0 no existen diferencias significativas entre la pendiente de la experiencia 1 (1200) y la 2 (800) y entre la 3 (400) y 4 (control A). Sin embargo se observan diferencias significativas entre las experiencias 2 (800); 3 (400) y 4 (0 ppm). A pH = 4,5 se observa diferencias significativas entre la experiencia 5 (1200) y las experiencias 6 (800); 7 (400) y 8 (0 ppm). Sin embargo no se presentaron diferencias significativas entre las experiencias 6 (800); 7 (400) y 8 (0 ppm).

Si se observan los resultados, para diferentes valores de pH, se puede inferir que no existen diferencias significativas entre las pendientes de las experiencias efectuadas con concentraciones de 400, 800 y 1200 entre ambos valores de pH. Tampoco se observan diferencias significativas entre las pendientes de la experiencia 2 (pH = 4,0–800 ppm) y la experiencia 5 (pH = 4,5 –1200 ppm), lo que significa que estas dos últimas experiencias tendrían equivalente efecto estresante sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus*.

CONCLUSIONES

En todas las experiencias se redujo el número de células de *Staphylococcus aureus* durante el almacenamiento, hasta lograr un efecto de “auto-esterilización” el que fuera reportado por Leistner [7].

Los resultados, indicaron que en formulaciones de mandioca preservadas por esta metodología a una $a_w = 0,95$ y un pH de diseño igual a 4,0; es conveniente utilizar una concentración de 800 ppm de conservantes en vez de 1200 ppm (sorbato de potasio y benzoato de sodio; 50:50). Esto se cumplió tanto para el jarabe como para la mandioca. Además, a este pH, se produce la destrucción del inóculo en el jarabe y en la mandioca entre los 2 y 3 días. A las otras concentraciones estudiadas y al mismo pH, las cepas de *Staphylococcus aureus* sobrevivieron 9 días en el jarabe y la mandioca. Por lo tanto, la destrucción del inóculo, sigue el mismo patrón en el jarabe y en la raíz a pH 4,0 y a los 4 niveles de concentración de conservantes estudiados.

A pH 4,5 y con 1200 ppm de conservantes, se obtuvo un efecto estresante más significativo que a las otras concentraciones estudiadas; esto se observó en el jarabe como en la raíz de mandioca. Por lo tanto, en formulaciones de pH = 4,5 la concentración de 1200 ppm sería la más adecuada. En estas condiciones, se requirió 5 días para destruir el inóculo del jarabe y mandioca. A las concentraciones menores, en la raíz de mandioca se requirieron entre 10 y 14 días para destruir el inóculo.

Lista de Abreviaturas

- a_w Cloruro de sodio = actividad de agua de la solución de

cloruro de sodio

- a_{wJM} = actividad de agua del jarabe de maíz
- a_w mandioca = actividad de agua de la raíz de mandioca fresca
- ppm = partes por millón
- N = número de células sobrevivientes en la mandioca
- No = número de células iniciales en la mandioca
- %p/v = %peso / volumen
- ufc/ml = unidades formadoras de colonias/mililitro

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Noon, R. A. and Booth, R. M. Nature of post-harvest deterioration of cassava roots. Transaction of the British Mycological Society. Vol 69: p. 287–290.1977.
2. Booth, R. H. Storage of fresh cassava (*Manihot esculenta*). I. Post-harvest deterioration and its control. Expl. Agric. Vol 12: p. 103–111.1976.
3. Wenham, J. E. Post-harvest deterioration of cassava. A biotechnology perspective. Natural Resources Institute. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Chapter 1 and 2.1995.
4. Chirife, J. Principios de la deshidratación osmótica de frutas. Anales Asociación. Química Argentina, 70. p. 913–932.1982.
5. Pitzer, K. S. Thermodynamics of electrolytes. I. Theoretical basis and general equations. J. Phys. Chem. 77, p. 268.1973.
6. Ross, K. D. Estimation of water activity in intermediate moisture foods. Food Technol. 29 (3), p. 26–30.1975.
7. Leistner, L. Principles and applications of hurdle technology. New Methods of Food Preservation. Edited by Gould, G. W. Blackie Academic & Profesional. Chapter 1. 1995.

Recibido: 24/08/07.

Aprobado: 05/11/07.

- Luis Alberto Brumovsky

Ingeniero Químico (1986) FCEQyN. UNaM. Magíster en Tecnología de los Alimentos (2004) FCEQyN. UNaM. Doctor en Ciencias Técnicas (2008). Universidad “Martha Abreu” de Las Villas. Cuba. Profesor Adjunto Cátedras de: Bromatología y Nutrición, Introducción a la Ciencias de los Alimentos y Química y Bioquímica de los Alimentos. FCEQyN. UNaM. Categoría III del Programa Nacional de Incentivo. Director de proyectos de Investigación.

- Raquel María Fretes

Bioquímica. FCEQyN, UNAM (1987). Docente de las Cátedras: Química y Bioquímica de la Carrera de Enfermería FCEQyN desde 1994 y Procesos Biológicos, Psicológicos y Sociales en el Cuidado Humano desde 2006. Integrante de Grupos de Investi-

gación en el área de Tecnología de la madera hasta el año 1995 y en el área de Tecnología de alimentos desde el año 1995 hasta la actualidad. Programa de Incentivos de la Nación Categoría V.

Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones. Félix de Azara 1552, Te.: 03752- 422186, (3300), Posadas, Misiones, Argentina.
Correo electrónico: lab@fceqyn.unam.edu.ar