

CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE COMPUESTOS NATURALES COMESTIBLES UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTICIA

Virginia Gonzalez Estevez^{1§}, M. Laura Boiero^{1‡}; Bernardo Sigifredo^{1*}
Tutor: Dra. Mariana A. Montenegro^{1,2}.

¹ Departamento de Ing. Química. UTN. FRVM. Av. Universidad 450. Villa María, Córdoba, Argentina. ² Instituto A.P. de Ciencias Básicas y Aplicadas. UNVM. Campus Universitario, Arturo Jauretche 1555, Villa María, Córdoba, Argentina.

[§] Alumna de Maestría en Tecnología de los Alimentos UTN, FRVM. [‡] Alumna de Doctorado en Ciencias Químicas UNRC. ^{*} Alumno de Ingeniería Química UTN, FRVM.

e-mail: virginia_ge@frvm.utn.edu.ar

Resumen

La mayoría de los alimentos, previamente a su procesamiento, pueden sufrir un deterioro por la acción de microorganismos (MO), cuyo desarrollo provoca alteraciones organolépticas y degradación de nutrientes valiosos. La leche, rica en sustancias nutritivas y con una elevada a_w , resulta un medio susceptible al ataque microbiano. En la industria de alimentos se emplean compuestos naturales (CN) con un rol tecnológico definido, como Goma Arábica (GA), Pectina (PE) y Bixina (BI), cuyo uso está previsto en la elaboración de productos lácteos. El objetivo del presente trabajo consiste en evaluar una funcionalidad adicional de estos compuestos, su actividad antimicrobiana (AAM). Las tendencias mundiales hacia el reemplazo de los aditivos artificiales por los de origen natural, potencian esta investigación. Debido a que, previamente al tratamiento térmico, la leche se almacena a bajas temperaturas, el efecto de los compuestos antes mencionados se evalúa frente a una cepa de referencia y un MO aislado de leche cruda e identificado genotípicamente (mediante amplificación y secuenciación del gen marcador molecular 16S ARNr), ambos, psicrótrofos. En particular, se determina la capacidad de dichos compuestos para reducir la velocidad de crecimiento (μ) de estos MO, a través de recuento en placa. Los resultados indican que los compuestos evaluados poseen AAM frente a los MO estudiados.

Introducción

La gran mayoría de los alimentos durante su procesamiento, almacenamiento y/o transporte pueden sufrir deterioro por la acción de MO presentes en su matriz. Su desarrollo provoca alteraciones organolépticas (off-flavour) debido a la generación de compuestos volátiles (Karatapanis *et al.*, 2006; Kilcast y Subramaniam, 2000) y degradación de nutrientes (utilizados como sustratos) valiosos para la alimentación humana y necesarios para obtener buenos resultados en la elaboración de productos derivados del alimento afectado. La leche es una matriz compleja, rica en sustancias nutritivas, con una elevada actividad de agua, factores que la convierten en un medio sumamente susceptible al ataque microbiano.

En la industria de alimentos en general y, en la industria láctea en particular, se emplean CN con un rol tecnológico definido como es el caso de GA, PE y BI, cuyo uso está previsto como espesantes/estabilizantes, en el caso de los polímeros y, como colorante en el de la BI, de productos lácteos en el Código Alimentario Argentino (CAA).

El objetivo del presente trabajo consiste en evaluar una funcionalidad adicional de estos compuestos, su capacidad antimicrobiana. Las tendencias mundiales hacia el reemplazo de los aditivos artificiales por los de origen natural, potencian el desarrollo de esta investigación.

Debido a que, previamente al tratamiento térmico, es decir, durante su transporte desde el tambo a la fábrica y una vez en ella, la leche se almacena a bajas temperaturas, el efecto de los compuestos antes mencionados se evalúa frente a un MO aislado de leche cruda, *Pseudomonas sp.* (Ps) y la cepa de referencia *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), ambos psicrótrofos. La elección de los MO a estudiar se llevó a cabo teniendo en cuenta que más del 50% de los aislamientos psicrótrofos de leche cruda pertenecen al género *Pseudomonas* (McKellar, 1989; Cousin, 1982; Chandler *et al.*, 1985; Mc Phee *et al.*, 2002). Además, cuando la leche cruda se almacena a 4 °C,

Pseudomonas sp. puede producir suficientes proteasas como para hidrolizar toda la caseína disponible transformándola en péptidos solubles (Mc Kellar, 1989; Sørhaug et al., 1997) y constituye la preocupación principal con respecto a la degradación lipolítica de la leche (Shah, 1994; Mc Phee et al., 2002). Puntualmente, se determina la capacidad de los compuestos antes mencionados para reducir la velocidad de crecimiento (μ) de estos MO, empleando la técnica de recuento en placa, a través de siembra en profundidad.

Materiales y métodos

Compuestos naturales

Se estudiaron Goma Arábica *Samspray 1 LQ*, Pectina *MRS-351* y Bixina *Bixa Orellana Extracto Seco PDD*, todos ellos grado alimentario, de manera de evaluar el efecto de los compuestos que efectivamente se emplean en la industria de los alimentos.

Microorganismos

Se utilizó *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™) como cultivo de referencia.

Aislamiento y caracterización de MO de leche

El aislamiento de los MO a partir de leche cruda (almacenada a 4 °C inmediatamente concluido el ordeño), se realizó a través de siembra en profundidad de una dilución 10^{-2} de la muestra, empleando Plate Count Agar (PCA) y agar Cetrimide (AC), un medio selectivo para el género *Pseudomonas*. Las placas fueron incubadas a 4 °C durante 10 días. Cultivos puros fueron obtenidos tras sucesivos repiques en PCA. Se realizó además la caracterización morfológica y bioquímica preliminar de los aislamientos obtenidos mediante tinción de Gram, pruebas de la catalasa y oxidasa, etc. Ciertas cepas de interés fueron seleccionadas, para continuar con su caracterización genotípica.

Caracterización genotípica de los aislamientos

La extracción de ADN genómico de los aislamientos seleccionados se llevó a cabo a partir de cultivos en fase exponencial tardía, crecidos en caldo nutritivo, empleando el kit comercial Wizard Genomic DNA-Purification Kit (Promega, USA) según las especificaciones del fabricante. El ADN obtenido se empleó como templado para la realización de los ensayos de biología molecular llevados a cabo en este estudio.

Amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr

Se realizó la identificación genotípica mediante amplificación y secuenciación del gen marcador molecular 16S ARNr. La región de interés se amplificó, a partir del ADN templado, empleando los cebadores universales 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TACGGYTACCTTGT TACGACTT -3') (Weisburg et al., 1991). Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron precipitados y purificados (DNA Clean and Concentrator-5, Zymo Research, USA) y posteriormente, fueron enviados para su secuenciación, en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina). Los electroferogramas obtenidos se analizaron y editaron manualmente (BioEdit Sequence Alignment Editor) para obtener las secuencias completas (1300-1500 pb) del gen 16S ARNr. Se analizaron las secuencias del gen 16S ARNr, con el objetivo de determinar el género y la especie más cercana, empleando la base de datos del Ribosomal Data Project (RDP), disponible en <http://rdp.cme.msu.edu/>, utilidad SeqMatch, y también, Basic Local Alignment Search tool (BLAST), disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Los análisis fueron además, respaldados con el sitio List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN), disponible en <http://www.bacterio.net/>.

Determinación de actividad antimicrobiana

Para determinar la curva de crecimiento de *Pa* (MO de referencia) y de *Ps* (aislado de leche cruda), con y sin la adición de los antimicrobianos (AM): GA, PE y BI, se desarrolló la técnica de recuento microbiano con cada uno de ellos. A partir de un inóculo overnight (12 h) en caldo

nutritivo, de cada microorganismo estudiado, se preparó un inóculo general, en un frasco con leche en polvo reconstituida en agua estéril, ajustando la concentración a una absorbancia de 0,002, a 600 nm, que equivale a 10^6 UFC/ml. Posteriormente, cada muestra se dividió en porciones iguales, a una de ellas se la reservó y, a las restantes, se les adicionaron los compuestos a estudiar, en las concentraciones permitidas por el CAA multiplicadas por 5, con el objetivo de evaluar la efectividad en una concentración algo más elevada y, posteriormente, diluir la leche adicionada, con leche fresca para alcanzar la concentración permitida (11,252 mg/l de BI y 5 g/l de PE y GA). De esta manera, se logra que el inóculo inicial sea exactamente el mismo en la muestra con y sin AM. Las muestras se incubaron a 4° C durante 10 días. Cada 24 h, se realizó el recuento a través de siembra en profundidad (ICMSF, 2000). Para ello, se toma una alícuota de cada muestra a diferentes intervalos de tiempo y, tras diluciones seriadas en agua peptonada estéril (0,1%), se siembra 1 ml en una placa estéril, a la que luego se adicionan 12 ml de PCA. Las placas se incubaron durante 48 h a 37° C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento microbiano de las placas que presentaron entre 30 y 300 colonias, expresando los resultados como unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) y graficándolos en función del tiempo. La μ , (h^{-1}) de cada cultivo microbiano en leche, se determinó a partir de la porción lineal de la pendiente (crecimiento exponencial) de las curvas de crecimiento del MO, con y sin agregado de AM.

El porcentaje de reducción del crecimiento microbiano (%R) ejercido por los compuestos estudiados, fue calculado a través de la Ecuación 1.

$$\%R = \frac{\mu - \mu'}{\mu} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde μ y μ' , son las velocidades de crecimiento bacteriano en ausencia y presencia del compuesto estudiado, respectivamente.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en Cabina de Seguridad Microbiológica Biohazard Clase II (BIO-II-A) bajo flujo laminar. Además todos los materiales usados en los experimentos fueron previamente esterilizados.

Resultados

Aislamiento e identificación de MO de leche

De los MO que se desarrollaron en medios ricos a 4 °C (psicrótrofos), fueron aisladas y purificadas 13 cepas, siguiendo la metodología anteriormente expuesta. A partir de los cultivos puros, las cepas fueron caracterizadas en base a la morfología de colonia, tinción de Gram, filancia y pruebas bioquímicas. De ellos, fue seleccionado un bacilo corto Gram negativo, catalasa y oxidasa positivos, identificado preliminarmente como *Ps*, hipótesis respaldada por su crecimiento selectivo en AC.

Como se indicó inicialmente, para confirmar la identificación de género se empleó la utilidad Classifier de RDP (a través de sus aplicaciones Classifier y Seqmatch) y para la identificación de la especie más probable se empleó la base de datos RDP. Los principales resultados del análisis bio-informático y filogenético como también el porcentaje de similitud con la especie más cercana se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Identificación de aislamiento de leche cruda

Longitud secuencia (pb)	Identificación	Especie más relacionada (Nº de acceso)	Identidad (%)
982	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (X3; AY631240)	100

La identificación genética confirmó que el MO aislado corresponde al género propuesto. Según la utilidad Classifier de la base de datos RDP, la cepa aislada seleccionada pertenece al dominio Bacteria, phylum Proteobacteria, clase Gammaproteobacteria, orden Pseudomonadales, familia Pseudomonadaceae, género *Pseudomonas* y fue específicamente identificado como

Pseudomonas sp., con alta probabilidad de corresponder a la especie *Pseudomonas aeruginosa* (Nº de acceso: X3; AY631240) con un 100,0% de similitud, según RPD.

Determinación de actividad antimicrobiana

La Figura 1 muestra las curvas de crecimiento de *Pa* a 4 ° C en leche, con y sin la adición de GA, PE y BI. Allí puede observarse una disminución de la velocidad de crecimiento de *Pa* con la adición de los compuestos estudiados, siendo más efectiva la BI, seguida por la PE y, en último lugar, la GA.

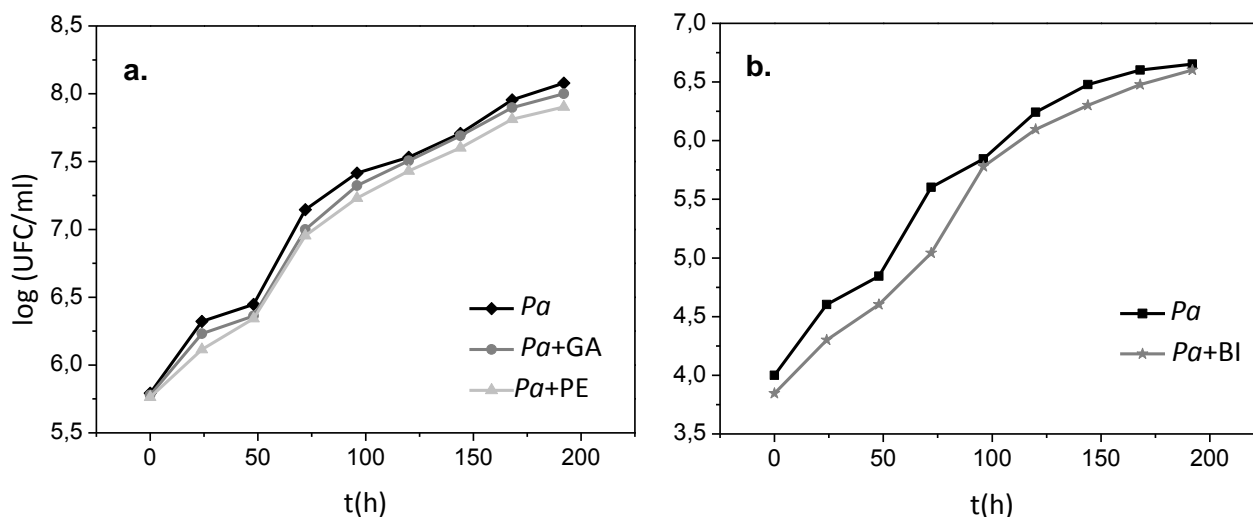


Figura 1. Curvas de crecimiento de *Pa* en leche a 4° C con y sin adición de **a.** GA y PE y **b.** BI

Las curvas de crecimiento de *Ps* a 4° C en leche, con y sin la adición de los AM, están representadas en la Figura 2. En este caso, el compuesto que resultó más efectivo es la GA, seguida por la BI y la PE. Resulta importante destacar que, más allá de la reducción de μ , como puede apreciarse en la Figura 2.a., cerca de las 175 h los polímeros adicionados comienzan a generar una fase de latencia, mientras que el MO, en ausencia de ellos, continúa en fase exponencial. GA resultó particularmente efectiva, generando un %R del 45%, aunque la AAM de PE tampoco es despreciable.

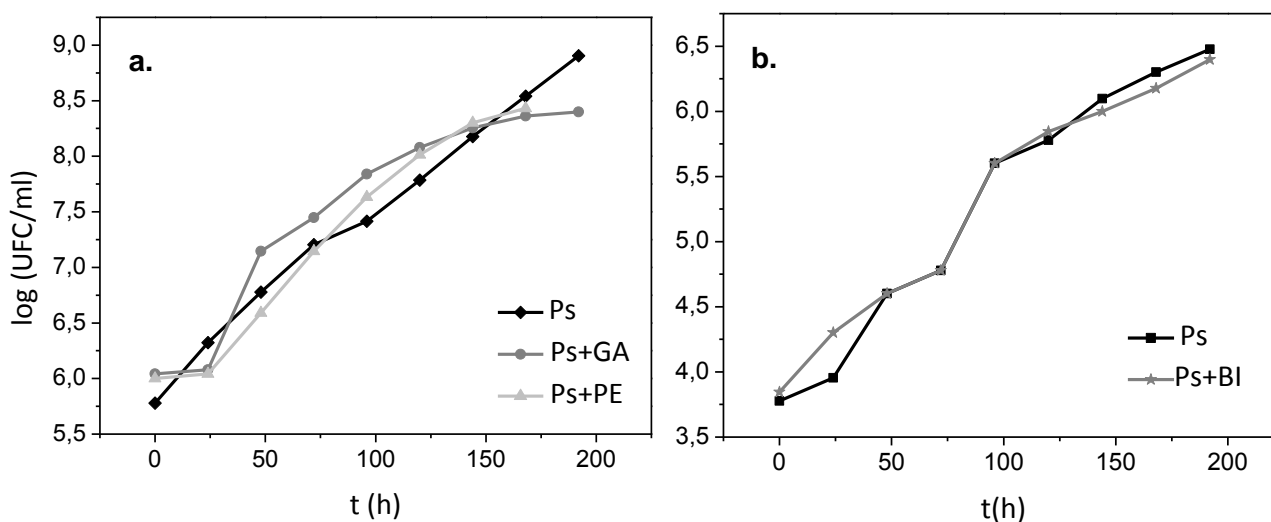


Figura 2. Curvas de crecimiento de *Ps* en leche a 4° C con y sin adición de **a.** GA y PE y **b.** BI

En la Tabla 2, se muestran las velocidades de crecimiento calculadas a partir de las curvas anteriores.

Tabla 2. μ y %R de *Pa* y *Ps* en leche con y sin agregado de GA, PE y BI

Compuesto	Concentración (g/l)	<i>Pa</i>		<i>Ps</i>	
		μ (h^{-1})	%R	μ (h^{-1})	%R
PE	0	0,0203 \pm 0,002	-	0,0365 \pm 0,001	-
	25	0,0183 \pm 0,001	10	0,0320 \pm 0,003	12
GA	0	0,0203 \pm 0,002	-	0,0365 \pm 0,001	-
	25	0,0188 \pm 0,001	7	0,0200 \pm 0,002	45
BI	0	0,0303 \pm 0,003	-	0,0232 \pm 0,002	-
	56 mg/l	0,0251 \pm 0,003	17	0,0180 \pm 0,001	22

Como puede verse en la Tabla 2, todos los compuestos presentan AAM. La unidad de concentración empleada es g/l (o mg/l) debido a que, al tratarse de aditivos grado alimentario, no se conoce el peso molecular de los CN utilizados y, por otro lado, a que esa es la unidad que se utiliza en el CAA para indicar los límites permitidos. Teniendo en cuenta que no se está trabajando con compuestos puros y que estos aditivos se agregan actualmente con un propósito tecnológico completamente distinto al que se está evaluando, el %R encontrado es importante.

Discusión

Los resultados de las curvas de crecimiento dejan en evidencia que GA, PE y BI ejercen un efecto bacteriostático frente tanto a MO de referencia como aislados de leche cruda, causando una reducción de la velocidad de crecimiento, sin provocar su inhibición, lo cual concuerda con numerosos estudios sobre la capacidad antimicrobiana de CN.

La AAM mostrada por GA y PE puede atribuirse a enzimas como oxidasas, peroxidasas y pectinasas presentes en la fracción proteica de las mismas. Se han demostrado las propiedades antimicrobianas de algunas de estas enzimas (Tyler et al., 1977; Kirtikar et al., 1984).

La BI es un carotenoide polar y, como tal, presenta extremos hidrofílicos que le permiten localizarse en los lados opuestos de la membrana, causando importantes cambios en la barrera de difusión, restringiendo el movimiento molecular de los grupos CH_2 y CH_3 de las cadenas alquílicas de los lípidos de membrana, aumentando la rigidez (Gabrielska et al., 1996), causando una pronunciada modificación de la barrera de difusión de la membrana, disminuyendo la permeabilidad y el paso de oxígeno molecular y otros pequeños iones (Subczynski et al., 1991).

Para que los antimicrobianos alcancen su diana o sitio de acción, deben atravesar la cubierta bacteriana. Las bacterias Gram negativas, como *Pa* y *Ps* ofrecen mayor resistencia que las Gram positivas a la entrada de antimicrobianos, ya que poseen una membrana celular externa, que rodea la capa de péptidoglucano. Por ello, en las bacterias Gram positivas, el límite de exclusión es mucho mayor que el tamaño de la mayoría de los antimicrobianos (Calvo et al., 2009). Esto indicaría que los CN estudiados tendrían una AAM aún mayor a las obtenidas en este estudio frente a bacterias Gram positivas lo que deja planteada una inquietud para futuras investigaciones.

Conclusiones

Se demostró que todos los CN estudiados (GA, PE y BI) tienen una importante AAM frente a los MO analizados si se tiene en cuenta que se adicionan durante el procesamiento de leche con una funcionalidad tecnológica completamente distinta a la que se investigó en este estudio. Este hecho resulta sumamente relevante desde el punto de vista tecnológico considerando que una sencilla modificación en el momento en el que se adicionan los CN podría traducirse en un beneficio tecnológico adicional. En la actualidad, los aditivos se incorporan a la leche una vez que ha sido

tratada térmicamente y que se ha definido el producto a elaborar. Lo que se propone, es adicionarlos inmediatamente después del ordeño, en un múltiplo de las cantidades permitidas (se evaluó una concentración cinco veces mayor) en la leche cruda, cuyo destino sea un producto lácteo definido, de manera de conocer estas cantidades y poder diluirla posteriormente para alcanzar los límites admitidos pero habiendo potenciado su capacidad. Los CN ejercerían su AAM en el tambo, el transporte y el almacenamiento refrigerado en la planta procesadora, previamente al tratamiento térmico. La disminución en la μ de los microorganismos psicrótrofos reduciría su número y, por ende, la cantidad de enzimas proteolíticas y lipolíticas producidas. Esto se traduciría en un menor número de nutrientes dañados, valiosos tanto para la nutrición humana como para la obtención de mayores rendimientos en la elaboración de productos lácteos derivados. Los resultados obtenidos, junto a la actitud del consumidor actual frente a los compuestos sintéticos, potencian la aplicación de los aditivos estudiados frente a los artificiales, también permitidos con la misma funcionalidad tecnológica que los evaluados pero que no presentan esta ventaja adicional de proteger la calidad microbiológica del alimento e, indirectamente, su calidad nutricional.

Referencias

- Calvo, J., Martínez-Martínez, L. 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 27, 1, 44-52.
- Chandler, R.E.; McMeekin, T.A. 1985. Temperature function integration and its relationship to the spoilage of pasteurized, homogenized milk. *Dairy Technol.* 40, 37-41.
- Cousin, M.A. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *J. Food Protect.* 45, 172-207.
- Gabrielska, J., Gruszecki, W.I. 1996. Zeaxanthin (dihydroxy-beta-carotene) but not beta-carotene rigidifies lipid membranes: a $^1\text{H-NMR}$ study of carotenoid-egg phosphatidylcholine liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1285, 167-174.
- ICMSF (International commission on microbiological specifications for foods, of the international union of microbiological societies). 2000. Microorganismos de los Alimentos, Volumen 1. Su significado y métodos de enumeración. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza España. Segunda Edición. ISBN: 84-200-0908-3.
- Karatapanis, A. E.; Badeka, A. V.; Riganakos, K. A.; Savva, I. N.; Kontominas, M. G. 2006. Changes in flavour volatiles of whole pasteurized milk as affected by packaging material and storage time. *Int. Dairy J.* 16: 750–761.
- Kilcast, D., Subramaniam, P. 2000. Introduction. In D. Kilcast, & P. Subramaniam (Eds.), *The stability and shelf-life of food* (pp. 1-19). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Kirtikar, K.R., Basu, B.D. 1984. Indian medicinal plants. (2nd ed.). Delhi, Periodical Expert Book Agency. 3, 1596 -1598.
- McKellar, R.C. 1989. *Enzymes of psychrotrophs in Raw Food*, CRC Press
- Mc Phee, J.D., Griffiths, M.W., 2002. Psychrotrophic bacteria, *Pseudomonas spp.* In: Roginsky, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, vol. 4. Academic Press, New York, pp. 2340–2351.
- Shah, N.P. 1994. Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft*. 49, 432-437.
- Sørhaug, T., Stepaniak, L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. Review Article. *Trends in Food Science & Technology*. 8, 2, 35 - 41.
- Subczynski, W.K., Markowska, E., Sielewiesink, J. 1991. Effect of polar carotenoids on the oxygen diffusion concentration product in lipid bilayers. An EPR spin label study. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1068, 68-72.
- Tyler, V., Brady, L., & Robbers, J. 1977. *Pharmacognosy*. 7th ed (p. 66–80). Philadelphia: Lea & Febiger.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J., 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173, 2, 697-703.