



INVESTIGACIONES Y
AVANCES EN
MICROBIOLOGÍA DE
LOS ALIMENTOS

López, Abel Gerardo

Investigaciones y avances en microbiología de los alimentos : trabajos completos del V CICYTAC 2014 / Abel Gerardo López ; Emiliano Salvucci ; compilado por Romina Cabrera ... [et al.] ; coordinación general de Victoria Rosati ; editado por Abel Gerardo López ... [et al.]. - 1a ed compendiada. - Córdoba : Ministerio de Industria, Comercio, Minería y Desarrollo Científico Tecnológico . Secretaría de Ciencia y Tecnología, 2015.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-45738-9-6

1. Microbiología. 2. Alimentos. I. Cabrera, Romina, comp. II. Rosati, Victoria , coord. III. López, Abel Gerardo, ed. IV. Título.

CDD 664

Diseño: Noriega Julieta. Área de Comunicación. Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba.



EDITORES

Abel G. López. (ICTA, FCFyN-UNC, Córdoba, Argentina)

Emiliano Salvucci. (ICYTAC, UNC-CONICET, Córdoba, Argentina)

PRÓLOGO

Desde hace décadas muchos microbiólogos del mundo están abocados al estudio, evaluación y experimentación de nuevos productos que aseguren la inocuidad de los alimentos en reemplazo de aditivos y sustancias que impliquen riesgos para la salud. La creciente demanda de productos más saludables ha impulsado la búsqueda de alternativas de origen natural a los conservantes industriales. Estas sustancias a la vez de garantizar la inocuidad, no deben alterar las propiedades del alimento a proteger. La microbiología acompaña así a un cambio de paradigma en relación a los alimentos procesados y cuestionados a nivel de su impacto en la salud. Mientras es necesario remarcar desde el aspecto nutricional las posibles consecuencias de basar la alimentación humana en alimentos procesados, desde la microbiología es necesario encontrar opciones naturales a los aditivos y conservantes. Y son los mismos microorganismos que se encuentran naturalmente en los alimentos, o sus metabolitos, quienes nos ofrecen alternativas para incrementar la seguridad.

Este libro reúne los trabajos en el área de microbiología presentados al V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y que abordan los temas mencionados. En relación a la bioconservación, los microorganismos producen numerosas sustancias que pueden ser investigadas y postuladas como conservantes de alimentos. A su vez, el continuo avance en el conocimiento del microbioma humano (microorganismos que conviven con el ser humano) permite dirigir las investigaciones en la búsqueda de alimentos, o derivados de los mismos, capaces de ejercer

un efecto benéfico mediante la modulación de este conjunto de microorganismos.

La microbiología y los trabajos aquí presentados, reafirman el rol fundamental, esencial, de los microorganismos en la existencia humana, tanto desde la perspectiva evolutiva como a nivel del individuo y la importancia capital de los mismos como fuente de innovaciones tecnológicas que influyen decisivamente en la vida cotidiana.

Los Editores

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD BIOPROTECTORA DE *LACTOBACILLUS SAKEI* EN PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS

Álvarez O. ¹, Herman C. ¹, Castro M. ¹, Cayré M. ¹; Garro O. ^{1,2}

⁽¹⁾Universidad Nacional del Chaco Austral (UNCAus) P.R. Sáenz Peña, Chaco (Argentina).

⁽²⁾ CONICET

ornealvarez@uncaus.edu.ar

Resumen: El objetivo del trabajo fue evaluar la capacidad de *Lb sakei* 268 para controlar el desarrollo de *Listeria innocua* durante el almacenamiento refrigerado de salchichas envasadas al vacío, las cuales fueron esterilizadas y procesadas. Las muestras fueron inoculadas con suspensiones celulares de *Lb sakei* 268 (bac+), *Lb sakei* ATCC 15521 (bac -) y *L innocua* 7, y almacenadas a 7°C durante 4 semanas. Se tomaron muestras periódicamente sobre las que se determinó recuentos de Bacterias Lácticas (BL) y de *L. innocua* y pH. En las muestras inoculadas sólo con *L innocua*, este microorganismo pudo crecer alcanzando recuentos de $6,87 \pm 0,04 \log \text{ ufc.g}^{-1}$ al final del período de almacenamiento, mostrando su capacidad para desarrollarse sobre el alimento. En presencia de *L sakei* (bac-), *L innocua* mostró un incremento a lo largo del tiempo, aunque los recuentos obtenidos al final del almacenamiento ($4,20 \pm 0,12$) fueron significativamente menores ($p < 0,05$) que los de las muestras control. Sin embargo, cuando el crecimiento de *L innocua* se monitoreó en presencia de *L sakei* (bac+) se detectó una

disminución significativa de los recuentos de 1,5 ciclos logarítmicos durante el almacenamiento, evidenciando la capacidad de *L sakei* 268 para controlar eficazmente el crecimiento de *L. innocua* bajo las condiciones ensayadas.

Palabras clave: Biopreservación, *Lactobacillus sakei*, Productos cárnicos

Abstract: The aim of this study was to evaluate the ability of *Lb sakei* 268 for controlling the growth of *Listeria innocua* during refrigerated storage sausages vacuum packed, which were sterilized and processed. Samples were inoculated with cell suspensions of *Lb sakei* 268 (bac +), *Lb. sakei* ATCC 15521 (bac -) and *L innocua* 7, and stored at 7 ° C for 4 weeks. Samples were taken periodically over on which Lactic Acid Bacteria counts (LAB) and of *L innocua* and pH was determined. In samples inoculated with *L. innocua* only, this microorganism was able to grow reaching 6.87 ± 0.04 counts log cfu.g⁻¹ at the end of the storage period showing its ability to grow this food matrix. In the presence of *L. sakei* (bac -), *L. innocua* also showed increased counts over time, while those obtained at the end of storage (4.20 ± 0.12) were significantly lower ($p < 0,05$) than in the control samples. However, when the growth of *L innocua* was monitored in the presence of *L. sakei* (bac +) significantly decreased counts of 1.5 log units was detected during storage, evidencing the ability of *L. sakei* 268 to control effectively *L innocua* growth under the conditions tested.

Keywords: Biopreservation, *Lactobacillus sakei*, meat products.

INTRODUCCIÓN

La Provincia del Chaco cuenta con pocos establecimientos habilitados para la elaboración y comercialización de productos cárnicos, fermentados y cocidos. Los productos cárnicos producidos en esta provincia poseen carácter artesanal, ya que se elaboran manteniendo las recetas y algunas técnicas tradicionales de los primeros pobladores (inmigrantes de Europa Oriental, España e Italia), lo que les confiere características particulares. Asimismo, estos productos poseen muy buena aceptación pero se hallan confinados a un mercado interno de pequeño tamaño.

A través del Consejo Económico y Social (CONES), la provincia del Chaco trabaja en propuestas para impulsar el desarrollo de la industria cárnica. La propuesta elaborada por el CONES analiza los factores que bloquean la expansión del sector en dos direcciones: hacia la exportación y hacia el abastecimiento del mercado local y regional (Aguilar *et al.*, 2005). A corto plazo se propuso una expansión en los productos básicos (carne fresca). Sin embargo, a mediano plazo, esta organización propone centrar el objetivo en productos con mayor valor agregado como son las carnes procesadas. Se pretende con esta propuesta que la industria de la carne supere la estrategia genérica de comercialización de productos estandarizados, indiferenciados y masivos para llegar a una estrategia que permita diferenciar los productos mediante la agregación de valor. En este contexto, las industrias provinciales elaboradoras de productos cárnicos, que actualmente comercializan productos posicionados como artesanales y usan una tecnología de producción básica,

deberán introducir innovaciones de tipo tecnológico a fin de ofrecer a sus futuros mercados productos que mantengan las características sensoriales típicas, de buena calidad y adaptados a las exigencias actuales de los consumidores.

La creciente demanda de productos más saludables ha originado el desarrollo de nuevas tecnologías de conservación que no utilicen aditivos que impliquen riesgos para la salud, que no alteren las características organolépticas del producto y que, a su vez, inhiban con eficacia el crecimiento de los microorganismos patógenos y alterantes. La bioconservación es considerada como una alternativa dentro de las nuevas tendencias en conservación de alimentos y se define como la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad de los alimentos utilizando su flora natural o sus metabolitos (Aymerich *et al.* 1998). Los cultivos microbianos que se agregan a los alimentos sólo para inhibir patógenos y/o extender la vida útil sin modificar los atributos sensoriales, se denominan "cultivos protectores" (Lücke, 2000).

Las bacterias lácticas (BL) naturalmente presentes en la carne y los productos cárnicos son las candidatas ideales como cultivos protectores en la industria cárnica ya que están especialmente adaptadas a este ambiente y es conocida su actividad antagónica frente a varios microorganismos patógenos y alterantes (Vermeiren *et al.* 2004, Ammor *et al.* 2006). De este modo, la preservación de la carne y los productos cárnicos está especialmente orientada hacia el biocontrol usando especies de *Lactobacillus* productoras de bacteriocinas como cultivos protectores (Todorov *et al.* 2010). Una ventaja en el uso de estos cultivos es que otorga al alimento una imagen de producto más natural, libre de aditivos para la preservación. Además, la continua producción de bacteriocina por parte del cultivo viable resuelve el

problema de la pérdida de actividad por interacción con los constituyentes del alimento que se presenta cuando la bacteriocina es aplicada en forma de aditivo (Tomé *et al.* 2008).

En trabajos previos, se realizaron actividades para caracterizar la flora láctica de los productos cárnicos artesanales a fin de seleccionar cepas útiles para su biopreservación. A partir de 434 aislamientos de BL de diferentes productos, se seleccionaron 5 siguiendo los criterios recomendados por Vermeiren *et al.* (2004) para la selección de potenciales cultivos protectores. Los aislamientos seleccionados mostraron ser productores de sustancias del tipo bacteriocinas, con actividad frente a *Listeria innocua* y *Staphylococcus aureus* (Herman *et al.*, 2008) cuyas actividades fueron estables a diferentes valores de pH y tratamientos térmicos. Los mismos fueron identificados como: *Lactobacillus sakei*, denominados como 268 y 300, *Lactobacillus curvatus*, denominados 304 y 409 y *Lactobacillus curvatus/sakei*, denominado ACU-1 (Castro *et al.* 2011). De estas 5 cepas, *Lb sakei* 268 mostró un adecuado perfil de crecimiento y acidificación sobre condiciones semejantes a la de productos cárnicos cocidos, evidenciando su potencial como biopreservador.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de *Lb sakei* 268, una cepa productora de bacteriocina aislada de chorizo ahumado elaborado de forma artesanal en la provincia del Chaco, para controlar el desarrollo de *L. innocua* durante el almacenamiento refrigerado de un producto cárnico cocido envasado al vacío.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos microbianos

Se trabajó con *Lb sakei* 268 productor de bacteriocina (bac+) y *Lb sakei* ATCC 15521 no productor de bacteriocina (bac-). Las cepas fueron mantenidas en caldo MRS (Biokar Diagnostics, Francia) + glicerol (20 % v/v) a -18°C hasta su utilización. *L. innocua* 7, fue mantenida en caldo BHI + glicerol (20%) a -20°C.

Los cultivos de *Lb sakei* 268 y *Lb sakei* ATCC 15521 se activaron en caldo MRS a 30°C. *L. innocua* se activó en caldo BHI a 30°C.

Ensayos de co-inoculación en salchichas

Se usaron salchichas tipo Viena elaboradas artesanalmente por una industria local, las cuales fueron esterilizadas en autoclave a 121°C durante 15 minutos, procesadas asépticamente y divididas en porciones de 25 g. Se utilizaron volúmenes adecuados de suspensiones celulares de *Lb sakei* 268 (bac+), *Lb sakei* ATCC 15521 (bac -) y *L. innocua* 7 para inocular las porciones y alcanzar recuentos de 10^4 ufc.g⁻¹ para los cultivos lácticos y 10^2 - 10^3 ufc.g⁻¹ para *L. innocua* 7. Las muestras inoculadas fueron envasadas al vacío utilizando películas plásticas (ENVARIL S.A.I.C.I.F., Argentina) de baja permeabilidad al oxígeno ($19 \text{ cm}^3 \cdot \text{m}^{-2} \cdot 24\text{h}^{-1} \cdot \text{atm}^{-1}$ a 25°C y 75% HR) con un vacío final de 0.95 mm de Hg usando una envasadora RAPIVAC (Argentina) y almacenadas a 7°C durante 4 semanas. Los tratamientos realizados fueron: i) muestras no inoculadas como control; ii) *Lb sakei* 268 (bac⁺) + *L. innocua*; iii) *Lb sakei* (bac⁻) + *L. innocua* como control negativo y iv) *L. innocua* como control positivo. Se tomaron muestras a

intervalos de 7 días sobre las que se determinó: recuento de Bacterias Lácticas (BL) sobre agar MRS incubado a 30°C por 48 hs, recuento de *L innocua* sobre Palcam Agar + suplemento selectivo incubado a 30°C por 48 horas y pH.

Análisis microbiológicos y determinación de pH

Se tomaron 10g de las muestras los cuales fueron transferidos asépticamente a un homogeneizador conteniendo 90 ml de agua de peptona 0,1% (p/v). La mezcla se homogenizó a temperatura ambiente y a partir de ella se prepararon diluciones decimales seriadas. Alícuotas de estas diluciones se sembraron por duplicado sobre agar MRS (Biokar Diagnostics, Francia) incubado a 30°C por 72 horas bajo condiciones anaeróbicas para el recuento de BL y para el recuento de *Listeria innocua* sobre Palcam Agar + suplemento selectivo (Biokar Diagnostics, Francia) incubado a 30°C por 48 horas. Los resultados de los recuentos fueron expresados como log₁₀ (ufc.g⁻¹). El pH se determinó sobre una dilución 1/10 de la muestra con peachímetro digital Orion 525A (Boston, EEUU).

Análisis estadístico

Los análisis detallados anteriormente se realizaron por duplicado y los resultados fueron expresados como valor medio ± desviación estándar. Se utilizó análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la influencia del tiempo de almacenamiento y los tratamientos sobre los recuentos microbianos. Cuando se hallaron diferencias significativas ($p < 0,05$) se utilizó el test de Tuckey para separar las medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las Figuras 1 y 2 muestran el perfil de crecimiento y acidificación de las especies lácticas durante el almacenamiento refrigerado de las muestras con los diferentes tratamientos realizados. Los patrones de crecimiento de *Lb sakei* 268 (bac+) y *Lb sakei* ATCC 15521 (bac-) co-inoculados con *Listeria innocua* 7 sobre el producto (Figura 1) fueron semejantes, mostrando un rápido aumento de la población que alcanzó recuentos de $7 \pm 0,11 \log \text{ ufc.g}^{-1}$ a la semana de almacenamiento. La habilidad de las bacterias lácticas de desarrollarse sobre productos cárnicos cocidos envasados al vacío está ampliamente documentada y es atribuida a la capacidad de estas bacterias de crecer a temperaturas de refrigeración, en condiciones de microaerofilia y a las concentraciones de NaCl y NaNO₂ comúnmente encontradas en estos productos (Samelis, 2006). Los perfiles de acidificación de ambos microorganismos también fueron similares (Figura 2) evidenciándose una disminución del pH de 0,4 unidades aproximadamente. Modificaciones similares en los valores de pH fueron reportados por Kaban *et al.* (2010) debido al desarrollo de *Lb sakei* Lb 706 (bac +) y (bac-) sobre salchichas cocidas.

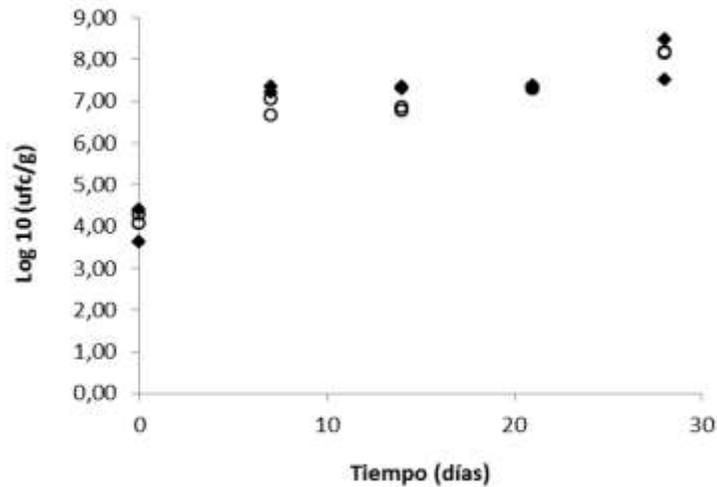


Figura 1. Perfil de crecimiento de (♦) *Lb. sakei* 268 (bac+) y (○) *Lb. sakei* ATCC 15521 (bac-)

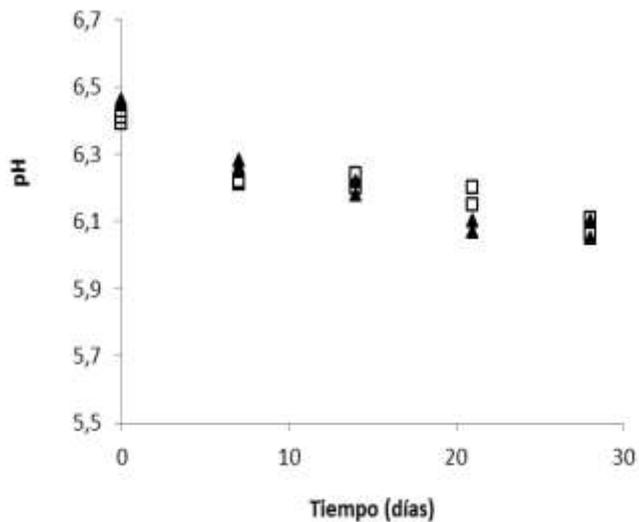


Figura 2. Perfil de acidificación de (▲) *Lb. sakei* 268 (bac+) y (□) *Lb. sakei* ATCC 15521 (bac-)

Los recuentos de *L. innocua* para los diferentes tratamientos realizados se resumen en la Tabla 1. En ausencia de cultivos lácticos, *L. innocua* mostró un incremento significativo en sus recuentos a lo largo del período de almacenamiento alcanzando un incremento total de 4 ciclos logarítmicos. Estos resultados evidencian la habilidad para adaptarse al medio cárnico.

En presencia de *Lb. sakei* (bac-), los recuentos de *L. innocua* también muestran un aumento significativo. Sin embargo, el incremento total alcanzado fue significativamente menor ($p=0,0011$) que el alcanzado en las muestras control. Por el contrario, cuando el crecimiento de *L. innocua* se monitoreó en presencia de *Lb. sakei* 268 (bac+) se evidenció un efecto bactericida. Los recuentos de *L. innocua* disminuyeron durante el almacenamiento refrigerado en, aproximadamente, 1,2 ciclos logarítmicos.

Tabla 1. Recuentos de *L. innocua*, expresados como \log_{10} (ufc.g⁻¹), en presencia de *Lb. sakei* 268 (bac+) y *Lb. sakei* ATCC15521 (bac-)

Tiempo (días)	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i> <i>Lb. sakei</i> (bac-)	<i>L. innocua</i> <i>Lb. sakei</i> (bac+)
0	2,72^a±0,06	2,77^a±0,02	2,77^a±0,10
7	3,9^b±0,08	2,53^a±0,06	2,89^a±0,08
14	4,52^c±0,20	3,5^b±0,08	2,18^b±0,04
21	5,45^d±0,06	4,59^c±0,16	1,45^c±0,04
28	6,87^e±0,04	4,2^c±0,12	1,51^c±0,11

Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas por el test de Tuckey ($p < 0,05$).

Trabajando con productos cárnicos cocidos envasados al vacío, Alves *et al.* (2006) y Vermeiren *et al.* (2006) reportaron que el uso de variantes bac (+) de algunas cepas de *Lb sakei* no ofrecería una barrera adicional para controlar el crecimiento de *Listeria* en comparación con el efecto producido por las variantes bac (-). Estos autores concluyeron que el control del crecimiento de *Listeria* por esas cepas de *Lb sakei* puede ser atribuido a la competencia por nutrientes. Contrariamente, los resultados obtenidos en este trabajo, indican que la capacidad de *Lb sakei* 268 de producir bacteriocinas contribuye a la inhibición de *L innocua* en las muestras. Similares resultados fueron reportados por Mataragas *et al.* (2003) y Kaban *et al.* (2010) para productos cárnicos envasados al vacío.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo sugieren que el uso de *Lb. sakei* 268 (bac +) como cultivo protector podría proveer una barrera adicional para mejorar la seguridad de los productos cárnicos cocidos elaborados en la zona. *Lb sakei* 268 podría considerarse como un biopreservador promisorio para la industria cárnica y representarían una nueva manera, acorde a las exigencias actuales de los consumidores, de garantizar la calidad de los productos cárnicos elaborados en la provincia dando mayores beneficios económicos a la industria.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, E., Kozak, A., Lifton, S. (2005) La cadena cárnica en el Chaco: Una política para el desarrollo de la industria frigorífica. Documento de trabajo. Consejo Económico y Social de la Provincia del Chaco (CONES). www.coneschaco.org.ar
- Alves, V.F., Martínez, P.C.R., Lavrador, M.A.S. y De Martinis, E.C.P. (2006). Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. *Meat Science* 74:623-627.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. y Chevallier, I. (2006), Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control* 17: 454-461.
- Aymerich, M.T., Hugas, M., Monfort, J.M. (1998) Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. *Food Technology International* 4: 141-158.
- Castro, M.P., Palavecino, N. Z., Herman, C., Garro, O. A., Campos, C. A. (2011) Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Sci.* 81:321-329.
- Herman, C., Cayré, M.E., Vignolo, G., Garro, O.A. (2008b). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from cooked meat products. V Congreso Argentino de Microbiología General: SAMIGE. Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Kaban, G., Kaya, M., Lücke, F.K. (2010). The effect of *Lactobacillus sakei* on the behavior of *Listeria monocytogenes* on sliced bologna-type sausages. *Journal of Food Safety* 30:889-901.

Lücke, F.K. (2000) Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science* 56:105-111.

Samelis, J. (2006) Managing microbial spoilage in the meat industry. En: Clive de W. Blackburn (Ed.) *Food spoilage microorganisms*. CRC Press .pp. 230-286

Mataragas, M., Drosinos, E.H., Metaxopoulos, J. (2003) Antagonistic activity of the lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced , cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4 ± 2 °C. *Food Microbiol.*20, 259-265.

Todorov, S.D., P. Hob, M Vaz-Velho y L.M.T. Dicks (2010), Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. *Meat Science* 84: 334–343.

Tomé, E., Pereira, V.L., Lopes, C.I., Gibbs, P.A., Teixeira, P.C. (2008) *In vitro* tests of suitability of bacteriocin-producing lactic acid bacteria, as potential biopreservation cultures in vacuum-packaged cold-smoked salmon. *Food Control* 19: 535-534.

Vermeiren, L., Devleghere, F., Debevere, J. (2004) Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology*.96:149-164.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado con fondos de la Universidad Nacional del Chaco Austral y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica a través de los proyectos PIN°18/UNCAus y PICT-2008-1371 y PICT-2012-1447-Impacto Regional.

**EVALUACIÓN COMPARATIVA POR CITOMETRÍA DE FLUJO
Y RECUENTO EN PLACA, DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE GOMA ARÁBIGA FRENTE A
MICROORGANISMOS PSICRÓTROFOS**

**Boiero M.L.¹, Breser L.², Gonzalez Estevez V.¹, Bachetti R.²,
Morgante C.², Montenegro M.A.^{1,2}, Porporatto C.²**

1: Universidad Tecnológica Nacional-Facultad Regional de Villa María. Villa María, Argentina.

2: CIT VM (CONICET-UNVM). Instituto A.P. de Ciencias Básicas y Aplicadas. Universidad Nacional de Villa María.
lboiero@frvm.utn.edu.ar

Resumen: Una de las estrategias más aplicadas para la conservación de productos lácteos, es la refrigeración. Si bien el almacenamiento de leche a bajas temperaturas permite prolongar su vida útil, también favorece el desarrollo selectivo de microorganismos psicrótrofos (bacterias que crecen próximo a 0 °C) que producen enzimas hidrolíticas termorresistentes. Esto conduce a la pérdida de la calidad nutricional y organoléptica de la leche. La tendencia actual consiste en aplicar preservantes de origen natural, como una alternativa segura y saludable a los conservantes químicos. La goma arábica (GA) es un biopolímero comestible obtenido del exudado de árboles *Acacia Senegal* y *Seyal*. Ésta se emplea comúnmente como agente espesante, estabilizante, emulsionante, en diversas industrias. Sin embargo, numerosos estudios indican que adicionalmente posee propiedades biológicas como antioxidante, contribución positiva sobre diferentes enfermedades, y actividad antimicrobiana. Es por ello que el objetivo del trabajo, fue evaluar la actividad

antimicrobiana (AAM) de GA frente al desarrollo de microorganismos psicrótrofos aislados de leche cruda, almacenada a temperatura de refrigeración (4 °C), a través de la técnica de recuento en placa y comparar con la determinación de viabilidad por citometría de flujo (CMF).

Los resultados obtenidos demostraron una relación entre los métodos de recuentos utilizados, indicando que GA, presenta AAM sobre un microorganismo capaz de desarrollarse en leche, principalmente a altas concentraciones, aportando un efecto benéfico adicional a sus usos tecnológicos.

Palabras claves: Citometría de flujo, actividad antimicrobiana, goma arábica, viabilidad.

Abstract: One of the most used strategies for the conservation of dairy products is cooling. While milk storage at low temperatures can prolong its shelf life, also favors the selective development of psychrotrophic microorganisms (bacteria that grow close to 0 °C) that produce heat resistant hydrolytic enzymes. This leads to the loss of nutritional and organoleptic quality of milk. Currently, there is a tendency to use natural preservatives, since they are safe and healthy alternatives to chemical preservatives. Gum arabic (GA) is an edible biopolymer exudate obtained from *Acacia Senegal* and *A. Seyal* trees. This is commonly used as a thickener, stabilizer and emulsifier, in various industries. However, numerous studies indicate that it has biological properties acting as antioxidant, antimicrobial, and contributing in a positive way against various diseases. Because of the above mentioned, the aim of this research was evaluate the antimicrobial activity (AAM) of GA against psychrotrophic microorganisms which were isolated from raw milk stored at refrigeration

temperature (4 ° C) using the plate count technique and compared to the viability determination by flow cytometry (CMF).

The results showed a relationship between counting methods used, indicating that GA presents AAM over a microorganism able to develop in milk mainly at high concentrations, providing an additional beneficial effect to its technological applications.

Key words: Flow Citometry, antimicrobial activity, gum arabic, viability.

INTRODUCCIÓN

La leche es una matriz compleja, con un alto contenido de nutrientes, lo que favorece el desarrollo microbiano. El uso de la refrigeración a baja temperatura, es una de las estrategias más aplicadas para conservar la leche cruda y los productos lácteos de la descomposición, y mantener la calidad de los mismos. Sin embargo, esto trae como consecuencia la selección de microorganismos (m.o.) psicrótrofos, que son aquellos capaces de crecer a temperaturas cercanas a 0 °C, y representan menos del 10% de la flora inicial de leche cruda. Sin embargo, éstos pueden convertirse en flora predominante al permanecer, de uno a tres días bajo condiciones de refrigeración. *Pseudomonas* spp. generalmente, representa entre el 10-15% de la flora psicrótrofa en leche cruda, siendo *P. fluorescence* la especie predominante (Thomas 1973, Sørhaug 1997).

Los m.o. psicrótrofos, además de su alta velocidad de crecimiento a bajas temperaturas, son sensibles a tratamientos térmicos, tales como pasteurización o tratamiento a ultra alta temperatura (UHT), resultando eliminados, pero las enzimas hidrolíticas producidas por éstos permanecen, ya que son termoresistentes. Entre dichas enzimas extracelulares liberadas, se encuentran: *proteasas*, *lipasas* y *fosfolipasas* (Braun *et al.* 1999, Chena *et al.* 2003, Matta y Punj 1999). La acción de todas estas enzimas, afectan la composición química y nutricional de la leche, generan disminución en los rendimientos para la elaboración de queso y otros productos lácteos. Además, los productos de degradación, producen efectos indeseables en el sabor y aroma, disminuyendo la

calidad e inocuidad de la leche. Todas las razones anteriormente mencionadas, indican la relevancia de la detección y control de m.o. psicrótrofos y sus enzimas resistentes al calor, cobrando gran importancia y siendo ésta, una de las principales preocupaciones en la industria láctea.

Un método alternativo para reducir las posibilidades de contaminación microbiana y oxidación química, manteniendo la calidad de la leche, es la adición de compuestos naturales. Existen numerosos estudios, que demuestran el efecto benéfico de la adición de compuestos con capacidad antimicrobiana (Kuetea *et al.* 2010, Tajkarimi *et al.* 2010, Da Silva *et al.* 2012). La tendencia actual consiste en aplicar preservantes de origen natural, como una alternativa segura y saludable a los conservantes químicos. En tal sentido, goma arábica (GA) es un biopolímero comestible obtenido del exudado de árboles *Acacia Senegal* y *Seyal*, compuesto por una elevada proporción de carbohidratos (97%) y una pequeña de proteínas (1-3%). Éste se emplea comúnmente en la industria alimentaria como agente espesante, estabilizante, emulsionante. Sin embargo, numerosos estudios indican que adicionalmente posee propiedades biológicas como antioxidante, contribución positiva sobre diferentes enfermedades, y actividad antimicrobiana (AAM) (Boiero *et al.* 2014, Trommer y Neubert 2005, Glover *et al.* 2009, Ali y Al Moundhri 2006).

Pocos estudios han sido realizados sobre la AAM de GA, informando principalmente que presenta actividad inhibitoria del crecimiento de ciertas especies patógenas periodontal (agente causal de caries o implicado en la placa bacteriana), tales como *Prophyromonas gingivalis* y *Prevotella intermedia* (Clark *et al.* 1993). Estos resultados sugieren, que GA podría inhibir la formación de placa bacteriana y junto con su efecto

mejorador de la remineralización dental, lo que indicaría que GA puede actuar como un potencial agente preventivo en la formación de caries (Onishi *et al.* 2008). Otro estudio sobre el efecto antimicrobiano de los extractos metanólicos de diferentes especies de acacia incluida *Acacia senegal*, reveló que los extractos metanólicos de las especies *A. catechu* y *A. nilotica*, mostraron la máxima actividad antimicrobiana. En cuanto a *Acacia senegal*, empleando la corteza, determinaron que el extracto en hexano, presentó AAM frente a *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans*, mientras que el extracto metanólico presentó AAM frente a *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, y los hongos *Cándida albicans* (levadura) y *Aspergillus niger* (Saini *et al.* 2008). Sin embargo, no se han realizados estudios de AAM frente a microorganismos capaces de desarrollarse en alimentos, en particular m.o. psicrótrofos que crecen en productos lácteos almacenados a bajas temperaturas.

La metodología clásica de recuento en placa, empleada para determinar la comunidad bacteriana de alimentos, es generalmente lenta (resultados están disponibles en más de 48/72 horas), tediosa, y permite identificar parcialmente la microflora bacteriana. Los recuentos de bacterias viables se basan comúnmente en el número de colonias que se desarrollan en placas de un agar nutritivo, previamente inoculadas con cantidades conocidas del alimento diluido e incubadas en condiciones ambientales predeterminadas. Tales recuentos se denominan, erróneamente, recuentos totales en placa, cuando en realidad únicamente pueden contarse aquellas bacterias que pueden crecer en las condiciones ambientales elegidas. En efecto, es posible obtener una amplia variedad de condiciones cambiando la composición del medio sólido de cultivo, los gases del ambiente, el tiempo

y la temperatura de incubación. Tal es así, que la incubación a temperaturas entre 0 y 7 °C favorece el crecimiento de bacterias psicrótroficas (ICMSF, 1980). Por otra parte muchos m.o., entre ellos patógenos, de origen alimentario son capaces de adquirir un estado viable no cultivable (VBNC) en condiciones de estrés (McDougald *et al.* 1998). En el mismo, las células son viables (capacidad infectiva), pero han perdido su capacidad de formar colonias en medios de cultivo bajo condiciones de análisis, por lo cual no pueden ser detectadas por métodos culturales. Con el motivo de sortear dichos inconvenientes y evitar una subestimación en el recuento de VBNC, es que se han desarrollado numerosas técnicas de recuento microbiano. Entre ellos se destacan métodos moleculares basados en análisis directo de ADN o ARN (sin enriquecimiento microbiano), tales como FISH, electroforesis en gel desnaturante en gradiente (DGGE) (Amann *et al.* 1995, Ercolini *et al.* 2003, Randazzo *et al.* 2002).

En la actualidad, la industria láctea requiere un sistema basado en un único instrumento que permita analizar células microbiana y somáticas, incluyendo la detección, enumeración y diferenciación de contaminante microbianos. La citometría de flujo (CMF), es una técnica que ofrece la posibilidad de análisis rápidos, confiables, y empleando sólo único instrumento (Gunasekera *et al.* 2003).

La CMF es una técnica analítica cuantitativa que caracteriza poblaciones celulares a nivel de una simple célula, a medida que son iluminadas por un rayo láser. La intensidad de la señal óptica de fluorescencia generada es correlacionada a parámetros celulares estructural y/o funcional. La característica clave de CMF es la capacidad de medir un gran número de partículas (incluso más de 100.000 células por segundo). Esto permite separar partículas o células en poblaciones o incluso

detectar células minoritarias o raras en muestras, basadas en diferencias estadísticas en cualquiera de las variables que pueden ser medidas al mismo tiempo.

La técnica de CMF permite evaluar la viabilidad Celular, empleando diferentes pigmentos fluorescentes, analizando diferentes propiedades celulares, tales como actividad metabólica, potencial de membrana, integridad o biosíntesis de macromoléculas, llevando a una más profunda caracterización de poblaciones celulares. Específicamente, la integridad de membrana, es la prueba más definitiva de viabilidad celular, e indica que las células pueden potencialmente generar gradiente, y por lo tanto, mostrar actividad metabólica pero sin garantizar la replicación celular. Aquellas células con membranas dañadas o comprometidas, no pueden mantener o generar el gradiente electroquímico y por ende el potencial de membrana, por lo que se consideran muertas. La evaluación de la integridad de membrana es más aplicable para la detección de células latentes y heridas.

La Integridad de membrana puede ser determinada por el método de exclusión de pigmentos. Las células que poseen membranas intactas son permeables a pigmentos cargados como SYTO 9, SYTOX, y cianinas (TOPRO, TOTO). El fluorocromo es capaz de ingresar en todas las células y emitir fluorescencia verde, siendo utilizado como un evaluador de recuento total de células. Sólo si la célula pierde su integridad de membrana, el pigmento Ioduro de Propidio (IP) puede entrar en la célula, emitiendo fluorescencia al unirse a los ácidos nucleicos. Las propiedades de emisión de la mezcla de tinción de unido a los ácidos nucleicos del ADN de la célula, cambian debido al desplazamiento de un colorante por el otro, y por la desactivación de fluorescencia por transferencia de energía de resonancia (Vives-Rego *et al.* 2000).

De todo lo anteriormente expuesto, se desprende el objetivo del trabajo que fue evaluar la AAM de GA frente al desarrollo de microorganismos psicrótrofos aislados de leche cruda, almacenada a temperatura de refrigeración (4 °C), a través de la técnica de recuento en placa y comparar con la determinación de viabilidad por CMF.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de bacterias de leche cruda

Con el objetivo de evaluar la AAM de GA frente a m.o psicrótrofos, se realizó el aislamiento e identificación de m.o. capaces de crecer en leche cruda. Para ello, se realizó la siembra en profundidad de una dilución 10^{-2} de leche cruda, en medios de cultivos selectivos incubados a 4 °C durante 7 días. Fueron seleccionadas las colonias de interés, para su posterior caracterización e identificación por métodos convencionales y genotípicos.

Identificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa

Mediante secuenciación del gen *16S ARNr*, empleando los cebadores universales 27f y 1492R. Se analizaron las secuencias obtenidas y se cotejaron con bases de datos (RDP, BLAST).

Preparación de Muestras

A partir de un inóculo overnight de la cepa aislada, se preparó las muestras en Caldo nutritivo (CN), con y sin adición de GA (0, 20, 75, 200 y 400 μM), empleando una concentración inicial de $\text{D.O}_{600\text{nm}}$ de 0,002, correspondiente a 10^6 UFC/ml. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C durante 7 días.

Recuento bacteriano

Se realizó el recuento de microorganismos en placa, a través de la técnica de siembra en profundidad (ICMSF, 1980). Se empleó agar de recuento total (PCA), y las placas que fueron incubadas 48 h a 37 °C. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada microorganismo. Las siembras fueron realizadas en cabina de seguridad microbiológica (Biohazard, BIO-II-A). Los resultados se expresan como UFC/ml.

Viabilidad por Citometría de Flujo

El ensayo fue realizado empleando un Citómetro de flujo ACCURI C6 (BD Biosciences), equipado con un láser rojo (640 nm) y otro azul (488 nm). La velocidad de flujo fue ajustada a 1500 eventos/segundos, y fueron adquiridos hasta 100.000 eventos por muestra.

Se realizó tinción doble (IP+Syto 9) para discriminar células con membrana intactas (viables) de aquellas con membrana permeabilizada (células muertas), empleando un kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight® (Molecular Probes, Life technology, Eugene, OR, USA), realizando una dilución 1 μl de cada colorante en 100 μl de buffer fosfato (PBS). El cultivo bacteriano incubado 48 h a 4 °C (fase exponencial) fue teñido

con 1 μl Syto 9 + 5 μl de IP en un volumen final de 1000 μl . Para descartar interferencias con pequeñas partículas y restos de interferencias se realizan controles, considerando un control para tinción de IP (células muertas) que fue realizado sometiendo el cultivo celular a 90 °C por 10 min previo a la tinción, y un control positivo de células 100 % vivas. La fluorescencia verde de las células teñidas con Syto 9 fueron recolectadas en el canal FL1 (530/30nm) y la fluorescencia roja de la células teñidas con IP fueron recolectadas en el canal FL3 (670 nm). Los datos fueron analizados con el Software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de m.o. de leche

De los m.o. que se desarrollaron en medios ricos a 4 °C, fueron aisladas y purificadas las cepas de interés, que luego fueron caracterizadas en base a la morfología de colonia, tinción de Gram, y pruebas bioquímicas. De ellos, fue seleccionado un coco Gram positivo, catalasa y oxidasa negativos. La identificación filogenética de género y especie más relacionada, empleando la base de datos RDP, se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Identificación de aislamiento de leche cruda

Longitud secuencia (pb)	Identificación	Especie relacionada más (Nº de acceso)	Identidad (%)
1340	<i>Enterococcus</i> spp. (<i>EC</i>)	<i>Enterococcus faecium</i> (ATTC-27273, EU547780)	99,3

Según la utilidad Classifier de RDP, la cepa aislada seleccionada pertenece al dominio Bacteria, *phylum Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Enterococcaceae*, género *Enterococcus*. Ésta fue identificada como la *Enterococcus* spp., siendo la especie más relacionada *Enterococcus faecium* (N° de acceso: ATCC-27273, EU547780), con una similitud de 99,3%. Los enterococos forman parte de la flora intestinal normal de humanos y animales, por lo que su presencia en leche es indicativo de contaminación fecal y reflejo de condiciones higiénico inadecuadas (Franz *et al.* 1999, Faría Reyes *et al.* 2002). Los antibióticos son utilizados en los animales para prevenir y tratar las infecciones; pero también se utilizan con frecuencia en dosis subterapéuticas para promover el crecimiento. Muchos de estos antibióticos, pueden inducir la selección y amplificación de patógenos resistentes y dentro de ellos, se incluyen a bacterias como los enterococos. Estos microorganismos potencialmente resistentes pueden transmitirse a los seres humanos a través de las cadenas alimenticias y podrían causar enfermedades en las circunstancias apropiadas (Collignon 1999).

Recuento bacteriano

En la Figura 1, se muestra la curva de crecimiento de EC en CN, con y sin la adición de GA, almacenado a 4 °C durante 168 h. Allí puede observarse una disminución estadísticamente significativa de la velocidad de crecimiento de EC con la adición de GA en la concentración de 400 µM, ejerciendo una reducción de 0,12 logaritmos respecto del control sin GA

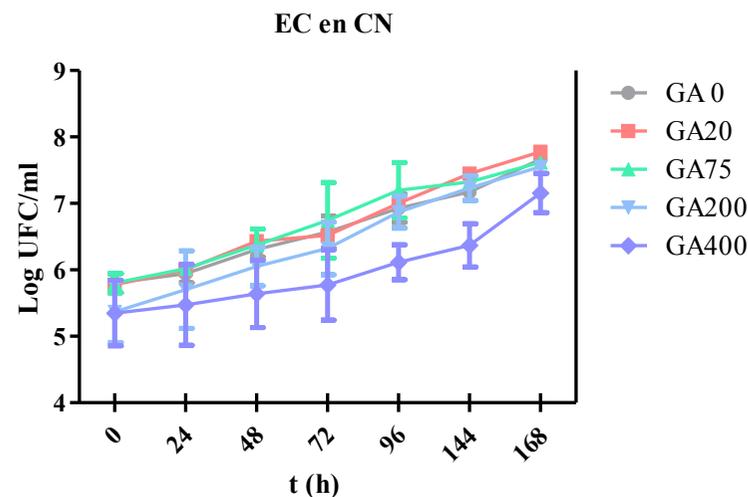


Figura 1. Curvas de crecimiento de EC en CN a 4° C con y sin adición de GA

Viabilidad por Citometría de Flujo

Como ha sido mencionado anteriormente, para descartar interferencias en las mediciones se realizan controles, Figura 2. En la Figura 2 a), se observa un control de células sin tinción, para determinar la autofluorescencia del cultivo bacteriano, mientras que en la Figura 2 b) se muestra el control positivo de células 100 % vivas, teñidas con el colorante Syto 9 que es permeable a todas las membranas. En la Figura 2 c) se muestra el control de células muertas, que fue realizado sometiendo el cultivo celular a un tratamiento térmico previo a la tinción, lo

que provocó la pérdida de la integridad de membrana, permitiendo el ingreso del colorante IP que se une a los ácidos nucleicos y emite fluorescencia roja.

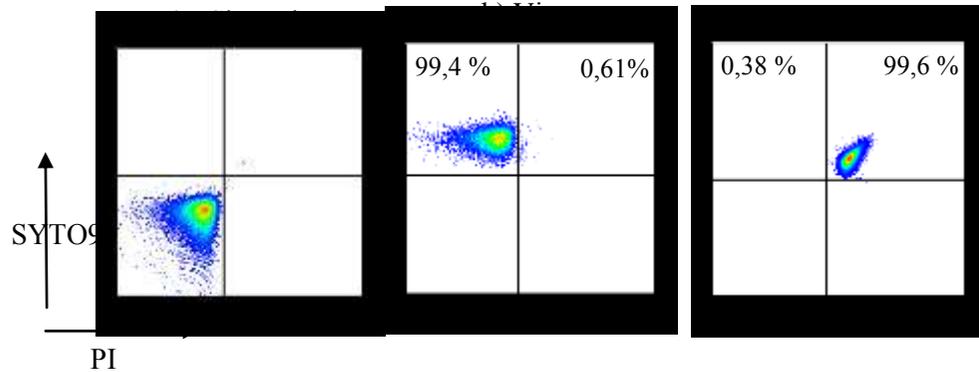


Figura 2. Controles del cultivo bacteriano de EC, a) células sin tinción, b) control de células teñidas con Syto9 y c) control de células teñidas con IP.

Como se muestra en la Figura 3, la adición de concentraciones crecientes de GA causa un efecto antimicrobiano que se evidencia con el incremento en el porcentaje de células muertas, llegando hasta un 15,6 % de muerte con la adición de 400 μM de GA. El porcentaje de mortalidad muestra diferencias estadísticamente, con la adición de 200 y 400 μM de GA respecto del control de células muertas, teñidas con IP (Datos no mostrados, determinados con GraphPad Prism).

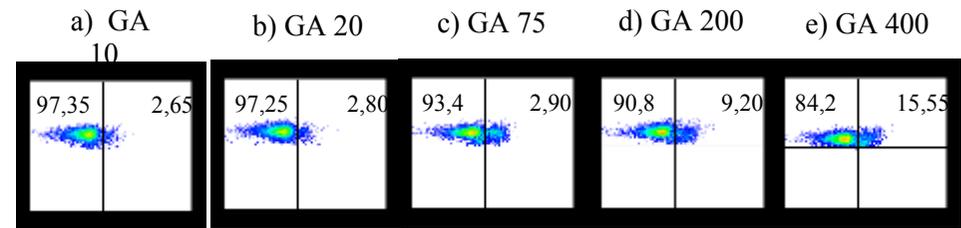


Figura 3. Cultivo de EC con adición de concentraciones crecientes de GA (expresados en μM): a) 10, b) 20, c) 75, d) 200, y e) 400.

Si bien el mecanismo de acción antimicrobiano que ejerce la GA no se conoce, diversos estudios sugieren que la AAM podría atribuirse a enzimas tales como oxidasas, peroxidasas y pectinasas presentes en la fracción proteica de la misma (Clark *et al.* 1993). Para algunas de estas enzimas se han demostrado sus propiedades antimicrobianas (Kirtikar *et al.* 1984). Similares resultados fueron obtenidos por Jepras *et al.* 1995, comparando de ambas técnicas, frente al desarrollo de *E. coli*. Los resultados sugieren que existe una correlación entre ambos métodos de recuento, siendo mucho más sensible la CMF, la cual permite evaluar la AAM de GA aún a bajas concentraciones lo cual no es detectado por el método de recuento. De los mismos se deduce que el efecto antimicrobiano de GA aumenta con la concentración de la misma. Estos resultados implican un importante avance en la determinación de viabilidad bacteriana, ya que la técnica de CMF presenta las ventajas de permitir un análisis simultáneo de numerosas características de cada partícula que es analizada de manera individual (tamaño, complejidad,

fluorescencia), de manera precisa, ya que puede analizar hasta 100.000 eventos por segundo, aportando información sobre las propiedades de cada partícula, en vez de un promedio de la población. Esto la convierte en una poderosa herramienta de análisis tanto cualitativo, como cuantitativo, pudiendo ser empleado en un amplio rango de aplicaciones, tales como análisis de agua (Ramalho *et al.* 2001), recuento de células sanguíneas (Veal *et al.* 2000), susceptibilidad a antibióticos (Walberg *et al.* 1997), viabilidad y vitalidad de bacteria y levaduras (Davey 2002), recuento de bacterias en leche cruda y procesada (Gunasekera *et al.* 2000). Además otra ventaja que presenta la CMF respecto de las técnicas moleculares o microbiología clásica, es que pueden realizarse de manera directa de la muestra, sin necesidad de extraer el ADN, o realizar diluciones previas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran que GA además de los usos tecnológicos que poseen en la industria, presenta AAM de sobre un m.o. capaz de desarrollarse en leche, aportando un efecto benéfico adicional. Adicionalmente, se mostró que existe una relación entre los métodos de recuentos utilizados, presentando la CMF numerosas ventajas.

Como conclusión se sugiere que un método de recuento independiente de cultivo como CMF, puede proveer una herramienta más precisa para el recuento microbiano en alimentos y para evaluar el efecto de compuestos Antimicrobianos sobre la viabilidad, con una medida inmediata y real.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali BH, Al Moundhri MS. 2006. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: a review of some recent research. *Food Chemical Toxicology*, 44:1173-1183.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59:143-169.
- Braun P, Fehlhaber K, Klug C, Kopp K. 1999. Investigations into the activity of enzymes produced by spoilage-causing bacteria: a possible basis for improved shelf-life estimation. *Food Microbiology*, 16:531-540.
- Boiero ML, Rodriguez-Estrada M, Mandrioli M, Vanden Braber N, García N, Borsarelli C, Montenegro M. 2014. Gum arabic microcapsules as protectors of the photoinduced degradation of riboflavin in whole milk. *Journal of Dairy Science*, 97:5328-5336.
- Chena L, Daniela RM, Coolbear T. 2003. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milkpowders. *International Dairy Journal*, 13:255-275.
- Clark DT, Gazi MI, Cox SW, Eley BM, Tinsley GF. 1993. The effects of Acacia arabica gum on the *in vitro* growth and protease activities of periodontopathic bacteria. *Journal of Clinical Periodontology*, 20:238-43.
- Collignon P. 1999. Vancomycin-Resistant Enterococci and use of avoparcin in animal feed: is there a link? *Medical Journal of Australia*, 171:144-146.

- Da Silva Malheiros P, Sant'Anna V, Utpott M, Brandelli A. 2012. Antilisterial activity and stability of nanovesicle-encapsulated antimicrobial peptide P34 in milk. *Food Control*, 23:42-47.
- Davey HM. 2002. Flow cytometric techniques for the detection of microorganisms. *Methods in Cell Science*, 24:91- 97.
- Ercolini D, Hill PJ, Dodd, CER. 2003. Bacterial community structure and location in stilton cheese. *Applied Environmental Microbiology*, 69:3540-3548.
- Faría Reyes JF, Kutchynskaya VL, Izquierdo Córser P, García Urdaneta A, Cagnasso MA. 2002. Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Raw Milk. *Revista Científica*, 12: 29-35.
- Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety?. *International Journal of Food Microbiology*, 47:1-24.
- Glover DA, Ushida K, Phillips AO, Riley SG. 2009. Acacia (sen) SUPERGUMTM (Gum arabic): An evaluation of potential health benefits in human subjects. *Food Hydrocolloids*, 23:2410-2415.
- Gunasekera TS, Attfield PV, Veal DA. 2000. A flow cytometry method for rapid detection and enumeration of total bacteria in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:1228-1232.
- Gunasekera TS, Veal DA, Attfield PV. 2003. Potential for broad applications of flow cytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. *International Journal of Food Microbiology*, 85:269-279.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, of the International Union of Microbiological Societies). 1980. *Microorganismos de los Alimentos, Volumen 1. Su significado y métodos de enumeración. 2^{da} Edición.* Ed. Acribia, S.A. Zaragoza España. ISBN: 84-200-0908-3.
- Kirtikar KR, Basu BD. 1984. *Indian medicinal plants.* (2nd ed.). Delhi, Periodical Expert Book Agency. 3, 1596-1598.
- Kuetea V, Alibert-Francob S, Eyong KO, Ngameni B, Folefoc GN, Nguemeving JR, Tangmouo JG, Fotso GW, Komguem J, Ouahouo BM, Bolla JM, Chevalier J, Ngadjuic BT, Nkengfack AE, Pagès JM. 2010. Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37:156-61.
- Matta H, Punj V. 1999. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic spore forming bacteria from raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, 52:59-62.
- McDougald D, Rice SA, Weichert D, Kjelleberg S. 1998. Nonculturable: adaption or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology*, 25:1- 9.
- Onishi T, Umemura S, Yanagawa M, Matsumura M, Sasaki Y, Ogasawara T, Ooshima T. 2008. Remineralization effects of gum arabic on caries-like enamel lesions. *Archives of oral biology*, 53:257-260.
- Jepras RI, Carter J, Pearson SC, Paul FE, Wilkinson MJ. 1995. Development of a Robust Flow Cytometric Assay for Determining Numbers of Viable Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:2696-2701.
- Randazzo CL, Torriani S, Akkermans ADL, De Vos WM, Vaughan EE. 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied Environmental Microbiology*, 68:1882-1892.
- Ramalho R, Cunha J, Teixeira P, Gibbs PA. 2001. Improved methods for the enumeration of heterotrophic bacteria in bottled mineral waters. *Journal of Microbiological Methods*, 44:97-103

- Saini M, Saini R, Roy S, Kumar A. 2008. Comparative pharmacognostical and antimicrobial studies of *Acacia* species (Mimosaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 2:378-386.
- Sørhaug T, Stepaniak L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 8:35-41.
- Tajkarimi MM, Ibrahima SA, Cliver DO. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21:1199-1218.
- Thomas, S.B., Thomas, B.F. 1973. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. *Dairy Industries*, 38:61-70.
- Trommer H, Neubert RH. 2005. The examination of polysaccharides as potential antioxidative compounds for topical administration using a lipid model system. *International Journal of Pharmaceutics*, 298:153-163.
- Veal DA, Deere D, Ferrari B, Piper J, Attfield PV. 2000. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of Immunological Methods*, 243:191-210
- Vives-Rego J, Lebaron P, Nebe-von-caron G. 2000. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiol*, 24:429-488.
- Walberg M, Gaustad P, Steen HB. 1997. Rapid discrimination of bacterial species with different ampicillin susceptibility levels by means of flow cytometry. *Cytometry*, 29:267-272.

AGRADECIMIENTOS

Los Autores agradecen a CONICET, Inst. de investigación UNVM. y Secretaria de Ciencia y tecnología de la UTN, por el apoyo financiero.

**ESTUDIO DE LA EFECTIVIDAD DE ÁCIDOS
ORGÁNICOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE
ZYGOSACCHAROMYCES BAILII
ZYGOSACCHAROMYCES ROUXII EN SISTEMAS
MODELO.**

González M.M.^{1,2}, Campos C.A.^{1,2}, Gliemmo M.F.^{1,2}

(1) Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Intendente Güiraldes s/n, Ciudad Universitaria, CABA, Argentina.

(2) CONICET, Argentina.

mfg@di.fcen.uba.ar

Resumen: Se evaluó el efecto del ácido cítrico (AC), málico (AM) y tartárico (AT) sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* y *Zygosaccharomyces rouxii* en sistemas de pH 4,00. Éstos se formularon en caldo Sabouraud con diferentes concentraciones de ácidos, se dispensaron en una microplaca y se inocularon con ambas levaduras separadamente (1.10^5 UFC/ml). La microplaca se incubó a 30°C y se registró la absorbancia (600 nm) a diferentes tiempos. Las curvas de crecimiento se modelaron con la ecuación de Gompertz modificada obteniéndose la velocidad específica de crecimiento (μ) y el valor asintótico (A). Se determinaron las Mínimas Concentraciones Inhibitorias (MCI) y Fungicidas (MCF). Para *Z. bailii*, se observó una MCI de 2,0 y una MCF de 3,0% de ACy, una MCI de 3,0% de AM. Con la adición de 0,5% de AT, se redujo la μ sin alcanzarse la MCI. Para *Z. rouxii* se observó una MCI de 3,0% de AC. El agregado de AM disminuyó la μ a partir del 3,0% y el AT no afectó el

crecimiento. El AC resultó más efectivo que el AM para ambas levaduras. *Z. rouxii* fue más resistente a los ácidos. Estos resultados permitirán seleccionar el ácido y su concentración para lograr una formulación segura.

Palabras Clave: *Z. bailii*, *Z. rouxii*, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico.

Abstract: The effect of citric acid (CA), malic acid (MA) and tartaric acid (TA) on the growth of *Zygosaccharomyces rouxii* and *Zygosaccharomyces bailii* in pH 4.00 systems was evaluated. These were formulated in Sabouraud broth containing different concentrations of acid, were dispensed into a microplate and were inoculated separately with both yeasts (1.10^5 UFC/ml). The microplate was incubated at 30°C and the absorbance (600 nm) was recorded at different times. The growth curves were modeled with the modified Gompertz equation to obtain yield specific growth rate (μ) and the asymptotic value (A). Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and fungicides (MFC) were determined. For *Z. bailii*, the MIC of 2.0% and the MFC of 3.0% of CA and the MIC of 3,0% of MA was observed. With the addition of 0.5% of TA, μ is reduced without reaching the MIC. For *Z. rouxii* the MIC of 3.0% of CA was observed. The addition of MA decreased μ from 3.0% and Ta did not affect growth. CA was more effective than MA for both yeasts. *Z. rouxii* was more resistant to acids. These results allow selecting the acid and its concentration for a safe formulation.

Keywords: *Z. bailii*, *Z. rouxii*, citric acid, malic acid, tartaric acid.

INTRODUCCION

La principal causa de deterioro de alimentos ácidos tales como jugos, jaleas y mermeladas, es la inestabilidad microbiológica debido, principalmente, a la acción de hongos y levaduras (Hatcher *et al.* 1992). Entre las levaduras de deterioro se encuentran *Zygosaccharomyces bailii* y *Zygosaccharomyces rouxii*. Ambas son capaces de deteriorar alimentos procesados y envasados. Además son osmofílicas, resistentes a la pasteurización, a la congelación, a preservadores lipofílicos y a agentes de limpieza. Pueden crecer en condiciones anaerobias y de muy elevada acidez, con necesidades nutritivas mínimas. Debido a que son causantes de deterioro en alimentos, su crecimiento produce pérdidas económicas significativas (Thomas y Davenport 1985, Golden y Beuchat 1992, Praphailong y Fleet 1997, Cheng *et al.* 1999, Loureiro y Querol 1999, Jenkinset *al.* 2000, Loureiro 2000). Estos hechos hacen que el conocimiento del efecto de aditivos sobre el crecimiento de estas levaduras sea de fundamental interés para los productores de alimentos ácidos. Por otra parte, la creciente demanda de los consumidores en disminuir la ingesta de aditivos de origen sintético incentiva la búsqueda de compuestos naturales que los reemplacen total o parcialmente en la formulación de alimentos. Esta creciente demanda hace resurgir los estudios del empleo de los ácidos orgánicos como preservadores. Los ácidos orgánicos están presentes naturalmente en las frutas o verduras y son ampliamente utilizados en la industria alimentaria como aditivos, en particular, los ácidos cítrico, málico y tartárico por

ser considerados GRAS (Generally Recognized As Safe) (Doores 2005).

La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos se atribuye a la reducción del pH, la disminución del pH interno de las células microbianas por disociación de moléculas de ácido sin disociar y la interrupción del transporte de sustratos como causa de un aumento de la permeabilidad de la membrana celular o a la reducción de la fuerza motriz de protones (Doores 2005). La efectividad de diferentes ácidos orgánicos ha sido estudiada y comparada a diferentes valores de pH y concentración y en función de la longitud de la cadena y del tipo y grado de ramificación (Doores 2005). Por otra parte, además de considerar los efectos antimicrobianos de los ácidos orgánicos, debe tenerse en cuenta su influencia en el sabor y la acidez de un producto determinado.

La ecuación de Gompertz modificada es un modelo empírico primario que permite modelar los cambios que ocurren en una población microbiana en función del tiempo y obtener los parámetros de crecimiento característicos (Zwietering *et al.* 1990).

En base a lo comentado acerca de las levaduras deteriorantes y del efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los ácidos cítrico, málico y tartárico sobre el crecimiento de *Z. bailii* y *Z. rouxii* en sistemas de pH 4,00 que modelan jugos a fin de hallar los niveles que afecten su crecimiento.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de los inóculos

Se elaboraron por separado inóculos de *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 y *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 28.253. Las cepas estaban almacenadas a $-20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ en caldo Sabouraud (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia), con 10,0g/100g de glicerol. Para ello, las levaduras fueron descongeladas y una alícuota transferida a caldo Sabouraud e incubadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 hs. Luego, los inóculos se centrifugaron a 7500 rpm por 15 minutos (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Alemania). Al pellet obtenido luego de la centrifugación se le agregó 1mL de peptona (1,5 g/100 g). Antes de ser utilizados, cada inóculo se diluyó en agua peptona hasta alcanzar 0,5 unidades McFarland, correspondiente a una población aproximada de 10^6 UFC/mL.

Preparación de los sistemas y registro del crecimiento

Se formularon sistemas modelo acuosos en caldo Sabouraud con diferentes concentraciones de los ácidos orgánicos según se muestra en la Tabla 1. Todos los ácidos orgánicos fueron de grado analítico (Anedra, Argentina).

Para seleccionar las concentraciones del ácido tartárico, se tuvo en cuenta la concentración máxima admitida de este acidulante (0,5 g/100mL) para bebidas no alcohólicas listas para consumo (Código Alimentario Argentino, 2014).

El pH fue ajustado a 4,00 con alícuotas de NaOH (0,5M) ó HCl (0,1M) según el caso. Se elaboraron sistemas control en caldo Sabouraud libres de ácidos orgánicos, unos sin el pH ajustado a 4,00, y otros con el pH ajustado mediante el agregado de

HCl. El pH se midió con un electrodo de vidrio acoplado a un pHmetro Fisher (USA).

Tabla 1. Concentración de los ácidos.

Ácido	Concentración (% m/m)				
Cítrico	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Málico	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Tartárico	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5

Los sistemas se esterilizaron en autoclave, luego se dispensaron, por quintuplicado, alícuotas de 180 μL en una microplaca de 96 pocillos. Se les adicionó 20 μL de caldo que contenía el inóculo, de ambas levaduras por separado, alcanzando una población de 1.10^5 UFC/mL. La microplaca se incubó a 30°C y durante el almacenamiento se midió el crecimiento de las levaduras a través del registro de las lecturas de absorbancia a 600 nm cada 2 h luego de agitar 30 s antes de cada lectura, durante dos días. Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas y se recolectaron con el software Gen 5 (BioTek Instruments, ELx808, USA). Como blanco se utilizaron los caldos sin inocular.

Luego del almacenamiento en la microplaca, se determinaron las mínimas concentraciones inhibitorias (MCI) y fungicidas (MCF) de los ácidos. Se definió la MCI como la menor concentración a la cual se observó una variación de absorbancia menor a 0,1. Para determinar la MCF se tomaron 35 μL de cada pocillo donde el crecimiento había sido inhibido y se sembraron en placas con agar Sabouraud. Las

placas se incubaron a 25°C durante 7 días. La MCF se definió como la menor concentración donde no se observó crecimiento (Owen y Palombo 2007).

Análisis de datos

Con los datos de absorbancia obtenidos se construyeron curvas de crecimiento las cuales se modelaron con la ecuación de Gompertz modificada (Dalgaard y Koutsoumanis 2001):

$$\ln\left(\frac{ABSt}{ABS0}\right) = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[1 + \mu \frac{e}{A}(\lambda - t)\right]\right\}_{(1)}$$

donde ABS0 es la absorbancia a tiempo inicial; ABSt es la absorbancia a tiempo t; μ es la velocidad específica de crecimiento; λ es el tiempo de fase lag y A es el valor asintótico, es decir, la absorbancia alcanzada en la fase estacionaria. Cabe destacar que la velocidad específica de crecimiento no corresponde a la máxima velocidad de crecimiento ya que el método de densidad óptica es menos sensible que el método de recuento de viables en placa (Dalgaard y Koutsoumanis 2001, Valero *et al.* 2006, Biesta-Peters *et al.* 2010).

Se estimaron los parámetros de crecimiento μ y A de cada sistema por regresión no lineal de los datos.

Para comprobar el ajuste de las ecuaciones aplicadas se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). Se obtuvieron los coeficientes de correlación ajustados (R^2_{aj}) y la raíz del error cuadrado medio (CME) entre los datos experimentales y los predichos por los modelos como medida de bondad de ajuste, según sugiere Ratkowsky (2004).

Se calcularon los promedios de los parámetros obtenidos y se compararon mediante un ANOVA determinándose las diferencias significativas a través de un test LSD.

Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Statgraphics Centurion XV.II para Windows (Manugistics, Inc., Rockville, Maryland, U.S.A.). En todos los casos, la significatividad estadística se evaluó a un nivel del 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron las curvas de crecimiento de las levaduras para los diferentes niveles de ácidos orgánicos. Las mismas se modelaron satisfactoriamente mediante la ecuación de Gompertz modificada obteniéndose valores de R^2_{aj} entre 0,98 y 0,99 y valores de CME alrededor de 0,002. Estos valores indican una buena correlación entre los valores de absorbancia observados y predichos por la ecuación.

A modo de ejemplo se muestran los datos experimentales y las curvas modeladas del crecimiento de las levaduras en los sistemas conteniendo ácido cítrico (Figura 1). El resto de las curvas modeladas mostraron patrones similares.

Cabe destacar que, para evaluar la influencia de los ácidos sobre el crecimiento de las levaduras, sólo se consideraron los parámetros μ y A debido a que el parámetro λ presentaba elevados errores experimentales por el escaso número de muestras evaluadas en ese lapso.

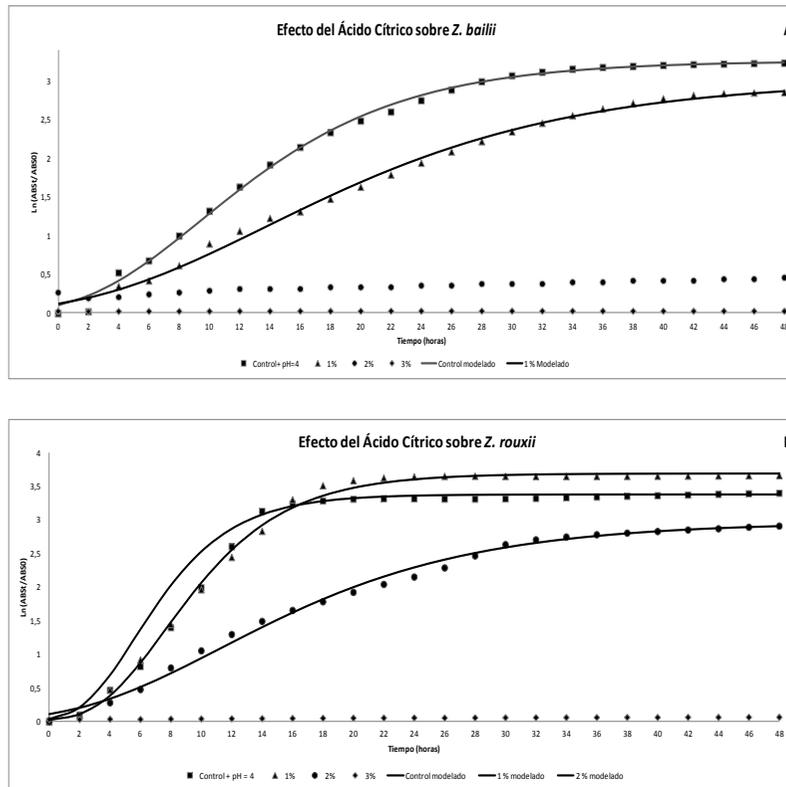


Figura 1. Curvas de crecimiento de *Z. bailii* (A) y *Z. rouxii* (B) a diferentes niveles de ácido cítrico. Puntos: datos experimentales. Línea: curva modelada.

En la **Tabla 2** se muestran los valores de los parámetros μ y A de las curvas de crecimiento de las levaduras en los sistemas conteniendo las diferentes concentraciones de ácidos. En ausencia de ácidos orgánicos, la reducción del pH disminuyó la μ de ambas levaduras y no afectó el parámetro

A. Se encuentra ampliamente reportado que el descenso del pH afecta el crecimiento de los microorganismos por producir un desequilibrio ácido-base entre el pH interno, cercano a 7, y el externo, afectando la homeostasis de la célula (Russell y Gould 1991, Piper *et al.* 2001). La reducción del pH externo puede producir cambios en la estructura de las macromoléculas de la membrana celular y, de esta manera, cambiar su permeabilidad afectando el transporte de nutrientes o causando liberación de material intracelular (Doores 2005).

Con relación al crecimiento de *Z. bailii*, en los sistemas con el pH ajustado a 4,00, el incremento de la concentración de ácido cítrico redujo la μ . Se observó una MCI de 2,0% m/m y una MCF del 3,0 % m/m. En el caso de AM, la μ de *Z. bailii* se redujo de manera creciente por el agregado de 1,0 y 2,0 % m/m, obteniéndose una MCI del 3,0 % m/m. La adición de 0,1% m/m de AT incrementó la velocidad de crecimiento de *Z. bailii*. Sin embargo, a mayores concentraciones de AT, la velocidad disminuyó diferenciándose entre los niveles de 0,2 a 0,4 % m/m con el de 0,5 % m/m, sin alcanzarse la MCI. En general, los valores asintóticos del crecimiento de *Z. bailii* no se modificaron por el efecto de los ácidos.

El desarrollo de *Z. rouxii* fue afectado por la adición de AC debido a que se produjo la reducción de la μ hasta no observarse crecimiento a partir de 3,0 % m/m, siendo esta la MCI. Las concentraciones estudiadas de AM y AT no resultaron suficientes para inhibir el crecimiento de las levaduras. El agregado de AM disminuyó la μ a partir del 3,0 % m/m y la presencia de AT no afectó el crecimiento. El valor de A se redujo por la presencia de 2,0 % m/m de AC ó 5,0 % m/m de AM.

Por otra parte, *Z. rouxii* fue más resistente que *Z. bailii* para cualquiera de los tres ácidos ya que mostró mayores valores de μ y *A*.

La acción antimicrobiana de los ácidos orgánicos se atribuye a la especie no disociada, por lo tanto su acción dependerá del pH del sistema y del pKa del ácido. Los valores de pKa de los ácidos estudiados se muestran en la Tabla 3. En base a estos valores, a pH 4,00 los ácidos cítrico y málico se encuentran menos disociados que el ácido tartárico, esto contribuiría a explicar la mayor acción inhibitoria observada para los ácidos cítrico y málico. Cabe destacar que, debido a que los niveles de ácido tartárico estudiados fueron inferiores a los niveles de los otros ácidos, los mismos no serían suficientes como para inhibir el crecimiento de las levaduras.

Al comparar la acción inhibitoria entre los ácidos cítrico y málico, se observó que el primero fue más efectivo en disminuir el crecimiento de las levaduras ya que muestra menores valores de μ para una misma concentración. Una tendencia similar fue encontrada por Rajashekhara *et al.* (1998), al estudiar la inactivación térmica de ascoesporas de *Neosartorya fischeri* en jugos de uva y mango en presencia de varios ácidos encontraron que el uso de ácido cítrico era el que permitía la mayor inhibición y el tartárico resultaba ser el menos efectivo. La menor efectividad del ácido málico podría vincularse con la posibilidad que tienen algunas levaduras, entre ellas *Z. bailii* y *Z. rouxii*, de metabolizar L-malato (SaaymanyViljoen-Bloom 2006, Casal *et al.* 2008).

Por último, la diferencia en la resistencia frente a los ácidos observada entre las levaduras podría deberse a que existan diferentes mecanismos de resistencia ó a la posibilidad de degradar algunos ácidos débiles que muestran algunas levaduras (Piper *et al.* 2001).

Tabla 2. Parámetros de crecimiento de las levaduras.

^aLos valores señalados con la misma letra no presentan diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Sistemas	Microorganismo	<i>Z. bailii</i>		<i>Z. rouxii</i>	
	Parámetros	μ (h^{-1})	A	μ (h^{-1})	A
Controles	Control sin ajuste de pH	0,23 \pm 0,03	2,8 \pm 0,4 ^b	0,68 \pm 0,03	3,69 \pm 0,07 ^f
	Control con pH = 4,00	0,159 \pm 0,002	3,0 \pm 0,7 ^b	0,351 \pm 0,003 ^c	3,43 \pm 0,07 ^{fg}
Niveles de Ácido cítrico (%m/m)	1,0	0,100 \pm 0,04	3,09 \pm 0,05 ^b	0,302 \pm 0,007	3,60 \pm 0,07
	2,0	MCI		0,111 \pm 0,007	2,99 \pm 0,06
	3,0	MCF		MCI	
	4,0 y 5,0	no creció		no creció	
Niveles de Ácido málico (%m/m)	1,0	0,187 \pm 0,02	2,99 \pm 0,06 ^b	0,35 \pm 0,01 ^{cd}	3,4 \pm 0,2 ^g
	2,0	0,068 \pm 0,02	3,5 \pm 0,1	0,332 \pm 0,006 ^d	3,2 \pm 0,2 ^g
	3,0	MCI		0,289 \pm 0,009	3,4 \pm 0,2 ^g
	4,0	no creció		0,238 \pm 0,007	3,5 \pm 0,1 ^g
	5,0	no creció		0,152 \pm 0,009	2,7 \pm 0,1
Niveles de Ácido tartárico (%m/m)	0,1	0,246 \pm 0,004	3,63 \pm 0,06	0,358 \pm 0,003 ^c	3,4 \pm 0,1 ^g
	0,2	0,213 \pm 0,002 ^a	3,0 \pm 0,2 ^b	0,368 \pm 0,004 ^c	3,6 \pm 0,1 ^h
	0,3	0,218 \pm 0,004 ^a	3,2 \pm 0,1	0,34 \pm 0,01 ^e	3,36 \pm 0,05 ^g
	0,4	0,197 \pm 0,005 ^a	3,05 \pm 0,09 ^b	0,327 \pm 0,008 ^e	3,41 \pm 0,09 ^g
	0,5	0,163 \pm 0,004	2,97 \pm 0,06 ^b	0,349 \pm 0,002 ^c	3,6 \pm 0,1 ^h

Tabla 3. Valores de pKa de los ácidos orgánicos (Doores 2005).

Ácido	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃
Cítrico	3,14	4,77	6,39
Málico	3,40	5,11	-
Tartárico	2,98	4,34	-

CONCLUSIONES

Los ácidos orgánicos afectaron el crecimiento de las levaduras. El ácido cítrico fue el que mostró mayor efectividad mientras que el ácido tartárico mostró el menor efecto. Se obtuvieron mínimas concentraciones inhibitorias del ácido cítrico para ambas levaduras y del ácido málico sólo para *Z. bailii*. Para esta levadura también se obtuvo la mínima concentración fungicida de ácido cítrico. De ambas levaduras, *Z. bailii* fue más sensible al efecto de los ácidos. Los diferentes efectos observados podrían estar relacionados con el grado de disociación de los ácidos, con la posibilidad de ser metabolizados por las levaduras y con los mecanismos de resistencia. Estos resultados permitirán seleccionar el ácido y su concentración adecuada para lograr una formulación segura.

BIBLIOGRAFÍA

- Biesta-Peters EG, Reij MW, Joosten H, Gorris LGM, Zwietering MH. 2010. Comparison of two optical-density-based methods and a plate count method for estimation of growth parameters of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76:1399–1405.
- Casal M, Paiva S, Queiros O y Soares-Silva I. 2008. Transport of carboxylic acids in yeasts. *FEMS Microbiological Reviews*, 32:974–994.
- Cheng L, Moghraby J y Piper PW. 1999. Weak organic acid treatment causes a trehalose accumulation in low-pH cultures of *Saccharomyces cerevisiae*, not displayed by the more preservative-resistant *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Microbiology Letters*, 170:89–95.
- Código Alimentario Argentino. 2014. Bebidas no alcohólicas, capítulo XII. Resolución GMC N° 09/06. Buenos Aires, Argentina: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos
- Dalgaard P, Koutsoumanis K. 2001. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods*. 43:183-196.
- Doores S. 2005. Organic Acids. Capítulo 4. En: Antimicrobials in foods. Eds.: Davidson PM, Sofos JN, Branen AL. Taylor & Francis Group. CRC Press.
- Golden DA, Beuchat LR. 1992. Interactive effects of solutes, potassium sorbate and incubation temperature on growth, heat resistance and tolerance to freezing of

Zygosaccharomyces rouxii. *Journal of Applied Bacteriology*, 73:524-530.

Hatcher Jr. WS, Weihe JL, Splittstoesser DF, Hill EC, Parish ME. 1992. Fruit beverages. En: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Editado por Vanderzant C, Splittstoesser DF. American Public Health Association. Edwards Brothers, Ann Arbor, MI, USA.

Jenkins P, Poulus P, Cole M, Vandeven M, Legan J. 2000. The boundary for growth of *Zygosaccharomyces bailii* in acidified products described by models for time to growth and probability of growth. *Journal of Food Protection*, 63:222-230.

Loureiro V, Querol A. 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends in Food Science & Technology*, 10:356-365.

Loureiro V. 2000. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterization and ecology for improved diagnosis and control. *Food Research International*, 33:247-256.

Owen RJ, Palombo EA. 2007. Anti-listerial activity of ethanolic extracts of medicinal plants, *Eremophila alternifolia* and *Eremophila duttonii*, in food homogenates and milk. *Food Control*, 18:387-390.

Piper P, Ortiz Calderon C, Hatzixanthis K y Mollapour M. 2001. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology*, 147: 2635-2642.

Praphailong W, Fleet GH. 1997. The effect of pH, sodium chloride, sucrose, sorbate and benzoate on the growth of food spoilage yeasts. *Food Microbiology*, 14:459-468.

Rajashekhara E, Suresh ER, Ethiraj S. 1998. Thermal Death Rate of Ascospores of *Neosartorya fischeri* ATCC 200957 in the Presence of Organic Acids and Preservatives in Fruit Juices. *Journal of Food Protection*, 10:1265-1407, 1358-1362.

Ratkowsky DA. 2004. Model fitting and uncertainty. En: Modeling Microbial Responses in Food. Editado por McKellar R, Lu X. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group.

Russell NJ, Gould GW. 1991. Food Preservatives. Blackie and Son Ltd.

Saayman M, Viljoen-Bloom M. 2006. The Biochemistry of Malic Acid Metabolism by Wine Yeasts - A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27(2): 113-122.

Valero A, Perez-Rodriguez F, Carrasco E, Garcia-Gimeno RM, Zurera G. 2006. Modeling the growth rate of *Listeria monocytogenes* using absorbance measurements and calibration curves. *Journal of Food Science*, 71:M257-M264.

Zwietering MH, Jongenburger, Rombouts FM y Van t Riet K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*. 56:1876-1881.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico de la Universidad de Buenos Aires y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

EXTRACTOS NATURALES CON ACTIVIDAD INHIBITORIA SOBRE *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*

**Micheloni O.¹, Oviedo M.S.², Fernández M.³, Fauguel C.³,
Presello D.³, Farroni A.³.**

1: Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires.
Pergamino, Buenos Aires, Argentina.

2: Instituto Nacional de Tecnología Industrial Villa Regina. Villa
Regina, Río Negro, Argentina.

3: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación
Experimental Pergamino. Pergamino, Buenos Aires, Argentina.
oscarbmicheloni@yahoo.com.ar

Resumen: El objetivo del presente trabajo fue la determinación de la actividad inhibitoria de extractos de especies vegetales, crecidas en la región norte de la provincia de Buenos Aires, sobre el crecimiento de *Fusarium verticillioides*. Se produjo un extracto crudo en etanol al que se le realizó un fraccionamiento con hexano, acetato de etilo y agua. Se puso a punto un método bioautográfico utilizando cromatografía en capa delgada sobre una placa de sílica gel 60F₂₅₄ una cepa de *F. verticillioides* (P364), agresiva y toxicogénica, aislada de maíz de nuestra región. Se realizó un *screening* sembrando 30 extractos en punto y aquellos que mostraron halos de inhibición fueron re-sembrados y desarrollados con diferentes fases móviles para el análisis de sus perfiles cromatográficos. En el *screening* 13 extractos mostraron halos de inhibición. Se observó actividad antifúngica en la fracción hexánica de *Sinapis arvensis*, y en la fracción de acetato de etilo de *Solanum sisymbriifolium* y *Dipsacus fullonum*; mientras que *Sphaeralcea bonariensis* y

Brassica napus mostraron inhibición en ambas fracciones (hexano y acetato de etilo). La técnica bioautográfica, asociada a la cromatografía en capa delgada, permitió simultáneamente detectar la actividad inhibitoria fúngica y separar los compuestos activos como un paso preliminar para su aislamiento e identificación. Las especies vegetales que crecen en nuestra zona demostraron ser una fuente interesante para la extracción de nuevos compuestos con actividad antifúngica.

Palabras Clave: *Fusarium verticillioides*, extractos naturales, bioautografía.

Abstract: The aim of the present work was to search for inhibitory activity of *Fusarium verticillioides* growth on vegetal species grown in the north region of Buenos Aires province. Raw extract were produced in ethanol from the plant material which then was partitioned using hexane, ethyl acetate and water. A bioautographic test was developed using thin layer chromatography on silica gel 60F₂₅₄ plates and a strain of *F. verticillioides* (P364) known as aggressive and toxicogenic which was isolated from corn plants cultivated in this area. First a screening test was run using 30 loaded on spot. Positive extracts were used to run the assay after chromatographic development. Thirteen extracts were positive on screening test. Inhibitory activity on fungal growth was observed in hexane fraction of *Sinapis arvensis*, and in ethyl acetate fraction from *Solanum sisymbriifolium* and *Dipsacus fullonum* extracts. *Sphaeralcea bonariensis* and *Brassica napus* showed inhibitory activity on both fractions (hexane and ethyl acetate). Bioautographic test coupled to thin layer chromatography allowed to detect inhibitory activity on fungal

growth and at the same time to separate the compounds present in the mix as a previous step in isolation and identification. Vegetal species grown in north of Buenos Aires appeared as an interesting source for new compounds with inhibitory capacity on *Fusarium verticillioides* growth.

Keywords: *Fusarium verticillioides*, natural extracts, bioautographic test.

INTRODUCCION

Fusarium verticillioides es uno de los patógenos fúngicos más importantes causante de la disminución en la calidad y el rendimiento de los cultivos agrícolas, tales como el maíz, cebada, trigo y avena. Además, esta especie es productora de fumonisinas, micotoxinas catalogadas como carcinogénicas del grupo 2B por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC2002). La exposición alimentaria a las fumonisinas produce efectos adversos en animales alimentados con cereales contaminados ocasionando, entre otros, el síndrome de edema pulmonar en cerdos (Harrison *et al.* 1990), la leucoencefalomalacia en caballos (Ross *et al.* 1992) y la apoptosis en muchos tipos de células (Jones *et al.* 2001). Además, están asociadas al riesgo de contraer cáncer esofágico en humanos (CAST 2003). El control de este patógeno en el campo se basa en estrategias integradas que incluyen el uso de compuestos antifúngicos sintéticos, los cuales pueden actuar sobre diferentes sitios diana provocando una reducción del crecimiento fúngico. Sin embargo, cada vez más evidencias sugieren que podrían no ser tan eficaces en la reducción de la producción de micotoxinas, pudiendo actuar muchas veces como factores de estrés, induciendo a la biosíntesis de estas (Mesterházy *et al.* 2003). Sumado a esto, el uso continuado de antifúngicos sintéticos basados en principios activos similares puede llevar al desarrollo de resistencia. Ante este panorama, existe una continua necesidad de búsqueda de nuevos compuestos que permitan el cuidado del medio ambiente y un control fúngico más eficiente.

Los extractos de plantas y aceites esenciales pueden desempeñar un papel importante en la preservación de los alimentos frente a los hongos. Las investigaciones de los extractos vegetales han conducido al aislamiento de los compuestos activos, los cuales fueron sintetizados por las especies vegetales como una respuesta al estrés biótico o abiótico, evidenciando que estas sustancias tienen acción insecticida, fungicida, bactericida o herbicida (Prieto *et al.* 2013). Además, las plantas pueden sintetizar un gran número de metabolitos secundarios para protegerse contra el estrés, para el mantenimiento de la estructura y las funciones vitales. Por estas razones es importante considerar a las especies vegetales como una importante fuente de nuevos compuestos bioplaguicidas (Matos 1998 y 2006).

Los ensayos bioautograficos sobre cromatografía en capa delgada (CCD) combinan la técnica separativa de esta y con la determinación *in situ* de la actividad biológica. Además, presentan muy buena sensibilidad de detección en comparación con otros ensayos antifúngicos generalmente utilizados en los análisis de extractos vegetales (Hadacek y Greger 2000)

El objetivo del presente trabajo fue la determinación de la actividad inhibitoria de extractos de especies vegetales, crecidas en la región norte de la provincia de Buenos Aires, sobre el crecimiento de *Fusarium verticillioides*.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Se recolectaron 10 especies vegetales en Pergamino, provincia de Buenos Aires, Argentina. Para cada especie vegetal se confecciono un *voucher specimen*, el cual fue depositado en

el herbario de la Facultad de Ciencias Agrarias perteneciente a la Universidad Nacional de Rosario, ubicado en la localidad de Zavalla provincia de Santa Fe. Las especies recolectadas fueron: *Rapistrum rugosum* L. All. (ID MO014) (RR), *Solanum sisymbriifolium* Lam. Var. *Sisymbriifolium* (ID MO011) (SS), *Sinapis vensis* L. (ID MO022) (SA), *Sida rhombifolia* L. (ID MO030) (SR), *Sphaeralcea bonariensis* Carv. Griseb. (ID MO018) (SB), *Brassic napus* L. (ID MO055) (BN), *Nicotiana longiflora* Carv. (ID MO046) (NL), *Oxalis articulata* (ID MO030) (OA), *Cichorium intybus* L. (ID MO051) (CI) y *Dipsacus fullonum* L. (ID MO045) (DF).

Preparación de extractos y fraccionamiento líquido-líquido

El material vegetal recolectado (planta entera) se secó en estufa a 60 °C con circulación forzada y luego se molió en un molino tipo Wiley con malla de 2 mm. Se utilizaron 200 g de material vegetal seco y pulverizado de la planta entera, el cual fue extraído tres veces con 4 L de etanol a reflujo por 45 minutos cada vez. Los extractos fueron filtrados y combinados y el solvente fue eliminado por evaporación a presión reducida. Para cada extracto se realizó una extracción líquido-líquido con solventes de distinta polaridad (hexano, acetato de etilo y agua), posteriormente las fracciones hexano y acetato de etilo fueron secadas con sulfato de sodio anhidro, combinadas, filtradas y concentradas a presión reducida. La fracción acuosa fue liofilizada.

Cromatografía en capa delgada

Se analizaron los perfiles cromatográficos de los extractos en placas de sílica gel 60F₂₅₄ utilizando diferentes fases móviles y reveladores (luz UV de 254 y 365 nm). La cantidad de extracto sembrado fue 0,5 mg en cada caso.

Método bioautográfico

Para la optimización del método autobiográfico se desarrolló una metodología basada en la técnica descrita por Zacchino y Gupta (2007) con algunas modificaciones. Una vez desarrollado el cromatograma, se eliminaron los solventes de la superficie de las placas (sílica gel 60 F₂₅₄), por evaporación bajo corriente de aire. Posteriormente las mismas se esterilizaron bajo luz ultravioleta (UV) durante 30 minutos. Paralelamente el medio de cultivo, agar papa glucosado (APG) con agregado de rojo de fenol al 5%, se fundió a baño maría y se mantuvo a una temperatura de 45 °C. Por otra parte, se preparó el inóculo a partir de una cepa de *F. verticillioides* (P364), agresiva y productora de fumonisinas, aislada de maíz de nuestra región. El microorganismo aislado fue crecido en el medio de cultivo APG durante 7 días a 25 °C y se preparó una suspensión de conidios con agua destilada estéril. Se añadió la proporción de inóculo necesario para alcanzar una concentración de 1x10⁵ esporas/ml en el agar fundido, se agitó en vórtex, y finalmente la mezcla obtenida fue vertida sobre las placas cromatográficas, calculándose previamente el volumen requerido para una cobertura uniforme de cada placa (aproximadamente 1 ml/10 cm² de área a cubrir). Las placas se incubaron en el interior de una placa de Petri, con un algodón con agua estéril (para mantener la humedad) a 25 °C

durante 40 hs, bajo ciclos de 12h\12h de luz blanca y luz negra.

La sensibilidad de la técnica autográfica fue ajustada utilizando dos inhibidores sintéticos comerciales, econazol y clotrimazol, a concentraciones de 10,0; 1,0; 0,01; 0,001 y 0,0001 microgramos por punto de siembra.

Imágenes

Las imágenes de las CCD fueron digitalizadas utilizando una Panasonic Lumix, modelo DMC-FH20 de 14 megapíxeles. La iluminación a 254 y 365 nm se realizó en una cámara oscura con lámpara UV marca UVP modelo UVLS-28 (2UV). Las autografías fueron fotografiadas en una cabina de igualación visual colorlux utilizando una lámpara D65, con el objetivo de utilizar condiciones uniformes y constantes de iluminación para la observación del halo de inhibición del crecimiento fúngico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La sensibilidad del ensayo mostró una CMI de 0,1 µg para econazol y clotrimazol. El agregado de rojo fenol ayudó a mejorar la definición del halo de inhibición.

En primer lugar se realizó un *screening* sobre de los 30 subextractos (10 fracciones acuosas, 10 de acetato de etilo y 10 hexánicas) sembrando 0,5 mg en forma de puntos sobre la placa cromatográfica de los cuales trece mostraron un halo inhibitorio (fracciones acuosas: SB, DF, BN; fracciones acetato de etilo: SS, SB, DF, BN y fracciones hexánicas: SA, SB, OA, DF y BN). Es interesante destacar que las fracciones de acetato de

etilo de DF y SB presentaron halos de inhibición de más de 1 cm de diámetro.

Las muestras positivas se sembraron nuevamente (0,5 mg) y las placas se desarrollaron con diferentes fases móviles. Los perfiles cromatográficos se observaron bajo luz UV a 256 y 365 nm, y luego se realizó el ensayo de inhibición para el crecimiento de *F. verticillioides*.

Las fracciones acetato de etilo fueron desarrolladas con tolueno: acetona: diclorometano (40:25:35). En tres especies SB, BN y DF se observó la aparición de un halo de inhibición de Rf 0,70. Bajo luz UV a 365 nm se pudieron visualizar un/unos compuesto/compuestos de color rojo a el mismo valor de Rf. Esto podría deberse a un compuesto de ocurrencia natural común para las tres especies (Figura 1).

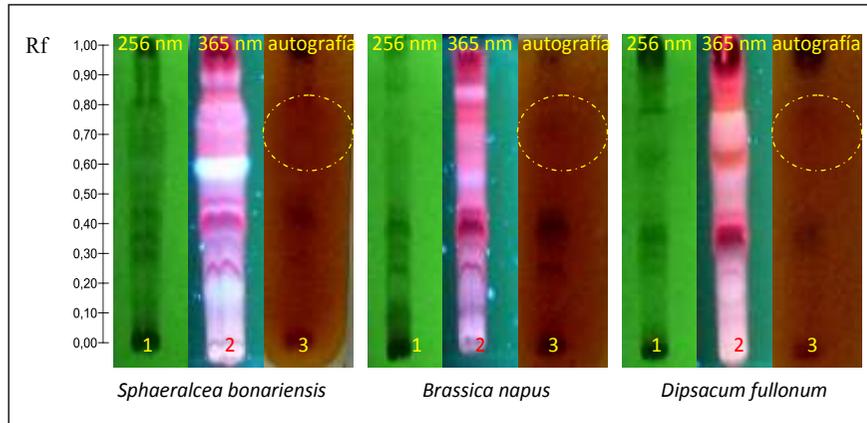


Figura 1: Cromatografía en capa delgada observada a 256 nm y 365 nm y bioautografías de las especies *Sphaeralcea bonaerensis*, *Brassic napus* y *Dispsacus fullonum* desarrolladas con tolueno: acetona: diclorometano (40:25:35). Los halos de inhibición de indican con círculos amarillos.

Cuando la fracción acetato de etilo de SS fue desarrollada con tolueno: acetona: diclorometano (40:25:35), mostró una amplia zona de inhibición entre los valores de Rf de 0,09 y 0,71. Varios compuestos fueron visualizados bajo luz UV entre estos valores de Rf, los cuales serían los responsables de este efecto inhibitorio (Figura 2).

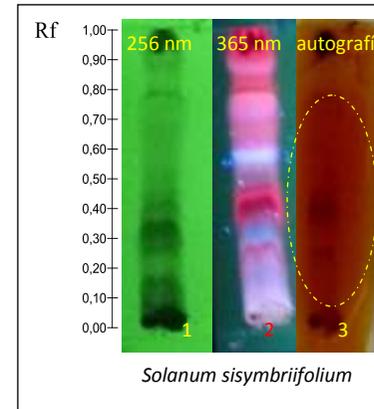


Figura 2: Cromatografía en capa delgada observada a 256 nm y 365 nm y bioautografías de la especie *Solanum Sisymbriifolium* desarrolladas con tolueno: acetona: diclorometano (40:25:35). Los halos de inhibición de indican con círculos amarillos

Las fracciones hexánicas fueron desarrolladas con hexano: acetato etilo (50:50) y reveladas en idénticas condiciones que las anteriormente descritas. SA mostró un halo inhibitorio en el punto de siembra, mientras que SB y BN mostraron un halo en la zona del extremo superior que corrió con el frente de solvente (Figura 3).

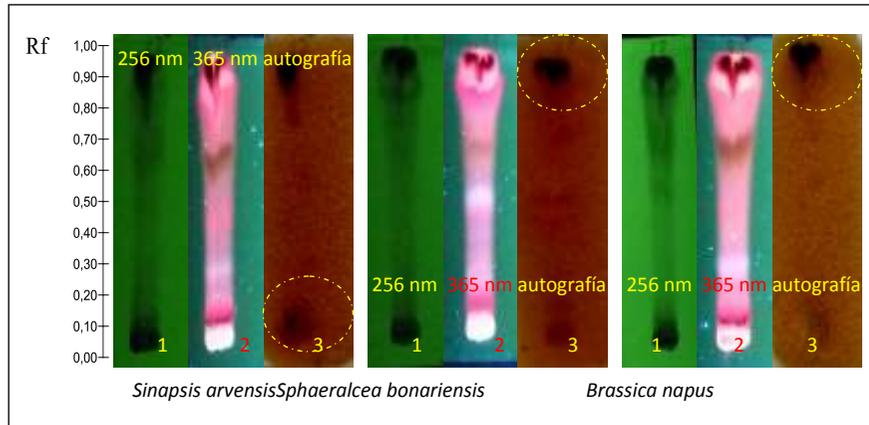


Figura 3: Cromatografía en capa delgada observada a 256 nm y 365 nm y bioautografías de las fracciones hexánicas de las especies *SA*, *SB* y *BN* desarrolladas con hexano: acetato etilo (50:50). Los halos de inhibición se indican con círculos amarillos

Sphaeralcea bonariensis, *Dipsacus fullonum* y *Sinapis arvensis* se utilizan en la medicina popular argentina para curar diferentes afecciones (Roig 2001, Scarpa 2004). *Brassica napus* L es una especie cultivada en el noroeste de la provincia de Buenos Aires. Se ha reportado efecto antifúngico a partir de las raíces del género *Brassica*. Este efecto fue atribuido a diferentes isotiocianatos de ocurrencia en este género (Angus *et al.* 1994). Se ha demostrado que *Sinapis arvensis* inhibe el crecimiento de hongos patógenos que atacan los cultivos de horticultura (Qasem y Abu-Blan 1996)

Las fracciones acuosas fueron desarrolladas con n-butanol: ácido acético: H₂O (50:10:40). No se pudo observar halo de inhibición luego del desarrollo lo que sugiere que la inhibición observada previamente, cuando la fracción se sembró en

punto, fue el resultado de la combinación de varios componentes de la mezcla que, una vez separados en la placa no lograron producir el mismo efecto.

CONCLUSIONES

La técnica bioautográfica, asociada a la cromatografía en capa delgada, permitió simultáneamente detectar la actividad inhibitoria del crecimiento fúngico y realizar una separación de los compuestos activos o grupos de estos, como un paso preliminar para su aislamiento e identificación. Es probable que algunas especies presenten efecto inhibitorio como resultado de la sinergia de más de un compuesto por lo que son candidatas a aplicaciones en las que puede utilizarse el extracto entero más que el aislamiento del compuesto activo. Por otra parte, las especies vegetales que crecen en nuestra zona demostraron ser una fuente interesante para la extracción de nuevos compuestos con actividad antifúngica.

REFERENCIAS

- Angus JF, Gardner PA, Kirkegaard JA, Desmarchelier JM. 1994. Biofumigation: Isothiocyanates released from Brassica roots inhibit growth of the take-all fungus. *Plant and Soil*, 162:107-112.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology). 2003. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report N° 139, Ames, Iowa, USA.
- Hadacek F and Greger H. 2000. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*, 11: 137–147.
- Harrison LR, Colvin BM, Greene JT, Newman LE, Cole Jr. JR. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1 a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostics and Investigation*, 2: 217-221.
- IARC (The International Agency for Research on Cancer). 2002. Fumonisin B1. En: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. International Agency for Research on Cancer, Lyons, France. pag 275-366.
- International Meeting of Aromatic and Medicinal Mediterranean Plants, Proceedings. 158–163 p.
- Jones C, Ciacci-Zanella JR, Zhang Y, Henderson G, Dickman M. 2001. Analysis of fumonisin B1-induced apoptosis. *Environmental Health Perspectives*, 109: 315-320.
- Matos O, Baptista S, Passarinho J, Delgado F, Ricardo C, Vilas-Boas L (1998) Watering and mineral supply effects on plant

production, on hydrossoluble metabolites content and on the antifungal properties of three aromatic plants used as spices. 1st

Matos O, Ricardo C, (2006). Screening of plants against fungi affecting crops and stored foods. In: Rai M, Carpinella, MC, editors. Advances in Phytomedicine, Volume 3. Naturally Occurring Bioactive Compounds. Elsevier, 139-170 p.

Mesterházy Á, Bartók T, Lamper C. (2003). Influence of wheat cultivar, species of *Fusarium*, and isolate aggressiveness on the efficacy of fungicides for control of *Fusarium* head blight. Plant Disease, 87: 1107-1115.

Prieto JA, Patiño OJ, Plazas EA, Pabón LC, Ávila MC, Guzmán JD, Delgado WA, Cuca LE. Natural Products from Plants as Potential Source Agents for Controlling *Fusarium*. En: Mizuho N, editor. Fungicides - Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World. <http://dx.doi.org/10.5772/52338>

Qasem J, Abu-Blan H. 1996. Fungicidal activity of some common weed extracts against different plant pathogenic fungi. Journal of Phytopathology, 144: 157-161.

Roig F. 2001. Flora medicinal mendocina. Las plantas medicinales y aromáticas de la provincia de Mendoza (Argentina). EDIUNC. Mendoza, 302 pp.

Ross PF, Rice LG, Osweiler GD, Nelson HA, Richard JL, Wilson TM. 1992. A review and up-date of animal toxicoses associated with fumonisina contaminated feeds and production of fumonisins by *Fusarium* isolates. Mycopathologia, 117: 109-114.

Scarpa GF. 2004. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. Journal of Ethnopharmacology, 91: 115-135.

Zacchino, S., Gupta, M. (Eds) (2007) Manual de técnicas in vitro para la búsqueda de compuestos antifúngicos, Edit. Corpus (Rosario, Argentina), 176 pp.

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD PREBIÓTICA *IN VIVO* DE LA HARINA DE LUPINO (*LUPINUS ALBUS*) EN RATAS WISTAR

Palacio M.I.*^{1,3}, Weisstaub A.R. ², Zuleta A. ², Etcheverría A.I. ³, Manrique G.D. ¹

⁽¹⁾ Núcleo de Investigación Tecnología de Semillas y Alimentos (TECSE). Departamento de Ingeniería Química. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA). Avda. del Valle 5737. Olavarría, Argentina.

⁽²⁾ Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires (UBA). Junín 954. CABA, Argentina.

⁽³⁾ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN), Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, Sanidad Animal y Medicina Preventiva (SAMP). Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA. Paraje Arroyo Seco s/n. Tandil, Argentina.

mipalacio@vet.unicen.edu.ar

Resumen: El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto prebiótico de los galactooligosacáridos provenientes de la harina de lupino (HL) sobre la microflora intestinal de las ratas. Doce ratas machos Wistar fueron alimentadas durante 60 días con dos dietas diferenciadas. Al grupo control (C) se le suministró la dieta *American Institute of Nutrition Diet* (AIN 93), mientras que al grupo en estudio (L) se lo alimentó con dieta AIN 93 suplementada con HL, conteniendo un 10% de fibra total. Se realizaron recuentos de enterobacterias y de lactobacilos de muestras de heces de animales recolectadas al

tiempo inicial, 20, 45 y 60 días, midiéndose además el pH final del contenido cecal del ciego de cada animal. Los resultados obtenidos demostraron una estabilidad en el número de lactobacilos durante los 60 días de alimentación, mientras que se registró una disminución significativa en los recuentos de enterobacterias en heces de animales del grupo L, en comparación a los del grupo C. Además, se obtuvieron valores de pH en contenido cecal significativamente menores para el grupo L. Los resultados obtenidos permiten considerar a los galactooligosacáridos provenientes de HL como un potencial ingrediente prebiótico para el desarrollo de alimentos funcionales.

Palabras claves: Lupino, galactooligosacáridos, prebiótico, balance intestinal.

Abstract: The aim of this study was to evaluate the prebiotic effect of galactooligosaccharides from lupine flour (LF) on the intestinal microflora of rats. Twelve male Wistar rats were fed with two differential diets for 60 days. The control group (C) was fed according to the *American Institute of Nutrition Diet* (AIN 93), while the study group (L) was fed with AIN93 diet supplemented with LF, containing 10% of total fiber. Counts of enterobacteria and lactobacilli in feces samples from animals collected at 0, 20, 45 and 60 days were carried out. Also, the final pH of cecal content of the cecum of each animal was measured. The results showed stability in the lactobacilli number within 60 days of feeding, whereas a significant decrease in the counts of enterobacteria in feces of animals in group L compared to group C was recorded. In addition, the pH values obtained for cecal contents were significantly lower for group L. The results obtained allowed to consider

galactooligosaccharides from LF as a potential prebiotic ingredient for the development of functional foods.

Keywords: Lupine, galactooligosaccharides, prebiotic, intestinal balance.

INTRODUCCIÓN

Los galactooligosacáridos (GOS) constituyen una familia de carbohidratos, cuyo primer representante (rafinosa) se obtiene por la unión de un residuo de galactosa a la glucosa de una molécula de sacarosa a través de un enlace α -(1 \rightarrow 6). Los oligosacáridos homólogos se forman por la unión consecutiva de residuos de galactosa adicionales mediante enlaces galactosídicos α -(1 \rightarrow 6), dando origen respectivamente, a la estaquiosa, verbascosa y ajugosa (Figura 1) (Kotiguda *et al.* 2006). Los GOS se encuentran ampliamente distribuidos en semillas de leguminosas, tal como el lupino (*Lupinus albus*) (Kuo *et al.* 1988, Gulewicz *et al.* 2000, Martínez-Villaluenga *et al.* 2005). Los seres humanos no disponen de la enzima α -galactosidasa necesaria para hidrolizar el enlace presente en estos oligosacáridos, de modo que, una vez ingeridos, llegan intactos al colon donde son fermentados preferentemente por microorganismos que son capaces de hidrolizarlos, tales como las bifidobacterias y los lactobacilos, promoviendo así su establecimiento y desarrollo. Los GOS son metabolizados por este tipo de bacterias anaeróbicas beneficiosas del colon, produciendo ácidos grasos de cadena corta (que reducen el pH), dióxido de carbono, hidrógeno y metano. El aumento de esta flora microbiana confiere una serie de efectos beneficiosos para el huésped, entre los que pueden citarse: aumento de resistencia a especies bacterianas intestinales patógenas, tanto exógenas como las de la propia flora intestinal (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Listeria spp.*, etc.), disminución de la intolerancia a la lactosa, mejora del sistema inmune, aumento de la biodisponibilidad de minerales, acción positiva sobre el metabolismo lipídico y

disminución del riesgo de contraer enfermedades intestinales infecciosas, enfermedades cardiovasculares, diabetes no dependiente de insulina, obesidad, osteoporosis y algunos tipos de cáncer (Delzenne y Roberfroid 1994, Gibson GR y Roberfroid MD 1995, Salminen *et al.* 1998, Schaafsma *et al.* 1998, Zubillaga *et al.* 2001). Al promover el crecimiento de estos microorganismos beneficiosos para la salud, los GOS son considerados compuestos con actividad prebiótica, haciendo posible su uso como ingrediente de alimentos funcionales. Estudios previos realizados *in vitro*, demostraron un *score* de actividad prebiótica positivo para extractos de GOS obtenidos a partir de semillas de lupino (Palacio *et al.* 2014).

Teniendo en cuenta que la capacidad de una sustancia para ser considerada un ingrediente con capacidad prebiótica viene dada por su capacidad de estimular el crecimiento y proliferación de especies benéficas de la microflora intestinal, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar el efecto prebiótico *in vivo* de los GOS provenientes de la harina de lupino sobre la microflora intestinal de ratas Wistar.

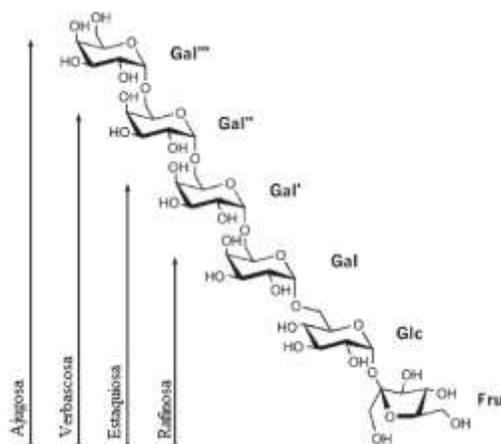


Figura 1. Relación estructural de galactooligosacáridos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Harina de Lupino. Las semillas de lupino (*Lupinus albus*) fueron adquiridas en un mercado local y conservadas en bolsas de polietileno hasta su uso. Las mismas, desprovistas de su tegumento, fueron molidas en un molinillo para cereales (Mod. TDMC, TecnoDalvo, Argentina) y la harina resultante fue tamizada por malla metálica (mesh 32) para obtener un tamaño de partícula final homogéneo.

Ratas y dietas. Se utilizaron doce ratas Wistar machos (peso corporal: $44,1 \pm 2,9$ g) provenientes del Laboratorio de Servicio Animal de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA. Durante el ensayo, los animales tuvieron libre acceso al consumo de agua desionizada y alimento, y fueron alojadas en jaulas individuales de acero inoxidable a 21 ± 1 °C de

temperatura, $60 \pm 10\%$ de humedad ambiente y sometidas a ciclos de luz-oscuridad de 12 h. Las ratas fueron alimentadas durante un período de 60 días con las siguientes dietas (n = 6 por grupo):

1) Grupo control (C): ratas alimentadas con dieta semi-sintética *American Institute of Nutrition Diet* (AIN 93), conteniendo 5% de celulosa.

2) Grupo lupino (L): ratas alimentadas con dieta AIN 93, conteniendo 10 % de fibra total de harina de lupino.

Los análisis de las dietas confirmaron que eran isocalóricas y que suministraban una cantidad similar de macronutrientes, 0,5 % de calcio y 0,3 % de fósforo (Tabla 1). El contenido de GOS en harina de lupino se determinó según el método de Muzquiz *et al.* (1992) por HPLC, resultando rafinosa, estaquirosa y verbascosa los principales azúcares identificados y cuantificados (resultados no mostrados) (Palacio *et al.*, 2013). Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con el Instituto Nacional de Guía de la Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y fue aprobado por el Comité de Guía de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA.

Al final del ensayo, las ratas fueron anestesiadas con inyección intraperitoneal de 0,1 mg/100 g de peso corporal de ketamina clorhidrato + 0,1 mg/100 g de peso corporal de maleato de acepromazina.

Tabla 1. Composición de dieta control y lupino.

Ingredientes (g/100 g dieta)	Control	Lupino
Proteínas*	20,0	16,64
Lípidos**	7,0	4,77
Mix de minerales***	3,5	1,99
Mix de vitaminas***	1,0	1,0
Colina	0,15	0,15
Celulosa	5,0	---
Harina de lupino	---	42,55
Dextrina	Hasta completar 100 g	Hasta completar 100 g

*Caseinato de potasio, Nestlé Argentina S.A., conteniendo 85,1% de proteína y 0,995 % de Ca.

**Aceite de soja comercial.

***Composición según AIN 93 M-MX.

Recuento y condiciones de cultivo de enterobacterias y lactobacilos. Se realizaron siembras, con las correspondientes diluciones, para el recuento de enterobacterias en agar Mac Conkey y de lactobacilos en agar MRS (Britania, Argentina) utilizando muestras de heces de ambos grupos de animales recolectadas a tiempo inicial, 20, 45 y 60 días respectivamente. Los cultivos de enterobacterias fueron incubados a 37 °C durante 24 h, mientras que los de lactobacilos se incubaron a la misma temperatura, durante 48 h en anaerobiosis.

pH del contenido cecal. Se registró el pH del contenido cecal del ciego de cada animal a tiempo final (60 días) utilizando peachímetro digital portátil (HI-98103, Hanna, EE.UU.) previamente calibrado.

Análisis estadístico. Todos los datos se expresaron como la media y desviación estándar. Los resultados se interpretaron utilizando análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas ($p < 0,05$), utilizando Infostat versión 2011.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Balance intestinal

En la Tabla 2 se presentan los recuentos obtenidos de enterobacterias y lactobacilos en la microbiota intestinal de ratas alimentadas a distintos tiempos, con dieta suplementada con harina de lupino y grupo control, respectivamente. Se seleccionó la población de enterobacterias como indicador de flora patógena y la de lactobacilos como indicador de flora beneficiosa. El ratio entre ambas poblaciones se utilizó para señalar el balance intestinal de los animales (Castillo *et al.* 2006). Los recuentos de ambas poblaciones se determinaron en heces.

Tabla 2. Poblaciones bacterianas en heces de ratas machos Wistar ($\log \text{UFC g}^{-1}$). Cada valor es el promedio \pm el desvío estándar de triplicados. Medias con una misma letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Dieta		
	Control	Lupino
Enterobacterias		
Día 0	6,85 \pm 0,18b	3,65 \pm 0,23a
Día 20	9,05 \pm 0,16b	4,03 \pm 0,16a
Día 45	9,14 \pm 0,25b	3,83 \pm 0,14a
Día 60	9,57 \pm 0,63b	3,18 \pm 0,49a
Lactobacilos		
Día 0	8,47 \pm 0,08a	8,64 \pm 0,06a
Día 20	8,44 \pm 0,15a	8,61 \pm 0,11a
Día 45	9,57 \pm 0,25a	9,30 \pm 0,16a
Día 60	9,55 \pm 0,15a	9,65 \pm 0,12a
Lactobacilos:enterobacterias**		
Día 60	-0,02 \pm 0,65a	6,47 \pm 0,50b

*Valor medio de 6 ratas.

**Ratio entre las poblaciones de lactobacilos y enterobacterias.

Los resultados obtenidos demostraron una estabilidad en el número lactobacilos durante los 60 días de alimentación, mientras que se registró una disminución significativa en los recuentos de enterobacterias en heces provenientes de animales del grupo L en comparación a los del grupo C. Ensayos previos realizados *in vitro* mostraron resultados consistentes con los presentes obtenidos *in vivo* (Palacio *et al.* 2014).

pH contenido cecal

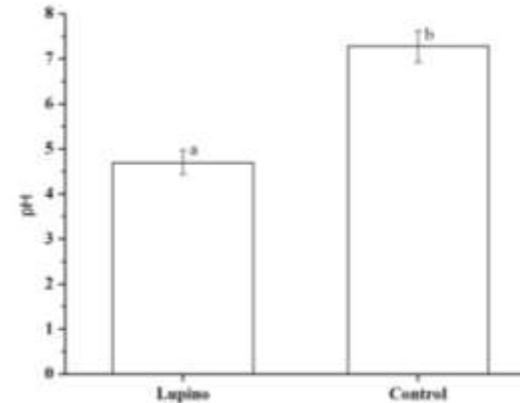


Figura 2. pH del contenido cecal de ratas alimentadas durante 60 días con harina de lupino y dieta control. Medias con una misma letra en común no son significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Además del análisis de balance intestinal de las ratas, se registró el pH del contenido cecal *post mortem* de cada animal como indicador de fermentación (60 días). Se obtuvieron diferencias significativas entre los valores de pH en contenido cecal de ambos grupos de animales. Así, se registró un pH de $4,70 \pm 0,27$ para el grupo L, mientras que en el grupo C el valor correspondiente resultó de $7,28 \pm 0,35$ (Figura 2). Este descenso de pH podría atribuirse a la fermentación microbiana de los GOS en el intestino de ratas alimentadas con dieta suplementada con harina de lupino.

CONCLUSIONES

Se investigó el efecto prebiótico *in vivo* de GOS provenientes de harina de lupino sobre la microflora intestinal de ratas Wistar. Los resultados obtenidos demostraron que los citados oligosacáridos provocaron una estimulación selectiva para la proliferación de la microflora intestinal beneficiosa en los animales. El menor valor de pH del contenido cecal de ratas alimentadas con harina de lupino en comparación al correspondiente al grupo control, podría ejercer un efecto regulador en el desarrollo selectivo de especies de lactobacilos, las que a su vez, provocarían una inhibición o retardo en el desarrollo de bacterias entéricas intestinales. Los resultados obtenidos permiten considerar a los GOS provenientes de harina de lupino como un potencial ingrediente prebiótico para el desarrollo de alimentos funcionales.

BIBLIOGRAFÍA

- Castillo M, Martín-Orúe SM, Roca M, Manzanilla EG, Badiola I, Perez JF, Gasa J. 2006. The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 84: 2725-2734.
- Delzenne NM y Roberfroid MR. 1994. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 27: 1-6.
- Gibson GR y Roberfroid MD. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125:1401-1412.
- Gulewicz P, Ciesiolka D, Frias J, Vidal-Verde C, Frejnagel S, Trojanowska K y Gulewicz K. 2000. Simple method of isolation and purification of α -galactosides from legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3120-3123.
- Kotiguda G, Peterbauer T y Mulimani VH. 2006. Isolation and structural analysis of ajugose from *vigna mungo* l. *Journal of carbohydrate research*, 341: 2156-2160.
- Kuo TM, VanMiddlesworth FJ y Wolf WJ. 1988. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36: 32-36.
- Martínez-Villaluenga C, Frías J, Vidal-Valverde C. 2005. Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 spanish lupin cultivars. *Food Chemistry*, 91: 645-649.
- Muzquiz M, Rey C y Cuadrado C. 1992. Effect of germination on the oligosaccharide content of lupin species. *Journal of Chromatography*, 607: 349-352.
- Palacio MI, Mateo CM, Etcheverría AI, Manrique GD. 2013. Actividad prebiótica *in vitro* de galactooligosacáridos

obtenidos de semillas de lupino (*Lupinus albus*) y zapallo (*Curcubita maxima*). Anales XIV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. ISBN: 978-987-22165-5-9. ID: 218.

Palacio MI, Etcheverría AI, Manrique GD. 2014. Fermentation by *Lactobacillus paracasei* of galactooligosaccharides and low-molecular-weight carbohydrates extracted from squash (*Curcubita maxima*) and lupin (*Lupinus albus*) seeds. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 3 (4) 329-332.

Salminen S, Bouley C, Boutron Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Mores MC, Roberfroid M y Rowland I. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. British Journal of Nutrition, 80: 147–171.

Schaafsma G, Meuling WJA, van Dokkum W y Bouley C. 1998. Effect of a milk product, fermented by *L. acidophilus* and with fructo-oligosaccharides added, on blood lipids in male volunteers. European Journal of Clinical Nutrition, 52: 436–440.

Zubillaga M, Weill R, Postaire E, Goldman C, Caro R y Boccio J. 2001. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. Nutrition Research, 21: 69–579.

FUNCIONALIDAD DE LA BACTERIOCINA SAKACINA Q -APLICADA MEDIANTE INMERSIÓN- SOBRE SALCHICHAS TIPO VIENA

Rivas F.P.^{1,3}, Castro M.P.^{1,3}, Campos C.A.^{2,3}

(1) Universidad Nacional del Chaco Austral, Comandante Fernández 755, Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina.

(2) Universidad de Buenos Aires, Int. Güiraldes s/n, Ciudad Universitaria, CABA, Argentina.

(3) CONICET.

mcastro@uncaus.edu.ar

Resumen: El objetivo del ensayo fue determinar la funcionalidad de la bacteriocina sakacina Q aplicada a salchichas mediante inmersión en suspensiones con distintas concentraciones del antimicrobiano. Los sistemas de inmersión fueron: *a)* suspensión de *L. curvatus* ACU-1; *b)* Sobrenadante Libre de Células (SLC) de ACU-1; *c)* SLC ACU-1 mas suspensión ACU-1; *d)* control (caldo MRS). La mitad de cada lote de salchichas se sumergió en una suspensión de *Listeria innocua* Éstas se envasaron al vacío y se almacenaron a $7\pm 1^\circ$ C durante 29 días. Se realizaron recuentos periódicos de: bacterias lácticas (BL); aeróbicos totales; enterobacterias; *Brochothrix* spp. y *Listeria*. Los distintos tratamientos fueron efectivos frente a BL y mesófilos totales desde el inicio del ensayo mostrando diferencias significativas respecto al control. El número de enterobacterias estuvo por debajo del límite de detección. A partir de los 4 días se observó una reducción significativa del recuento de *Brochothrix* spp. Sobre *Listeria*, la inhibición de los sistemas *a*, *b* y *c* fue significativa a partir del segundo día de almacenamiento. Los sistemas

conteniendo el SLC tuvieron el mayor efecto inhibitorio. Se infiere entonces que la sakacina Q aplicada de esta forma resultaría promisorio para la biopreservación de estos productos.

Palabras clave: sakacina Q, salchichas tipo Viena, funcionalidad de bacteriocina

Abstract: The aim of the study was to determine the functionality of the bacteriocin sakacin Q applied to Viena-type sausages by immersion into suspensions with different concentrations of the antimicrobial. Immersion systems were: *a)* *L. curvatus* ACU-1 suspension; *b)* ACU-1 Cell-free Supernatant (CFS); *c)* ACU-1 CFS plus ACU-1 suspension; *d)* control system (MRS broth). Half of each batch of sausages was immersed in a suspension of *Listeria innocua*. They were vacuum-packed and stored at $7\pm 1^\circ$ C for 29 days. Periodic counts were performed for: lactic acid bacteria (LAB); total mesophiles; *Enterobacteriaceae*, *Brochothrix* spp. and *Listeria*. The different treatments were effective against LAB and total mesophilic from the baseline. The number of *Enterobacteriaceae* was below the detection limit. After 4 days a significant reduction in count of *Brochothrix* spp was observed. Systems *a*, *b* and *c* showed a significant inhibition from the second day of storage against *Listeria*. Systems containing the bacteriocin in the CFS had the maximum inhibitory effect. According to the results, the application of sakacin Q on sausage by dipping could be successfully applied for the biopreservation of these products.

Keywords: sakacin Q, Viena-type sausages, bacteriocin functionality.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, en la industria de alimentos existe una tendencia creciente en cuanto al empleo de preservadores a fin de lograr el reemplazo total o parcial de los antimicrobianos sintéticos "químicos" por otros de origen natural que son percibidos por los consumidores como más saludables. Las industrias alimentarias de la provincia del Chaco, si bien no desconocen esta tendencia, continúan produciendo alimentos con tecnologías de preservación básica y, por ende, necesitarían adecuarse a las exigencias del mercado. En este contexto, las industrias provinciales elaboradoras de productos cárnicos deberían introducir innovaciones de tipo tecnológico a fin de ofrecer a sus futuros mercados productos con características sensoriales típicas y de buena calidad.

La creciente utilización de bacteriocinas y/o sustancias antagónicas como parte de un sistema de barreras múltiples para la biopreservación de alimentos constituye una alternativa viable en el marco de la producción local de productos cárnicos. Consecuentemente, el empleo de estas sustancias naturales podría contribuir a mejorar la calidad y seguridad de los mismos.

La producción de bacteriocinas se lleva a cabo durante la fase de crecimiento exponencial o al final de la misma, manteniendo una estrecha relación con la producción de biomasa (Cleveland y col., 2001). Cuando las cepas bioprotectoras se van a utilizar en la carne o sus derivados, los cultivos microbianos deben mantener su actividad inhibidora a bajas temperaturas y no modificar significativamente el pH de los mismos. Al evaluar un cultivo bacteriocinogénico para

la fermentación y/o la biopreservación de la carne y sus productos, la naturaleza compleja de los mismos es un factor clave a tenerse en cuenta. Se debe considerar si la producción de bacteriocina es *in situ* o *ex situ*, ya que muchos parámetros ambientales influyen en el crecimiento y la producción metabólica. Por lo tanto, para la selección de una cepa bacteriocinogénica se deben tener en cuenta su capacidad para crecer y producir la bacteriocina *in situ*, la difusión de la bacteriocina a través de la carne (Dicks y col., 2004), su adsorción a componentes de los alimentos, tales como proteínas y grasas (Aasen y col., 2003), la influencia de los ingredientes específicos, a saber, cloruro de sodio y nitrito (Verluyten y col., 2003), y también las condiciones que podrían desestabilizar la actividad biológica de la bacteriocina (Sarantinopoulos y col., 2002).

En los productos cárnicos cocidos, los cultivos protectores han sido evaluados principalmente por su potencial para inhibir los patógenos alimenticios tales como *Listeria monocytogenes* (Amezquita y Brashears, 2002; Budde y col., 2003; Mataragas y col., 2003). Sin embargo, se sabe menos sobre la posibilidad de utilizar cultivos protectores para prolongar la vida útil de estos productos (Vermeiren y col., 2006).

Como el desarrollo de la población microbiana responsable del deterioro de las carnes curadas envasadas al vacío se produce esencialmente en la superficie de los productos, la eficacia de un tratamiento antimicrobiano puede ser mejorada mediante la aplicación del compuesto antimicrobiano en la superficie de las carnes cocidas. En los productos cárnicos mínimamente tratados con calor, curados, envasados al vacío y refrigerados, tales como las salchichas de Viena, las bacteriocinas se pueden aplicar para inhibir el deterioro por BL seleccionadas por la baja temperatura de almacenamiento,

la presencia de nitrito y sales de curado, y condiciones de microaerofilia (Barros y col., 2010). La salchicha es el producto más antiguo y de mayor arraigo de la carne procesada; para su elaboración, los intestinos de ovejas, de cerdos y de terneras se han utilizado durante miles de años como un recipiente comestible (Wijnker y col., 2006). Estas carcasas naturales están contaminadas con bacterias de importancia para la salud pública, tales como estreptococos fecales, enterobacterias y coliformes (Byun y col., 2001). Estos microorganismos podrían representar un riesgo para la salud del consumidor. Estas cubiertas normalmente se conservan mediante salazón, curado, secado y/o congelado (Houben y col 2005). La congelación y la salazón al ser procedimientos bacteriostáticos no son eficaces en la eliminación de contaminantes y microorganismos patógenos. En función de lo expuesto, el empleo de tripa ovina natural como soporte para la aplicación de bacteriocinas en la bioconservación de salchichas tipo Viena resulta prometedor.

En trabajos previos, se verificó que el empleo de la cepa bacteriocinogénica *Lactobacillus curvatus* ACU-1 sobre la superficie de carne de cerdo cocida inhibe el crecimiento de *L. innocua* sin perder efectividad por adsorción a los tejidos grasos o cárnicos (Rivas y col., 2014). En consecuencia, su aplicación en productos cárnicos como cultivo protector y/o como parte de un cultivo iniciador resulta prometedora. Es por esto que el objetivo de este ensayo fue determinar la funcionalidad de la bacteriocina sakacina Q aplicada superficialmente en salchichas, mediante inmersión de las mismas en suspensiones con distintas concentraciones del antimicrobiano estudiado y/o la cepa productora *L. curvatus* ACU-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Funcionalidad de la bacteriocina aplicada sobre salchichas por inmersión

Las salchichas tipo Viena utilizadas en este estudio fueron elaboradas en una planta industrial local (Cooperativa "La Unión" Ltda., Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco), bajo las condiciones operativas normales. Cabe aclarar que el alimento en cuestión se comercializa en forma refrigerada, sin envasar y con un tiempo de anaquel de aproximadamente 3-4 días. Las salchichas fueron transportadas al laboratorio en forma aséptica, y seguidamente se sometieron a 8 tratamientos diferentes, sumergiéndolas durante 10 segundos en 500 ml de los siguientes sistemas: *a*) Suspensión de *L. curvatus* ACU-1 (10^6 UFC.ml⁻¹); *b*) Suspensión de *L. curvatus* ACU-1 (10^6 UFC.ml⁻¹), luego en suspensión de *L. innocua* (10^6 UFC.ml⁻¹); *c*) Sobrenadante Libre de Células (SLC) de ACU-1 (800 UA.ml⁻¹) obtenido mediante centrifugación (4000 rpm, 10 minutos) y posterior filtrado (0,22 micrones de tamaño de poro); *d*) SLC ACU-1 (800 UA.ml⁻¹), luego en suspensión de *Listeria* (10^6 UFC.ml⁻¹); *e*) SLC ACU-1 (800 UA.ml⁻¹) + suspensión ACU-1 (10^6 UFC.ml⁻¹); *f*) SLC ACU-1 (800 UA.ml⁻¹) + suspensión ACU-1 (volumen total del sistema: 500 ml), luego en suspensión de *Listeria* (10^6 UFC.ml⁻¹); *g*) Control (caldo MRS); *h*) Suspensión de *Listeria* (10^6 UFC.ml⁻¹). Las salchichas fueron envasadas al vacío en bolsas de polietileno (permeabilidad al oxígeno: 70 [cm³m⁻²24h⁻¹atm⁻¹]) a 25° C y 75% HR) y almacenadas a 7±1° C durante 29 días. Se tomaron muestras después de 0, 2, 4, 6, 8, 13, 16, 23 y 29 días de almacenamiento. Los ensayos se realizaron por duplicado. Para realizar los recuentos se tomó un gramo de muestra, se colocó en bolsas de stomacher y se agregaron 9 ml de agua de peptona estéril, luego se procedió

a homogeneizar. A partir de este homogenato se realizaron las diluciones correspondientes para el recuento microbiano, en los siguientes medios: MRS (de Man, Rogosa & Sharpe; Biokar Diagnostics, Francia), para recuento bacterias lácticas; PCA (Plate Count Agar, Agar para Recuento en Placa, Oxoid, Reino Unido), para de aeróbicos totales; VRBg (Violeta Rojo Bilis glucosa Agar, Britania, Argentina), para enterobacterias; STAA (Estreptomina Talio Acetato Actidiona agar, Britania, Argentina), para *Brochothrix* spp y Palcam agar (Biokar Diagnostics, Francia), para *L. innocua*. Los recuentos de *L. innocua* se realizaron únicamente en aquellos sistemas donde este microorganismo fue agregado *ex profeso*. Los resultados obtenidos se expresaron como Log UFC.g⁻¹.

Análisis estadísticos

El ensayo se repitió dos veces y cada determinación se realizó por triplicado. El análisis estadístico de los datos (análisis de varianza $p < 0,05$ y el método de Tukey) se realizó con el software Statgraphics Plus versión 5.0 (Manugistics Inc., Estados Unidos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Funcionalidad de la bacteriocina aplicada sobre salchichas por inmersión

Los recuentos de los distintos grupos microbianos evaluados durante este estudio se muestran en la Figura 1.

La microbiota deteriorante asociada a estos productos cárnicos cocidos está representada principalmente por BL, que colonizan la superficie cárnica una vez que el producto está listo para consumo. Su proliferación a lo largo del almacenamiento trae aparejado la formación de exudados

lechosos, hinchamiento de los empaques, enverdecimiento, off-odors y off-flavors. El predominio de las BL continúa a lo largo del almacenamiento refrigerado y el control de los procesos de alteración en carnes procesadas se hace difícil por la naturaleza psicotrófica, microaerofílica, resistencia a nitritos, sales y ahumado de estas bacterias (Cayré y col., 2003). En base a las características mencionadas, cabe enfatizar que, en este estudio se observó que la aplicación de bacteriocinas por inmersión produjo una reducción en los recuentos de BL. La efectividad de los distintos tratamientos con el biopreservador frente a las BL se comprobó desde el inicio hasta los 8 días de ensayo, mostrando diferencias significativas respecto al control sin inocular y al control con *Listeria* (Figura 1, panel A). El sistema con SLC fue el más efectivo. A partir de los 16 días, solo los sistemas que contenían el SLC (con y sin la suspensión bacteriana de ACU-1) presentaron una inhibición significativa de las BL. Cabe resaltar estos resultados en comparación con otros estudios, donde Barros y col. (2010) no reportan una inhibición de BL al tratar las salchichas con nisina en medio ácido, condición que facilitaría su actividad. En lo que respecta al recuento total de microorganismos (Figura 1, panel B), desde el tiempo inicial se observaron diferencias significativas entre los sistemas tratados y el control. Los tratamientos más efectivos resultaron los realizados con SLC (ya sea con el agregado de la suspensión de ACU-1 como sin la misma). La suspensión de ACU-1 (sistema *a*) mostró menor efectividad, pero significativa en la reducción del recuento total a partir de los 2 días hasta los 13 días de almacenamiento. Resultados similares fueron reportados por otros autores (Martinez y col., 2002; Geonaras y col., 2006;), sin embargo, éstos atribuyen dicha actividad inhibitoria a los bajos valores de pH de las soluciones de las bacteriocinas. En nuestro estudio, es de

resaltar que los SLC usados fueron neutralizados antes de los ensayos pertinentes, por ende las actividades antimicrobianas observadas son atribuibles a la acción específica de la bacteriocina. Cayré (2006) al analizar salchichas tipo Viena envasadas en bolsas de polietileno cuya permeabilidad concuerda con las utilizadas en nuestro estudio, reportó recuentos de mesófilos totales y BL que se incrementaron en una semana hasta 7,5-8,2 (Log UFC.g⁻¹), recuentos similares fueron presentados por nuestro sistema control, considerando el mismo período de tiempo. Mientras que los sistemas que fueron tratados con el antimicrobiano disminuyeron y retrasaron estos recuentos 2 ciclos Log hasta los 14 días de almacenamiento.

En todos los casos, el número de enterobacterias estuvo por debajo del límite de detección, característica deseada ya que la presencia de este género bacteriano es indicio de contaminación.

Además de las BL, *Brochothrix thermosphacta* también se encuentra como un componente numéricamente significativo en la microbiota de los productos cárnicos almacenados al vacío y refrigerados (Samelis y col., 2000). El crecimiento y el metabolismo de *B. thermosphacta* en productos cárnicos dependen de factores tales como pH, temperatura, ambiente gaseoso y disponibilidad de nutrientes (Cayré y col., 2005). En este estudio, el recuento de *Brochothrix* spp., a partir de los 4 días de almacenamiento, mostró diferencias significativas entre el sistema control y los distintos sistemas tratados con la bacteriocina, siendo los más efectivos los sistemas tratados con SLC, con y sin la suspensión celular de ACU-1 (Figura 1, panel C). Al cabo de 13 días de almacenamiento, se presentó una reducción significativa del microorganismo indicador en cuestión por parte del sistema constituido por el SLC más la

suspensión microbiana de la bacteria láctica; pero, en ninguno de los sistemas se logró una inhibición tan marcada como en el ensayo de adsorción de la bacteriocina a la tripa ovina tratada con el SLC concentrado, donde se registró una reducción de cuatro ciclos log en el recuento de *Brochothrix* spp. (Rivas, 2014). Al estudiar salchichas tipo Viena en iguales condiciones a las utilizadas en nuestro sistema control, Cayré (2006) registró recuentos de *Brochothrix* spp. de 7,07 (LogUFC.g⁻¹) a los 15 días de almacenamiento, seguido por una reducción del recuento; el mismo comportamiento fue presentado por el sistema control en nuestro estudio, mientras que los sistemas tratados reportaron las reducciones citadas.

En relación a los recuentos de *Listeria* (Figura 1, panel D), se observó una reducción significativa en los sistemas con SLC (con y sin suspensión de ACU-1) respecto al sistema que solo se inoculó con el microorganismo target, en los muestreos correspondientes a los tiempos 2, 4 y a partir de los 16 días de almacenamiento. Cabe resaltar estos resultados respecto a los presentados por Ben Hammou y colaboradores (2010), quienes reportan que cuando se aplicó nisina, sin ningún coadyuvante, ésta no presentó ningún efecto antilisterial antes de los 20 días en salchichas elaboradas con tripa ovina tratada. En trabajos previos de aplicación de sakacina Q sobre tripa ovina antes de la fabricación de las salchichas (Rivas, 2014), recién a los 16 días de almacenamiento se registró una reducción significativa de *Listeria*. Observándose en el presente estudio que, en los recuentos correspondientes a los días 6, 8 y 13, se presenta una inhibición significativa de *Listeria* en los tres sistemas que contienen la bacteriocina, siendo el más eficiente el sistema del SLC más la suspensión, seguido por el que sólo contenía el SLC y por último el

sistema constituido por la suspensión de la cepa bacteriocinogénica. Resultados similares fueron reportados por Geonaras y col. (2004), quienes realizaron un estudio sobre salchichas tipo Frankfurt inoculadas con *L. monocytogenes* sumergidas en solución de nisina, encontrando que esta bacteriocina redujo significativamente el recuento de *Listeria*.

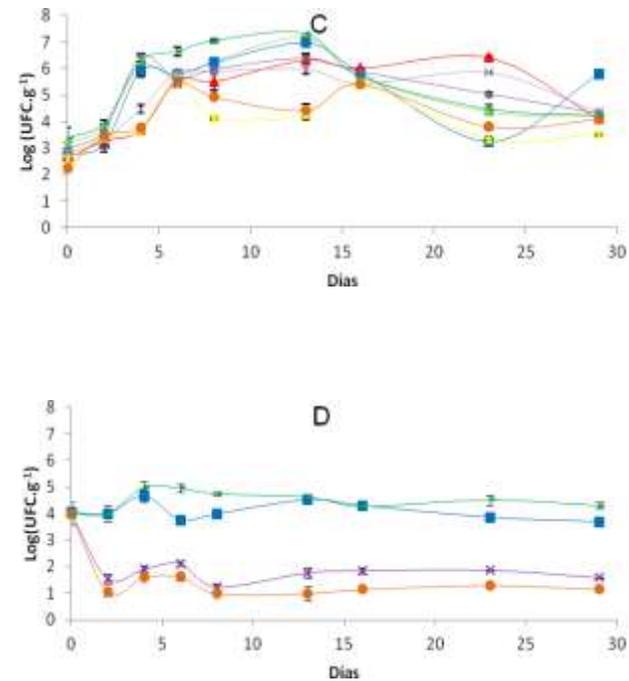
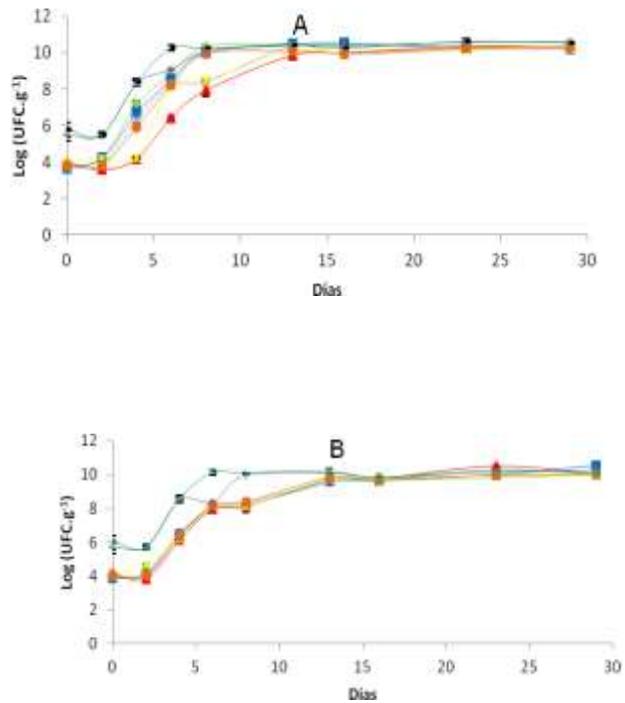


Figura 1. Evolución de los recuentos microbianos realizados sobre salchichas tipo Viena, expresados como Log (UFC.g⁻¹); Panel A: Bacterias Lácticas; Panel B: Mesófilos Totales; Panel C: *Brochothrix* spp.; Panel D: *Listeria innocua*; (◆) suspensión de ACU-1; (■) suspensión de ACU-1, luego en suspensión de *L. innocua*; (▲) SLC de ACU-1; (×) SLC ACU-1, luego en suspensión de *Listeria*; (⌘) SLC ACU-1 + suspensión ACU-1; (●) SLC ACU-1 + suspensión ACU-1, luego en suspensión de *Listeria*; (+) control; (-) suspensión de *Listeria*.

CONCLUSIONES

La bacteriocina en estudio, sakacina Q, es efectiva para el control de *Listeria*. El tratamiento más eficiente contra esta microbiota patógena lo constituyó la aplicación del sistema SLC más la suspensión de la cepa productora de bacteriocina. Además, cabe destacar que la aplicación por inmersión de las salchichas en los distintos sistemas que contenían el antimicrobiano mostró inhibir tanto las bacterias lácticas alterantes como los microorganismos mesófilos a partir del tiempo inicial de muestreo. Respecto al recuento total de microorganismos, los tratamientos más efectivos resultaron los realizados con SLC (ya sea con el agregado de la suspensión de ACU-1 como en ausencia de la misma). Los SLC usados fueron neutralizados antes de los ensayos pertinentes, por ende las actividades antimicrobianas observadas son atribuibles a la acción específica de la bacteriocina estudiada. La flora alterante asociada a las BL, representada por *Brochothrix* spp., resultó altamente inhibida. Por otro lado, cabe resaltar que sakacina Q se mantuvo activa en todo el período de tiempo estudiado bajo todas las condiciones ensayadas.

En base a los resultados obtenidos en este estudio, se infiere que la bacteriocina sakacina Q, producida por *Lactobacillus curvatus* ACU-1, resulta altamente efectiva para la biopreservación de salchichas tipo Viena envasadas al vacío y almacenadas bajo refrigeración. Esta bacteriocina inhibe microorganismos deteriorantes característicos de éstos productos tales como *Brochothrix* spp. y Bacterias Lácticas, como así también a *Listeria monocytogenes*, bacteria

patógena ubicua con una elevada prevalencia en muchos alimentos. De este modo, este trabajo sienta las bases para introducir innovaciones tecnológicas en las operaciones industriales, favoreciendo la inserción de los productos cárnicos provinciales en nuevos mercados, promoviendo la expansión de las empresas locales. La aplicación de ésta técnica de bioconservación en las salchichas permitiría a las industrias provinciales adecuarse a las exigencias de los consumidores actuales de productos "más naturales" o con menor cantidad de aditivos químicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aasen IM, Markussen S, Møretrø T, Katla T, Axelsson L, Naterstad K. 2003. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, 87: 35–43.
- Amezquita A, Brashears MM. 2002. Competitive inhibition of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products by lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 65: 316–325.
- Barros JR, Kunigk L, Jurkiewicz CH. 2010. Incorporation of Nisin in natural casing for the control of spoilage microorganisms in vacuum packaged sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 1001-1008.
- Ben Hammou F, Skali SN, Idaomar M, Abrini J. 2010. Combinations of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage casings stored at 6°C. *African Journal of Biotechnology*, 9: 1190-1195.

- Budde BB, Hornbaek T, Jacobsen T, Barkholt V, Koch AG. 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification and meat application experiments. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 171–184.
- Byun MW, Lee JW, Jo C, Yook HS. 2001. Quality properties of sausage made with gamma irradiated natural pork and lamb casing. *Meat Science*, 59: 223–228.
- Cayré ME, Vignolo G, Garro O. 2003. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures. *Food Microbiology*, 20: 561–566.
- Cayré ME, Garro O, Vignolo G. 2005. Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsions. *Food Microbiology*, 22: 505–512
- Cayré ME. 2006. Tesis Doctoral. Efecto de la temperatura y la permeabilidad al oxígeno del envase sobre el crecimiento de alterantes de emulsiones cárnicas-modelos predictivos. Chaco, Argentina: Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Agroindustrias.
- Cleveland J, Monteville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1–20.
- Dicks LMT, Mellett FD, Hoffman LC. 2004. Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Science*, 66: 703–708.
- Geornaras I, Skandamis PN, Belk KE, Scanga JA, Kendall PA, Smith GC, Sofos J. 2006. Postprocess control of *Listeria monocytogenes* on commercial frankfurters formulated with and without antimicrobials and stored at 10°C. *Journal of Food Protection*, 69: 53–61.
- Geornaras I, Belk KE, Scanga JA, Kendall PA, Smith GC, Sofos JN. 2004. Antimicrobial dipping treatments to control *L. monocytogenes* in commercial frankfurters and smoked sausages. Departmental Research Reports, Department of Food Science and Human Nutrition, Colorado State University, ABD. 255–257.
- Houben JH, Bakker WAM, Keizer G. 2005. Effect of trisodium phosphate on slip and textural properties of hog and sheep natural casings. *Meat Science*, 69: 209–214.
- Martinez YB, Ferrer K, Salas EM. 2002. Combined effects of lactic acid and nisin solution in reducing levels of microbiological contamination in red meat carcasses. *Journal of Food Protection*, 65: 1780–1783.
- Mataragas M, Drosinos EH, Metaxopoulos J. 2003. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced, cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4°C. *Food Microbiology*, 20: 259–265.
- Rivas F, Castro M, Campos C. 2014. Adsorción y funcionalidad de la bacteriocina sakacina Q sobre tripa ovina. III Jornadas de Investigación en Ingeniería del NEA y Países Limítrofes, Universidad Tecnológica Nacional, Resistencia, Chaco, Argentina.
- Samelis J, Kakouri A, Rementzis J. 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiology*, 17: 329–340.
- Sarantinopoulos P, Leroy F, Leontopoulou E, Georgalaki MD, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E, De Vuyst L. 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its

application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *International Journal of Food Microbiology*, 72: 125–136.

Verluyten J, Messens W, De Vuyst L. 2003. The curing agent sodium nitrite used in the production of fermented sausages, is less inhibiting to the bacteriocin-producing meat starter culture *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3833–3839.

Vermeiren L, Devlieghere F, Debevere J. 2006. Co-culture experiments demonstrate the usefulness of *Lactobacillus sakei* 10A to prolong the shelf-life of a model cooked ham. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 68 – 77.

Wijnker JJ, Koop G, Lipman LJA. 2006. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. *Food Microbiology*, 23: 657–662.

EFECTO DE LA PRESENCIA DE *ENTEROCOCCUS MUNDTII* ETW56 Y QUITOSANO EN FILETES DE MERO ENVASADOS AL VACÍO Y REFRIGERADOS

Schelegueda L.I.^{1,2}, Gliemmo M.F.^{1,2}, Delcarlo S.B.¹, Vallejo M.³, Marguet E.R.³, Campos C.A.^{1,2}

⁽¹⁾ Departamento de Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

⁽²⁾ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina.

⁽³⁾ Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, Argentina.

Resumen: El objetivo fue determinar el efecto de la presencia de *Enterococcus mundtii* ETW56 y de quitosano sobre la calidad microbiológica y fisicoquímica de filetes de pescado envasados al vacío y refrigerados durante 14 días. No se observaron cambios en la población de bacterias psicrófilas y ácido lácticas debido al tratamiento con los preservadores durante el almacenamiento. Sin embargo, al final del mismo, las muestras conteniendo el biopreservador, mostraron una leve reducción de la población de bacterias psicrófilas en comparación a las muestras control. Con respecto a *Listeria innocua*, el tratamiento con *E. mundtii* ETW56 y quitosano mostró una acción inhibitoria desde el inicio del estudio. El uso individual de *E. mundtii* ETW56 produjo un leve efecto inhibitorio a lo largo del almacenamiento. No se observaron cambios en el pH de los diferentes sistemas durante el ensayo. El contenido de nitrógeno básico volátil y de trimetilamina de los sistemas control aumentó rápidamente. La presencia de los

preservadores enlenteció dicho aumento. Los factores estudiados lograron reducir la población de *L. innocua* y mejoraron algunas características fisicoquímicas del alimento en cuestión. El uso de *E. mundtii* ETW56 como biopreservador de pescado debe seguir siendo estudiado.

Palabras clave: *Enterococcus mundtii* ETW56, quitosano, envasado al vacío, refrigeración, pescado

Abstract: The objective was to determine the effect of the presence of *Enterococcus mundtii* ETW56 and chitosan on the microbiological and chemical quality of fish fillets vacuum packed and refrigerated for 14 days. No changes were observed in the population of psychrophilic and lactic acid bacteria due to the treatment with preservatives during storage. However, at the end, samples containing the biopreservative showed a slight reduction in the population of psychrophilic bacteria compared to control samples. Regarding *Listeria innocua*, treatment with *E. mundtii* ETW56 and chitosan showed an inhibitory action from the baseline. Individual use of *E. mundtii* ETW56 produced a slight inhibition throughout the storage. No changes were observed in the pH of different systems during the assay. Content of volatile basic nitrogen and trimethylamine of control systems increased quickly. The presence of preservatives slowed this increase. The studied factors were able to reduce the population of *L. innocua* and improved some physicochemical characteristics of fish. The use of *E. mundtii* ETW56 as fish biopreservative should continue to be studied.

Keywords: *Enterococcus mundtii* ETW56, chitosan, vacuum packaging, refrigeration, fish

INTRODUCCIÓN

El pescado es un alimento altamente perecedero, como consecuencia, la aplicación de algún método de preservación resulta imprescindible para extender su vida útil y promover su consumo. La creciente demanda de los consumidores por productos de aspecto "fresco y natural" ha direccionado las investigaciones al desarrollo de nuevas tecnologías complementarias o alternativas a las tradicionales que permitan obtener alimentos duraderos, poco procesados y con la menor cantidad de aditivos posible.

Ante este panorama, cobra especial interés la biopreservación, la cual se basa en la extensión de la vida útil y el aumento de la seguridad de un alimento a través del uso de bacterias, o de la acción antimicrobiana de alguno de sus metabolitos (Tomé *et al.* 2008). La biopreservación puede ser aplicada a lácteos, productos cárnicos, pescados y vegetales, entre otros. Su uso en alimentos puede ayudar a reducir la adición de preservadores químicos así como también la intensidad de los tratamientos térmicos.

Dentro de los microorganismos que pueden ser utilizados para la biopreservación de alimentos, se destacan las bacterias ácido lácticas (BAL). Estas comprenden un grupo de bacterias Gram positivas, no formadoras de esporas, catalasa negativas, capaces de fermentar carbohidratos y producir ácido láctico como producto mayoritario (Calo-Mata *et al.* 2008). Dado que son bacterias consideradas aptas para el consumo suelen ser utilizadas con diferentes objetivos en alimentos (Deegan *et al.* 2006), entre ellos puede destacarse aumentar la seguridad, preservar la calidad, adjudicar sabores característicos,

aumentar la calidad nutricional y ejercer una fuerte actividad antagonica contra microorganismos relacionados con el deterioro de alimentos y contra patógenos tales como los pertenecientes a los géneros *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Bacillus* spp. (Calo-Mata *et al.* 2008). La acción inhibitoria de las BAL reside en su capacidad para competir con la flora nativa por nutrientes específicos, así como en su capacidad para producir otros compuestos inhibitorios, entre los que se destacan el ácido propiónico, el ácido fórmico, ácidos grasos libres, etanol, peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetoína, 2,3-butanodiol, acetaldehído, enzimas bacteriolíticas y bacteriocinas (Klaenhammer 1988, Piard y Desmazeud 1991, Piard y Desmazeud 1992, Tomé *et al.* 2006). Entre las BAL capaces de producir sustancias tipo bacteriocinas se destacan los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Calo-Mata *et al.* 2008).

Dado que la acción inhibitoria de los biopreservadores puede ser limitada, es conveniente utilizarlos como preservadores de alimentos en el marco de la tecnología de barreras. Habitualmente los biopreservadores muestran efectos sinérgicos cuando son combinados con otros tratamientos, como por ejemplo la reducción del pH, la refrigeración, el agregado de antimicrobianos o el envasado en atmósfera modificada.

El uso de biopreservadores en pescado y otros productos de la pesca ha captado especial interés en los últimos años. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones realizadas se enfocan en la actividad antilisteria, y pocos en controlar el crecimiento de microorganismos deteriorativos (Einarsson y Lauzon 1995, Sarika *et al.* 2012), como consecuencia, estudiar

el efecto de biopreservadores en la calidad global del alimento resulta ser un objetivo de interés.

De acuerdo a lo antedicho, resulta primordial la optimización del uso de biopreservadores en combinación con otros factores de conservación como estrategia para mejorar de la calidad del pescado y otros productos de la pesca. En particular, en el presente estudio, se trabajó con *Enterococcus mundtii* ETW56, bacteria ácido láctica aislada del medio marino patagónico y productora de una bacteriocina identificada como mundticina KS. Como consecuencia, el objetivo del trabajo fue determinar el efecto de la presencia de *E. mundtii* ETW56 y de quitosano sobre la calidad microbiológica y fisicoquímica de filetes de pescado envasados al vacío y almacenados a 6°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Elaboración de los inóculos

Antes de su uso, *E. mundtii* ETW56 y *L. innocua* 6a ATCC 33090 fueron inoculadas en caldo MRS o Mueller Hinton, respectivamente y almacenadas a 30°C durante 18 horas bajo una leve agitación. Una vez alcanzadas las 18 horas, se realizó un pasaje de cada inóculo a caldo fresco y se repitió el procedimiento de incubación. Luego, las cepas fueron adaptadas al crecimiento a baja temperatura. Para eso, después de la incubación a 30°C, una alícuota de cada cultivo se inoculó en caldo fresco y se incubó a 15°C durante 7 días. Pasado este tiempo, se realizó un nuevo pasaje y las bacterias fueron incubadas a 6°C durante el mismo período de tiempo.

Agente antimicrobiano

Se preparó una solución madre de 10000 ppm de quitosano (Sigma, Estados Unidos). Para ello, el quitosano (grado de deacetilación 85%) se dispersó en forma de lluvia sobre una solución acuosa de ácido acético 1,0% m/m bajo una leve agitación. Luego, el pH se ajustó a 5,50 agregando cuantitativamente una solución de NaOH 0,4 M. La solución fue esterilizada en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Elaboración de los sistemas

Se trabajó con ejemplares de mero (*Epinephelus marginatus*), los cuales fueron recibidos desde el puerto de Mar del Plata el día de inicio del estudio. Los meros fueron fileteados en el establecimiento expendedor y recibidos en el laboratorio en cajas con abundante hielo.

Los filetes se cortaron en trozos de 50 g en forma aséptica. Luego de ser pesados, se colocaron en bolsas plásticas de cloruro polivinilo – cloruro de polivinilideno (Cryovac Inc, Sealed Air Corporation, Argentina) de 90 µm espesor, y se les agregó el inóculo de *E. mundtii* ETW56 y la solución de quitosano con pH 5,50 de acuerdo a la composición mostrada en la **Tabla 1**.

Los tres grupos de muestras obtenidos se separaron en dos partes y a una de ellas se le inoculó *L. innocua* de manera de alcanzar un nivel inicial de 10³ UFC/g. Las muestras inoculadas con *L. innocua* fueron utilizadas para los análisis microbiológicos, mientras que, teniendo en cuenta que *Listeria* no es una bacteria deteriorativa, las que no recibieron el inóculo, se utilizaron para los análisis fisicoquímicos. Cabe destacar que en estudios preliminares se verificó que la

presencia de *L. innocua* no afecta los recuentos de la flora nativa presente en pescado ni los parámetros de calidad evaluados.

Tabla 1. Composición de los sistemas

Sistema	Composición	
	<i>E. mundtii</i> ETW56 (UFC/g)	Quitosano (ppm)
A	-	-
B	10 ³	-
C	10 ³	1000

Una vez formulados todos los sistemas, las bolsas se cerraron al vacío utilizando una envasadora de campana (Multivac C200, Alemania). Luego, se almacenaron en una cámara a 6°C durante 14 días. Las muestras se tomaron los días 0, 7 y 14. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Determinaciones microbiológicas

A cada tiempo de toma de muestra, una porción de filete extraída de cada bolsa se homogeneizó con agua peptona (1%). Alícuotas de los homogenatos resultantes se sembraron en placas de Petri, a las que se les dispensaron distintos medios de cultivo de acuerdo al objetivo buscado. Todos los medios de cultivo utilizados se obtuvieron de Biokar Diagnostics (Beauvais, Francia).

La población de bacterias psicrófilas se enumeró por recuento en placas de PCA. Las placas se almacenaron a 6°C durante 7 días. La población de BAL se enumeró por recuento en placas de agar MRS. Las placas se almacenaron a 30°C durante 2 días.

Por último, la población de *L. innocua* se enumeró por recuento en placas de agar Palcam suplementado con antibióticos. En este caso las alícuotas de los homogenatos fueron sembradas en la superficie del agar previamente solidificado. Las placas se almacenaron a 30°C durante 2 días.

Determinación del pH superficial

Para la determinación del pH se empleó un electrodo de vidrio unido a un pHmetro Solution Analyzer 5800-05 (Cole-Parmer Instrument Co., Illinois, Estados Unidos).

Determinación de nitrógeno básico volátil y de trimetilamina

La determinación de nitrógeno básico volátil (NBV) y de trimetilamina (TMA) se realizó por el método de microdifusión en una cámara de Conway (Pearson 1993).

Se pesaron 10,0 g de pescado y se adicionaron 30 ml de ácido tricloroacético 5,0% m/v. Luego, se homogeneizó durante 2 minutos utilizando un homogeneizador de alta velocidad (Omni Mixer 17106, OCI Instruments, Omni Corporation, Waterbury, Estados Unidos). El homogenato obtenido se filtró utilizando una bomba de vacío y se obtuvo así un extracto de cada muestra.

Para llevar a cabo la determinación de NBV se colocó 1,0 ml de extracto en el anillo externo de la cámara de Conway y 1,0 ml de ácido bórico (1%) con indicador mixto (verde de bromocresol – rojo de metilo) en el anillo interno. Luego, se colocó 1,0 ml de carbonato de potasio saturado en el anillo externo y la cámara se cerró rápidamente. Para lograr un cierre hermético, previamente se colocó vaselina en el borde de la cámara. La cámara se incubó en estufa a 37°C durante 1 hora.

Pasado el tiempo de incubación, se tituló con ácido sulfúrico 0,02N hasta viraje del indicador. Las determinaciones de cada muestra se realizaron por duplicado, utilizando como blanco un sistema en el cual el extracto fue reemplazado por 1,0 ml de agua destilada.

Para la determinación de TMA se repitió el procedimiento descrito, agregando 1,0 ml de formaldehído, previamente neutralizado, en el anillo externo de la cámara.

Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos fueron analizados llevando a cabo un ANOVA de dos factores (sistema y tiempo de almacenamiento), seguido por el Test de Tukey. La significatividad estadística fue evaluada a un nivel de 5% ($\alpha=0,05$). Las barras de error mostradas en las figuras representan la desviación estándar. El análisis estadístico fue realizado mediante el empleo del programa Statgraphics (Statgraphics Plus for Windows, versión 5.1, 2001, Estados Unidos.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aspectos microbiológicos

Durante el almacenamiento a 6°C de los trozos de pescado envasados al vacío se observaron cambios en la calidad microbiológica de los mismos. Dichos cambios estuvieron relacionados con los tratamientos aplicados y con el tipo de microflora estudiada.

Los recuentos de bacterias psicrófilas nativas de filetes de mero se encontraron entre 3,4 y 4,2 ciclos logarítmicos al inicio del ensayo, siendo los del sistema que contenía

quitosano (C) levemente menores que los de los sistemas que no lo contenían (A y B).

Después de 7 días de almacenamiento, la población de bacterias psicrófilas aumentó en todos los sistemas estudiados, alcanzando niveles similares en los tres casos. Sin embargo, a los 14 días de almacenamiento los recuentos de los sistemas se diferenciaron. El sistema sin preservadores (A) alcanzó recuentos cercanos a los 7 ciclos logarítmicos, mientras que en los sistemas inoculados con *E. mundtii* ETW56 (B y C) la población de bacterias psicrófilas fue 1 ciclo logarítmico menor y similar a la registrada a los 7 días de almacenamiento (**Figura 1**).

Aunque se alcanzaron niveles de crecimiento altos, en ningún caso se encontró un recuento mayor a 10^7 UFC/g, valor que representa el límite máximo de crecimiento microbiano permitido en este tipo de alimentos de acuerdo a las especificaciones de la Comisión Internacional para la Especificación Microbiológica de los Alimentos (International Commission on Microbiological Specifications for Foods 1986) (**Figura 1**).

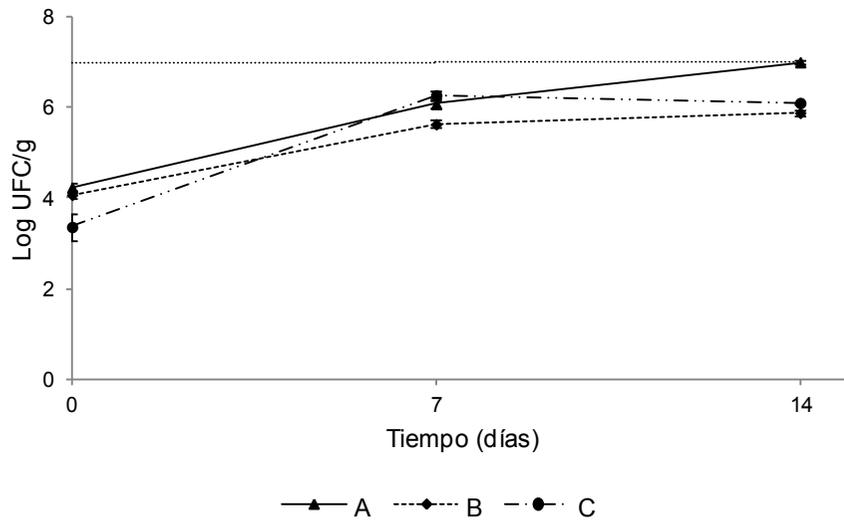


Figura 1. Recuentos de bacterias psicrófilas naturalmente presentes en filetes de mero durante el almacenamiento al vacío bajo refrigeración. Sistema sin antimicrobianos (A); 10^3 UFC/g de *E. mundtii* ETW56 (B); y 10^3 UFC/g de *E. mundtii* ETW56 y 1000 ppm de quitosano (C). La línea de puntos marca el límite de recuento de microorganismos permitido para este tipo de alimentos.

Con respecto al recuento de las BAL, al inicio del ensayo, en los sistemas conteniendo *E. mundtii* ETW56 que no fueron adicionados con quitosano (B) se obtuvo el nivel inoculado, ya que el recuento de BAL fue cercano a los 3 ciclos logarítmicos. Sin embargo, en el sistema que contenía quitosano y el inóculo de *E. mundtii* ETW56 (C.), el recuento fue medio ciclo logarítmico menor, y similar al recuento de BAL del sistema control (A) (Figura 2). A lo largo del almacenamiento, la

población de BAL fue aumentando en todos los sistemas estudiados (Figura 2).

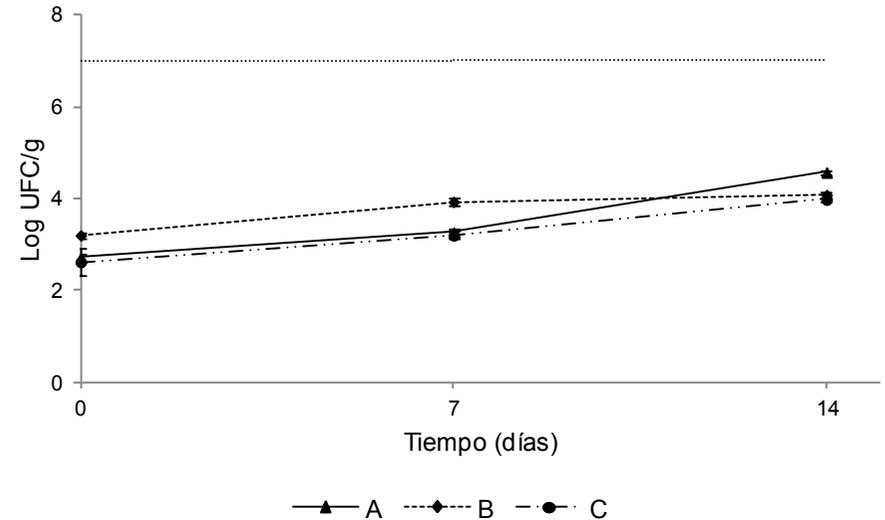


Figura 2. Recuentos de bacterias ácido lácticas en filetes de mero durante el almacenamiento al vacío bajo refrigeración. Sistema sin antimicrobianos (A); 10^3 UFC/g de *E. mundtii* ETW56 (B); y 10^3 UFC/g de *E. mundtii* ETW56 y 1000 ppm de quitosano (C). La línea de puntos marca el límite de recuento de microorganismos permitido para este tipo de alimentos.

Al estudiar el crecimiento de *L. innocua* en filetes de mero almacenados al vacío y bajo refrigeración se observó que en el sistema que fue adicionado con quitosano (C) la población de *Listeria* se redujo inmediatamente después de ser inoculada (Figura 3). En el sistema que no recibió el agregado de los preservadores (A), la población de *L. innocua* se mantuvo constante durante los 14 días de almacenamiento a 6°C

(Figura 3). La presencia de *E. mundtii* ETW56 logró reducir el recuento de *L. innocua* a lo largo del almacenamiento, siendo éste 1 ciclo logarítmico menor que el del sistema libre de preservadores (A) a los 14 días. Cabe destacar, que el menor recuento de *L. innocua* se encontró en el sistema que había sido inoculado con *E. mundtii* ETW56 y adicionado con 1000 ppm de quitosano (C) después de 7 días de almacenamiento (Figura 3). Aunque a los 14 días se observó un pequeño rebrote de *L. innocua*, el nivel alcanzado fue menor que el del resto de los sistemas estudiados.

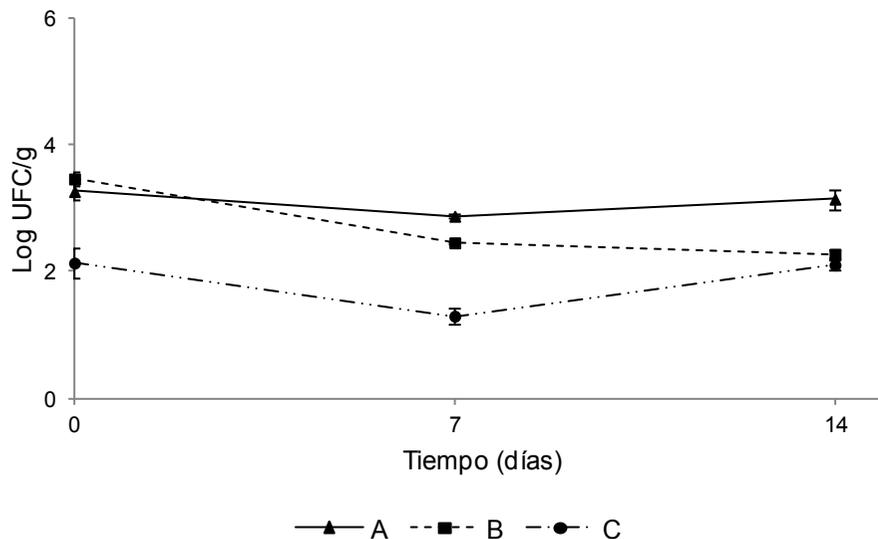


Figura 3. Recuentos de *L. innocua* en filetes de mero durante el almacenamiento al vacío bajo refrigeración. Sistema sin antimicrobianos (A); 10^3 UFC/g de *E. mundtii* ETW56 (B); y 10^3 UFC/g de *E. mundtii* ETW56 y 1000 ppm de quitosano (C).

Aspectos fisicoquímicos

El pH de los sistemas al inicio del estudio se encontró en un rango comprendido entre 6,40 y 6,70. No se encontraron diferencias significativas entre el sistema sin preservadores y aquellos inoculados con *E. mundtii* ETW56, con o sin quitosano, durante el almacenamiento. En los tres casos se observó un leve aumento del pH. Sin embargo, el valor se mantuvo por debajo de 7,50 durante los 14 días (datos no mostrados), siendo este valor el máximo permitido por el CAA (Código Alimentario Argentino, 2014) para el alimento en cuestión.

En cuanto al contenido de NBV y TMA, se observó que al inicio del estudio la concentración de NBV de los diferentes sistemas se encontró entre 11 y 14 mg/100 g de filete, mientras que la concentración de TMA fue menor a los 2 g/100 g de filete en todos los sistemas (Tabla 2). Estos valores se encuentran dentro del rango de los reportados para pescado fresco. Cabe recordar que en la determinación de NBV se incluye el dosaje de TMA, DMA, amoníaco y otros compuestos volátiles nitrogenados asociados con el deterioro del pescado. En cuanto a la TMA, ésta es una amina volátil, asociada con el olor típico del pescado en deterioro. Su presencia es debida a la reducción bacteriana del óxido de TMA, el cual está naturalmente presente en el tejido de muchas especies de pescados marinos (Masniyom *et al.* 2013). Tanto el contenido de NBV como el de TMA son empleados como indicadores del deterioro, pero éstos no reflejan los estadios primarios del mismo (FAO, 1999).

Después de 7 días de almacenamiento a 6°C el contenido de NBV y TMA aumentó significativamente en todos los sistemas estudiados, lo cual se relaciona con el aumento de la carga

microbiana de los trozos de filetes. Tanto el contenido de NBV como el de TMA de los sistemas libres de antimicrobianos superaron los límites máximos establecidos, 30 y 15 mg/100 g respectivamente. En cuanto a los sistemas tratados con los preservadores, se observó que aunque el contenido de compuestos nitrogenados se vio incrementado, ningún sistema alcanzó los 30 mg/100 g de filete, encontrándose las menores concentraciones en el sistema en el cual los preservadores fueron utilizados en forma conjunta (Tabla 2). A los 14 días de almacenamiento, ningún sistema cumplió con los requerimientos del CAA (Código Alimentario Argentino, 2014). En todos los casos la concentración de NBV y TMA fue superior a 30 y 15 mg/100 g de filete, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de NBV y TMA de filetes de mero durante el almacenamiento al vacío bajo refrigeración.

Sistema	NBV (mg/100 g de filete)			TMA (mg/100 g de filete)		
	0 días	7 días	14 días	0 días	7 días	14 días
A	14	>30	>30	1,5	>15	>15
B	13	29	>30	1,5	13	>15
C	11	19	>30	0	11	>15

Sistema sin antimicrobianos (A); 10^3 UFC/g de *E. mundtii* ETW56 (B); y 10^3 UFC/g de *E. mundtii* ETW56 y 1000 ppm de quitosano (C).

CONCLUSIONES

El agregado de *E. mundtii* ETW56, solo o en combinación con quitosano, no modificó significativamente el recuento de la flora psicrófila y ácido láctico presente en los trozos de filetes de mero a lo largo del almacenamiento al vacío a 6°C. Sin embargo, el agregado de *E. mundtii* ETW56, solo o en combinación con quitosano, disminuyó el recuento de *L. innocua*. El efecto inhibitorio fue mayor cuando se utilizó la combinación del biopreservador y del antimicrobiano. Cabe destacar que el envasado al vacío junto con el almacenamiento bajo refrigeración tuvo un efecto bacteriostático sobre la población de *Listeria* inoculada.

El pH de todos los sistemas formulados se mantuvo por debajo de 7,50, siendo este el límite máximo admitido por el CAA para pescado destinado al consumo. En los sistemas tratados con la combinación de *E. mundtii* ETW56 y de quitosano, el pH se mantuvo por debajo de 7,0 durante los 14 días de almacenamiento.

El aumento de la concentración de NBV y TMA, se vio enlentecido por el agregado de *E. mundtii* ETW56, solo o junto con quitosano, con respecto a las muestras libres de preservadores.

De los resultados obtenidos en este trabajo y de la información bibliográfica disponible se desprende que el uso de BAL como biopreservadores de pescado y otros productos de la pesca debe seguir siendo estudiado, y que su combinación con otros factores de estrés es una estrategia promisoría para lograr alimentos de alta calidad, inocuos y con una extensa vida útil.

BIBLIOGRAFÍA

Calo-Mata P, Arlindo S, Boehme K, de Miguel T, Pascoal A, Barros-Velázquez J. 2008. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess Technology*, 1: 43-63.

Código Alimentario Argentino. 2014. http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp.

Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16: 1058-1071.

Einarsson H, Lauzon H. 1995. Biopreservation of brined shrimps (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 669-676.

FAO. 1999. Documento técnico de pesca. El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad. En HH Huss, editor. Dinamarca.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1986. Sampling plans for fish and shellfish. *Microorganisms in Foods*, 2. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications. 181-196.

Klaenhammer TR. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochemie*, 70: 337-349.

Masniyom P, Benjama O, Maneesri J. 2013. Effect of modified atmosphere and vacuum packaging on quality changes of refrigerated tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets. *International Food Research Journal*, 20(3): 1401-1408.

- Pearson D. 1993. Técnicas de Laboratorio para el análisis de alimentos. Zaragoza, España: Acribia.
- Piard JC, Desmazeud M. 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products. Lait, 71: 525-541.
- Piard JC, Desmazeud M. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Bacteriocins and other antibacterial substances. Lait, 72: 113-142.
- Sarika AR, Lipton AP, Aishwarya MS, Dhivya RS. 2012. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* and application of its bacteriocin to manage spoilage bacteria in high-value marine fish under different storage temperatures. Applied Biochemistry Biotechnology, 167: 1280-1289.
- Tomé E, Gibbs PA, Teixeira PC. 2008. Growth control of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold-smoked salmon by lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 121: 285-294.
- Tomé E, Teixeira P, Gibbs PA. 2006. Anti-listerial inhibitory lactic acid bacteria isolated from commercial cold smoked salmon. Food Microbiology, 23: 399-405.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico de la Universidad de Buenos Aires y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

EFECTO DE LAS FUERZAS HIDRODINÁMICAS EN EL DESARROLLO DE BIOFILMS MIXTOS DE LEVADURAS SOBRE ACERO INOXIDABLE

Tarifa M.C.^{1*}, Brugnoni L.I.^{1,2}, Lozano J.E.¹

¹ Planta Piloto de Ingeniería Química (CONICET-UNS), Camino "La Carrindanga" Km 7, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina

² Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (UNS), San Juan 670, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

mtarifa@plapiqui.edu.ar

Resumen: La formación de biofilms es uno de los principales problemas higiénico-sanitarios que enfrentan las industrias productoras de alimentos. Dentro de los parámetros que condicionan su desarrollo y estructura, las fuerzas hidrodinámicas representan uno de los factores claves. De acuerdo a su ubicación la tensión aplicada sobre los mismos varía generando cambios en la matriz de los biofilms, interfiriendo así en los procesos de saneamiento. Con el objetivo de profundizar sobre el efecto de distintas condiciones de flujo en la formación de biofilms, se trabajó con levaduras aisladas previamente de una industria productora y exportadora de jugo concentrado de manzana (Argentina). Se utilizó una suspensión mixta de *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida kefir* y *Rhodotorula mucilaginosa* en jugo de manzana de 12° Brix. La adhesión de las mismas en acero inoxidable fue estudiada durante 21 y 77 días bajo flujos: estacionario (E), laminar (L), transicional (T) y turbulento (TUR). En comparación con la condición de flujo E, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,001$) en el desarrollo de los biofilms, con un aumento en el espesor de

83 μm para el flujo TUR mientras que se observó una disminución de 28 y 10 μm para los flujos L y T. La arquitectura de los mismos mostró un mayor número de canales con la disminución de la velocidad de flujo, y la modificación de la morfología celular. La habilidad para formar biofilms sobre acero inoxidable, resistiendo las fuerzas de arrastre es de especial cuidado; la propagación de clusters resistentes representa un punto de especial cuidado a la hora de la planificación de estrategias de saneamiento.

Palabras claves: Biofilms, jugo de manzana, acero inoxidable, condiciones de flujo

Abstract: Biofilms formation is a major health and hygienic problem faced by food industries. Within the parameters that determine their development and structure, hydrodynamic forces are one of the key factors. According to its location the tension applied varies generating changes in the biofilm matrix, thus interfering with the sanitization protocols. In order to elucidate the effect of different flow conditions on the formation of biofilms, we worked with four yeasts species previously isolated from a concentrated apple juice producer and exporter industry (Argentina). A mixed suspension of *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida kefir* and *Rhodotorula mucilaginosa* was assayed in 12° Brix apple juice. The adhesions were studied in stainless steel over 21 and 77 days under different flow conditions: static (S), laminar (L), transitional (T) and turbulent (TUR). Compared to S condition, significant differences ($p < 0.001$) were found in the development of biofilms with an increase in thickness of 83 μm for TUR flow, while a reduction of 28 and 10 μm was observed for L and T flows. The architecture of the biofilms

showed a greater number of channels as flow rate decreased, with modifications in cell morphology. The ability to form biofilms on stainless steel, resisting drag forces is of concern as the spread of resistant clusters are important when planning sanitation strategies.

Keywords: Biofilms, Apple juice, stainless steel, flow conditions.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los microorganismos se encuentran formando comunidades complejas denominadas *biofilms* donde crecen adheridos a las superficies y embebidos en matrices extracelulares que ellos mismos sintetizan. Dichas comunidades se estructuran en función a diferentes tipos de interacciones tanto inter como intra especie conformando consorcios dinámicos bien establecidos (Loera-Muro *et al.* 2012). El desarrollo de biofilms en lo que respecta a industrias alimentarias ha adquirido gran relevancia ya que se los ha visto asociados a industrias cerveceras (Flemming y Ridway 2009), pesqueras (Shikongo-Nambabi 2011), lácteas (Chmielewski y Frank 2003), de procesamiento de productos cárnicos (Harvey *et al.* 2007) y jugueras (Brugnoni *et al.* 2007, Tarifa *et al.* 2013). Los biofilms constituyen un modo protegido de crecimiento y desarrollo que le permite a los microorganismos sobrevivir bajo condiciones adversas (tratamientos térmicos, estrés hídrico, fuerzas de arrastre), siendo su comportamiento y fisiología significativamente diferentes de aquellos microorganismos que crecen en forma plactónica (Díaz 2011, Ganguly y Mitchell 2011, Trappetti *et al.* 2011). La eliminación de microorganismos que se encuentran constituyendo biofilms es más compleja y problemática que la remoción de los mismos en su forma libre ya que la inclusión en estas comunidades les confiere una resistencia mayor a los procesos de limpieza y desinfección (Costerton *et al.* 1999, Brugnoni *et al.* 2012), punto de especial cuidado en lo que respecta a las industrias productoras de alimentos.

En la industria alimentaria, la presencia de biofilms genera un serio problema higiénico-sanitario, causando pulsos de contaminación difíciles de controlar durante el proceso productivo, comprometiendo la calidad microbiológica del producto, la efectividad de los tratamientos, la vida comercial del mismo y la salud del consumidor (Midelet y Carpentier 2002; Brooks y Flint 2008; Papadopoulou *et al.* 2012). Este tipo de contaminación biológica limita seriamente el cumplimiento de los estándares de calidad a los cuales deben aspirar este tipo de industrias. Desde un punto de vista tecnológico, los biofilms pueden ocasionar reducción del flujo de líquidos y de la transferencia de calor, pérdidas energéticas (Ridgeway y Olson 1981; Le Chevalier *et al.* 1987), bloqueo de los poros de membranas y corrosión de metales (Bott 1995; Melo y Flemming 2010).

Todas las superficies pueden potencialmente albergar microorganismos (Kumar y Anand 1998), las grietas, codos, accesorios en T y válvulas representan lugares donde el estancamiento promueve la acumulación de microorganismos y formación de biofilms (Manuel *et al.* 2010).

Las fuerzas hidrodinámicas representan uno de los parámetros claves que influyen en la adhesión microbiana (Busscher y van der Mei 2006) y posterior formación de biofilms (Stoodley *et al.* 1999; Liu y Tay 2002; Wäshe *et al.* 2004). Para adherirse y formar un biofilm los microorganismos sometidos a altas velocidades de flujo deben superar las fuerzas en la interface líquido-superficie (Lelièvre *et al.* 2002; Blel *et al.* 2007). En el proceso de formación de biofilms las condiciones de flujo definen el transporte de las células, del oxígeno y de sustancias nutritivas desde la matriz líquida a la matriz microbiana (Bryers y Characklis 1981; Simões *et al.* 2007; Stoodley *et al.* 1999). La arquitectura de la matriz microbiana

(el grosor, la cohesión) varía con el estado de maduración del biofilm y la resistencia ejercida por la velocidad del flujo. El diseño de los biofilms condiciona parcialmente sus funciones afectando la transferencia de masa entre los agregados microbianos y la matriz líquida (Battin *et al.* 2003). Basado en la complejidad, el flujo se puede dividir en tres regímenes: (1) laminar, (2) turbulento, donde el flujo es caótico con remolinos y vórtices y (3) de transición que está entre el flujo turbulento y laminar (Brugnoni *et al.* 2012).

Con el objetivo de profundizar sobre el efecto de distintas condiciones de flujo en la formación de biofilms, se trabajó con levaduras aisladas previamente de una industria productora y exportadora de jugo concentrado de manzana (Tarifa *et al.* 2013) y bajo condiciones de flujo de relevancia industrial como las mencionadas previamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las especies ensayadas en el presente trabajo fueron *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida kefir* y *Rhodotorula mucilaginosa*. Los aislamientos se realizaron de membranas de ultrafiltración (UF) provistas por una empresa exportadora de jugo concentrado de manzana y pera radicada en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén (Tarifa *et al.* 2013). Dichas especies al haber sobrevivido repetidos ciclos de producción, limpieza y desinfección propios de las industrias jugueras, se asumió que provenían de comunidades microbianas bien establecidas conformando biofilms.

Condiciones de crecimiento y preparación de las muestras

Cada una de las cepas con las que se trabajó provino de un vial guardado a -70°C en glicerol 20% (v/v) y caldo Glucosa-Extracto de levadura-Cloranfenicol: 0,5% (p/v) extracto de levadura (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), 2% (p/v) glucosa (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y 0,01% (p/v) cloranfenicol (FlukaChemie AG, Buchs, Suiza).

Para los ensayos, un vial de cada cepa fue re-suspendido en caldo y cultivado durante 48 hs a $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ bajo agitación suave (50 rpm) con un agitador orbital (Vicking M23, Vicking.s.r.l., Argentina). Cada cultivo fue centrifugado y el pellet re-suspendido en jugo de manzana estéril de 12° Brix hasta alcanzar una densidad óptica a 550 nm de 0,125 ($\approx 10^6$ células/ml) medida con un espectrofotómetro de luz visible (ThermoSpectronicGenesys 20, ThermoElectronCorporation, MA, USA).

El jugo de manzana de 12° Brix fue preparado a partir de jugo concentrado de manzana de 72° Brix, obtenido de una empresa productora y exportadora de jugo concentrado de manzana (Argentina). El jugo utilizado en los ensayos fue convenientemente esterilizado por filtración con membranas de 0,45 μm de tamaño de poro (Metricel®Grid, GelmanSciences, MI, USA).

Para la preparación del inóculo final con el que se realizaron las experiencias se mezclaron cantidades iguales de cada una de las suspensiones celulares ajustadas y se dejaron 24 hs en contacto con las superficies. A partir de dicho momento se realizaron recambios de jugo cada 48 hs de manera de aportar nutrientes a los microorganismos.

Ensayo de formación de biofilms

Las plantas de procesamiento de alimentos presentan puntos vulnerables para la acumulación de microorganismos y la consecuente formación de biofilms, de acuerdo a su ubicación la tensión aplicada sobre los mismos varía generando cambios en la matriz de los biofilms. Para analizar dicho efecto se analizó tanto el desarrollo bajo condiciones de flujo estático como dinámico durante 21 y 77 días a 25°C.

Condiciones dinámicas

Para el estudio del efecto de los diferentes flujos sobre la adhesión y formación de biofilms, se utilizó un sistema de disco giratorio descrito por Brugnoli *et al.* (2011). A lo largo de la superficie del disco giratorio, y de acuerdo a la distancia con respecto al centro, se generan diferentes regiones caracterizadas cada una de ellas por diferentes Reynolds (Re). Para permitir la formación de los biofilms se pegaron superficies de acero inoxidable tipo AISI 304 (2 cm x 1cm) previamente esterilizadas, al disco giratorio a diferentes distancias con respecto al centro (Figura 1). Las zonas generadas a lo largo del sistema fueron laminar (L),

transicional (T) y turbulento (TUR), representando en este sistema $Re < 50.000$ (laminar), y por encima de 200.000, turbulento.

Condiciones estáticas

Para ensayar el efecto de una condición de cultivo estacionaria (E) sobre la formación y desarrollo de biofilms se utilizó un sistema conformado por tres vasos de precipitado cada uno de ellos con un disco de acero inoxidable de tipo AISI 304. Cada uno de los sistemas fue previamente esterilizado durante 15 min a 120°C y 1 atm.

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las muestras fueron fijadas en glutaraldehído (2.5 %) en buffer fosfato (0.1 mol l⁻¹, pH 7.2); y lavadas tres veces en el mismo buffer, luego se les realizó punto crítico (E3000, Polaron). Las muestras fueron recubiertas por oro (300 Å) y observadas a través de un microscopio electrónico de barrido (LEO EVO 40, Cambridge, Inglaterra) (Lozano 1990)

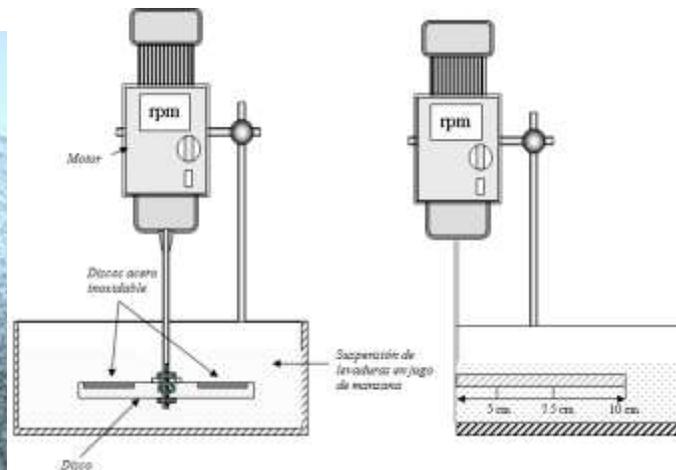
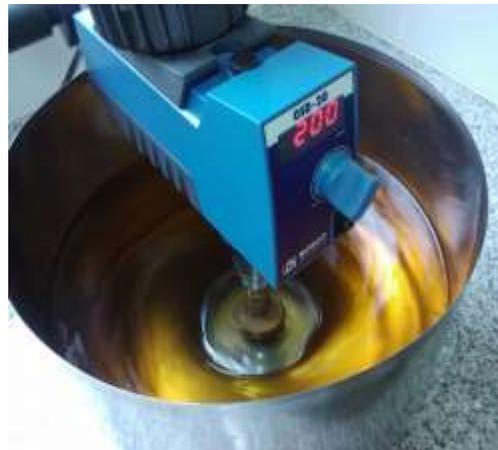


Figura 1. Sistema de disco giratorio utilizado para el ensayo de flujo dinámico (Brugnoli *et al.* 2011)

Microscopia de láser confocal (CLSM)

Dentro de los parámetros para la caracterización de biofilms multiespecie, el grosor es el más abarcativo e informativo de variaciones con respecto a parámetros claves como volumen, peso

húmedo y número de especies (Boulêtreau *et al.* 2011). Para esto las muestras obtenidas fueron teñidas con diacetato de fluoresceína (FDA). Esta prueba es ampliamente utilizada como indicador de viabilidad celular; el principio de su utilización radica en que sólo las células metabólicamente activas pueden convertir FDA a fluoresceína siendo posible debido a la presencia de membranas intactas y actividad esterasa (Ki-Bong y Hideaki 2002).

Se utilizó una solución estándar de 2 mg ml⁻¹ de FDA (C₂₄H₁₆O₇, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) la cual fue preparada en acetona (Dorwil, Industria Argentina) y guardada a -18°C hasta su utilización.

Para la observación de las células adheridas a las superficies de acero inoxidable, cada disco fue teñido con una solución estéril de FDA en 0,1 mol l⁻¹ de buffer fosfato (0.04 %), pH 7,5. Luego de 90 min en agitación suave y oscuridad, los discos fueron lavados con agua destilada y las muestras fueron observadas a través de un microscopio de láser confocal (Leica TCS SP2, Leica Microsystems, Richmond Hill, ON, Canadá). Las observaciones se realizaron con un objetivo de inmersión en agua de 20 x y la captura de las proyecciones 2D a través del software correspondiente al microscopio (Confocal Software, LCS, Leica Microsystems).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como ya fue descrito por Brugnoli *et al.* (2007) y Tarifa *et al.* (2013) las levaduras poseen un gran potencial para adherirse y establecer biofilms a lo largo de los distintos puntos de producción de las plantas productoras de jugo. Por otro lado Brugnoli *et al.* (2011) estableció la capacidad de cepas de *C.*

krusei para formar biofilms bajo condiciones de flujo laminar y transicional.

En el presente estudio se estableció el efecto de las condiciones de flujo tanto en la arquitectura como en el espesor de biofilms mixtos de *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. kefyri* y *R. mucilaginosa* tanto bajo flujo estático como dinámico. En la Figura 2 se muestran los resultados obtenidos luego de someter durante 21 y 77 días a las suspensiones mixtas a condiciones de flujo E y dinámicas, expresándose esto como el cambio en la biomasa en función del espesor alcanzado por los biofilms. En la figura se evidencia que a lo largo del tiempo los biofilms registraron aumentos significativos ($p < 0,05$) en la biomasa bajo condiciones dinámicas, mientras bajo flujo E las diferencias en el desarrollo de la matriz microbiana no se tradujeron en cambios significativos ($p > 0,05$). En tiempos cortos, en este ensayo representado como 21 días, el mayor desarrollo se encontró bajo condiciones de flujo E y L, con un pico en L mientras que en tiempos mayores (77 días) la predominancia se dio en condiciones de flujo TUR.

Tanto el transporte de masa como el esfuerzo de corte de los fluidos son dependientes de las fuerzas hidrodinámicas, por lo tanto el patrón de flujo influirá significativamente en los procesos involucrados con la dinámica de los biofilms (Radu *et al.* 2012). Se esperaría por lo tanto que cuanto mayor sea la velocidad de flujo, mayor sea la velocidad de transferencia de masa desde y hacia el biofilms (tanto de nutrientes como de detritos) y por lo tanto el crecimiento sea mayor. Esto explicaría el mayor desarrollo en L con respecto a E; el aumento en el flujo representaría un mecanismo de renovación de nutrientes y de disposición de los metabolitos producidos por la comunidad. Por otra parte, el desarrollo neto de un biofilm está determinado por el equilibrio entre el

crecimiento y la tasa de desprendimiento, implicando a su vez altas velocidades (grandes fuerzas de arrastre) en la superficie de los biofilms. Si las fuerzas mecánicas aplicadas al biofilm a lo largo del tiempo son constantes, podría darse lugar a un mayor desprendimiento de biomasa. Sin embargo, a largo plazo, los biofilms más densos, más fuertes y más resistentes se desarrollan a velocidades de shear stress mayores (van Loosdrecht *et al.* 1995, Horn *et al.* 2003). La forma en la que el flujo afecta los parámetros descriptivos de un biofilms pueden explicarse considerando los factores que influyen el crecimiento de los mismos: la velocidad y los nutrientes (Bott 1995). La velocidad de flujo determina tanto el shear como la transferencia de masa del sistema (Stoodley *et al.* 1999), tomándose esta última como la capacidad de acercar los sólidos en suspensión a la matriz del biofilm. A medida que el espesor del biofilm aumenta, la transferencia de masa se vuelve crítica, necesiéndose mayores flujos para un correcto aporte de nutrientes lo cual conlleva un mayor y más estable

crecimiento (Stewart y Franklin 2008).

Tal como se mencionó previamente las fuerzas aplicadas sobre los biofilms condicionan la arquitectura que adoptan estas comunidades. En cuanto a la morfología se observó que, mientras bajo condiciones E el predominio estaba dado por pseudohifas (Figura 3 A y B), bajo condiciones de estrés mayores dadas a máximas fuerzas de arrastre (TUR), la morfología cambiaba considerablemente hacia células más redondas y compactas (Figura 3 C y D). Tal como lo menciona Paul *et al.* (2012) cuando las tensiones aplicadas sobre los biofilms son lo suficientemente grandes, la matriz es sometida a una compresión que determina un biofilm consolidado y compacto.

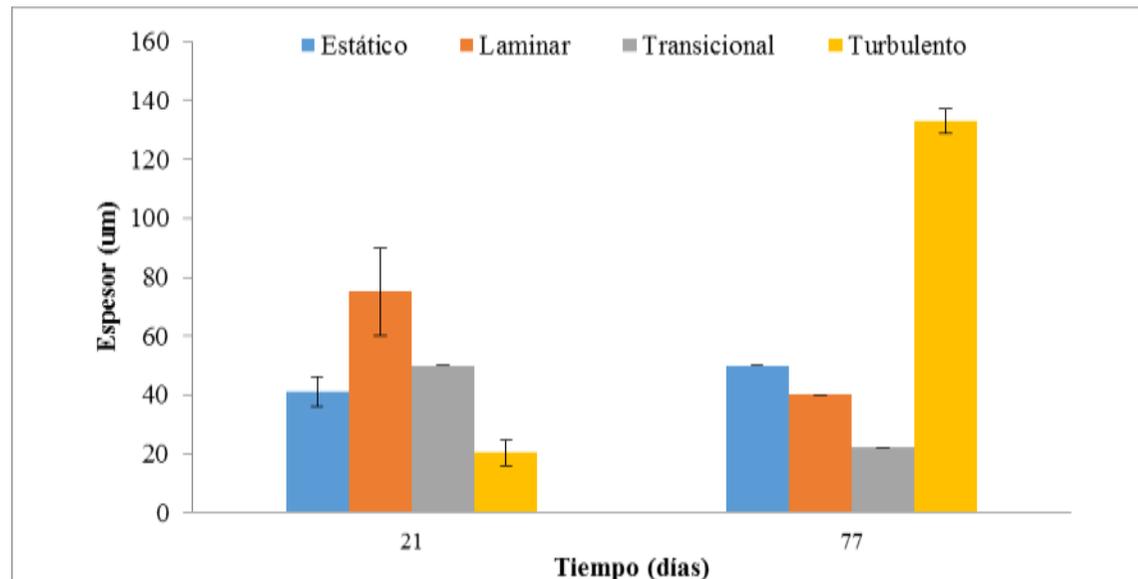


Figura 2. Espesores de los biofilms mixtos de *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* y *R. mucilaginosa* expresados en µm luego de someter a las especies a flujos: Estático, Laminar, Transicional y Turbulento durante 21 y 77 días. Las observaciones registradas se realizaron por CLSM.

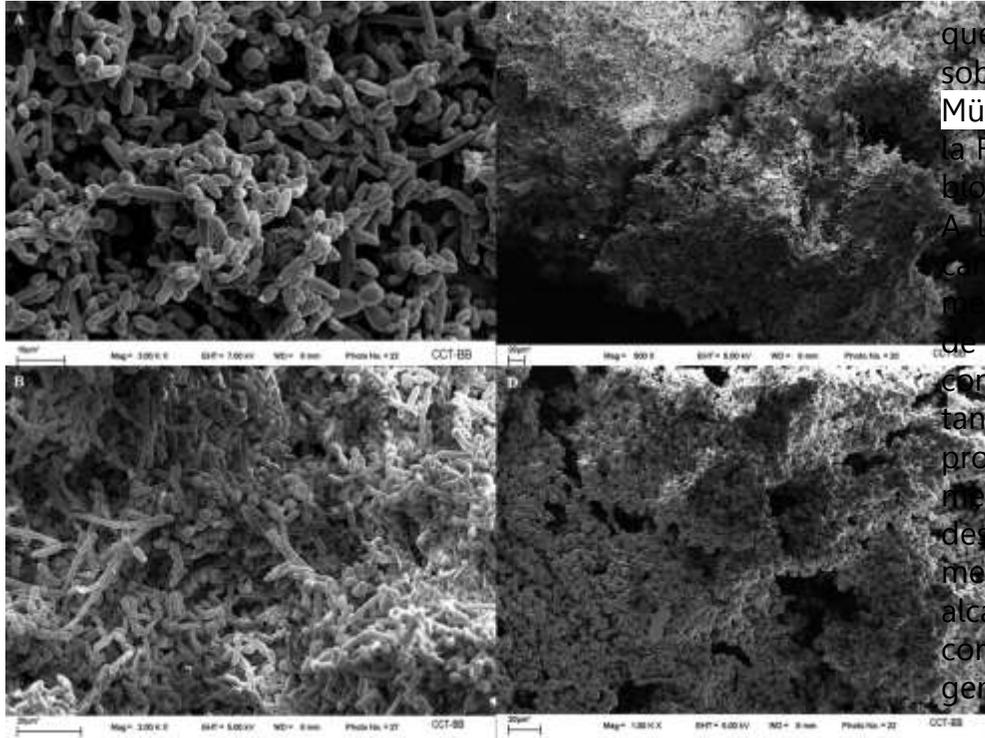
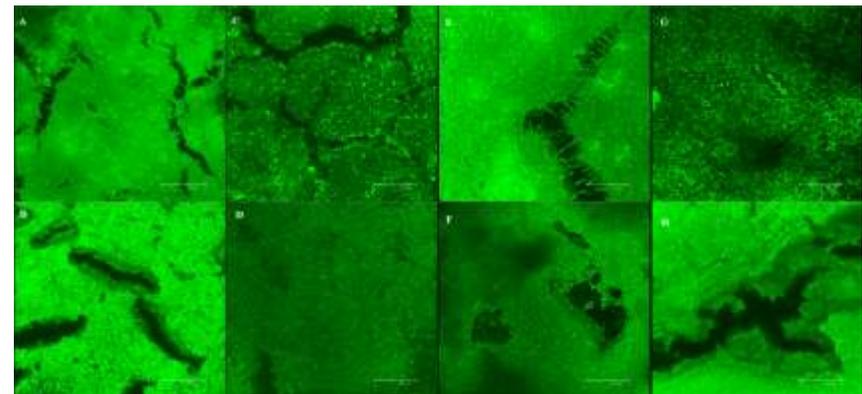


Figura 3. Imágenes de SEM de biofilms mixtos en jugo de manzana 12°Brix cultivados a 25 ± 1 °C. A y B Flujo estático 21 y 77 días respectivamente- C y D Flujo turbulento 21 y 77 días respectivamente

Los biofilms, como se mencionó previamente, son comunidades complejas de microorganismos las cuales tienen fenotipos únicos o característicos comparados con sus formas de vida planctónica. Su formación está dirigida por un conjunto de respuestas moduladas por la percepción de señales ambientales a través de sistemas específicos, entre los

que se encuentra el *quorum sensing*, que les permiten sobrevivir aún en ambientes adversos (De Sordi y Mühlischlegel, 2009; Garde *et al.* 2015). Como se evidencia en la Figura 4 a medida que aumentan las fuerzas de arrastre los biofilms formados presentan diferencias en su conformación. A lo largo de las imágenes se observa como el número de canales disminuye desde E hasta TUR, el flujo es uno de los mecanismos mediante los cuales se produce la transferencia de masa entre los agregados microbianos y la matriz líquida, con lo cual a medida que las fuerzas de arrastre aumentan, tanto el oxígeno, los nutrientes como los desechos que se producen en los biofilms (células muertas, productos metabólicos) también lo hacen. Cuando los mismos se desarrollan bajo condiciones estáticas, deberían adoptar algún mecanismo mediante el cual estos parámetros puedan ser alcanzados, en este caso a través de canales que permiten el correcto flujo entre la matriz microbiana y el medio líquido, generando biofilms más porosos.

Figura 4. Imágenes adquiridas por microscopia confocal de los biofilms mixtos desarrollados bajo flujos: A y B estático, C y D laminar, E y F transicional, G y H turbulento. Primer fila: 21 días, segunda fila: 77 días.



CONCLUSIONES

Los biofilms constituyen un modo protegido de crecimiento y desarrollo que permite a los microorganismos sobrevivir en ambiente hostiles, siendo su comportamiento y fisiología significativamente diferentes de aquellos microorganismos que crecen en medio líquido.

Por lo anterior el conocimiento de la dinámica y respuesta de estas formas de vida en lo que respecta a la industria alimentaria es de vital importancia debido a las repercusiones que pueden tener desde el punto de vista sanitario no solo afectando la economía de las empresas por los problemas tecnológicos que generan sino también por el potencial riesgo sanitario producido por los pulsos de contaminación. Las condiciones adoptadas en el presente estudio son las reproducibles en una industria juguera con lo cual es evidente que el desarrollo y persistencia de los biofilms a lo largo de los distintos puntos del proceso productivo es vasto, observándose una gran colonización de los mismos con máximos considerables para fuerzas de arrastre y tiempos altos. En función de los datos obtenidos, la atención debe radicar en evitar la colonización y posterior formación de biofilms en las superficies asociadas a plantas productoras de alimentos. Una mejor comprensión de la formación de biofilms en sistemas de producción es importante para prevenir y/o reducir los problemas operativos causados por los mismos.

BIBLIOGRAFIA

- Battin TJ, Kaplan LA, Newbold JD, Cheng X, Hansen CME. 2003. Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:5443-5452.
- Blel W, Benezech T, Legentilhomme P, Legrand J, Le Gentil-Lelièvre C. 2007. Effect of flow arrangement on the removal of *Bacillus* spores from stainless steel equipment surfaces during a Cleaning In Place procedure. *Chemical Engineering Science*, 62:3798-3808.
- Boulétreau S, Charcosset JY, Gamby J, Lyautey E, Mastrorillo S, Azémar F, Garabetian F. 2011. Rotating disk electrodes to assess river biofilm thickness and elasticity. *Water research*, 45: 1347-1357
- Bott TR. 1995. Biological growth on heat exchangers surfaces. In: Bott TR, editor. *Fouling of heat exchangers*. Amsterdam: Elsevier Science; p. 223-267.
- Brooks JD, Flint SH. 2008. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science Technology*, 43:2163-2176.
- Brugnoni LI, Lozano JE, Cubitto MA. 2007. Potential of yeast isolated from apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry. *Food Research International*, 40:332-340.
- Brugnoni LI, Cubitto MA, Lozano JE. 2011. Biofilm formation under laminar flow conditions of yeast isolated from an apple juice processing plant. *Journal of Food Process Engineering*, 34:49-66.

- Brugnoni LI, Lozano JE, Cubitto MA. 2012. Efficacy of sodium hypochlorite and quaternary ammonium compounds on yeasts isolated from apple juice. *Journal of Food Process Engineering*, 35:104–119.
- Busscher HJ, van der Mei HC. 2006. Microbial adhesion in flow displacement systems. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 127–141.
- Bryers J, Characklis W. 1981. Early fouling biofilm formation in a turbulent flow system: overall kinetics. *Water Research*, 15: 483–491.
- Chmielewski RAN, Frank JF. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2:22-32.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284:1318–1322.
- De Sordi L, Mühlischlegel FA. 2009. Quorum sensing and fungal–bacterial interactions in *Candida albicans*: a communicative network regulating microbial coexistence and virulence. *FEMS yeast research*, 9:990-999.
- Diaz C. 2011. Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie (Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata).
- Flemming HC, Ridgway H. 2009. Biofilm control: conventional and alternative approaches. *Marine and Industrial Biofouling*, 4:103-117.
- Ganguly S, Mitchell A. 2011. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*, 14:1-6.
- Garde C, Welch M, Ferkinghoff-Borg J, Sams T. 2015. Microbial Biofilm as a Smart Material. *Sensors*, 15: 4229-4241.
- Harvey J, Keenan KP, Gilmour A. 2007. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*, 24:380-392.
- Horn H, Reiff H, Morgenroth E. 2003. Simulation of growth and detachment in biofilm systems under defined hydrodynamic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 81:607–617
- Ki-Bong O y Hideaki M. 2002. Rapid viability assessment of yeast cells using vital staining with 2-NBDG, a fluorescent derivative of glucose. *International Journal Food Microbiology* 76, 47–53.
- Kumar CG, Anand SK. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42: 9-27.
- Le Chevallier MW, Babcock TM, Lee RG. 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 53:2714-2724.
- Lelièvre C, Legentilhomme P, Gaucher C, Legrand J, Faille C, Bénézec T. 2002. Cleaning in place: effect of local wall shear stress variation on bacterial removal from stainless steel equipment. *Chemical Engineering Science*, 57:1287–1297.
- Liu Y, Tay JH. 2002. The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Research*, 36:1653–1665.
- Loera-Muro A, Ramírez-Castillo F, Avelar F, Guerrero A. 2012. Biopelículas Multi-especie : asociarse para sobrevivir. *Investigación y Ciencia*, 54:49-56.
- Lozano V. 1990. Preparación de muestras biológicas para microscopía de barrido. In V. Lozano & A. Morales (Eds.), *Introducción a la microscopía electrónica* (pp. 133-156). CRIBABB-CONICET, Bahía Blanca, Argentina.

Manuel CM, Nunes OC, Melo LF. 2010. Unsteady state flow and stagnation in distribution systems affect the biological stability of drinking water. *Biofouling*, 26:129–139.

Melo LF, Flemming HC. 2010. Mechanistic aspects of heat exchanger and membrane biofouling and prevention. In: Amjad Z, editor. *The science and technology of industrial water treatment*. Brecksville (Boca Raton, USA): Taylor & Francis. p. 365–380.

Midelet G., Carpentier B. 2002. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:4015–4024.

Paul E, Ochoa JC, Pechaud Y, Liu Y, Liné A. 2012. Effect of shear stress and growth conditions on detachment and physical properties of biofilms. *Water Research*, 46:5499–5508.

Papadopoulou OS, Chorianopoulos NG, Gkana EN, Grounta AV, Koutsoumanis KP. 2012. Transfer of foodborne pathogenic bacteria to non-inoculated beef fillets through meat mincing machine. *Meat Science*, 90:865–869.

Radu AI, Vrouwenvelder JS, van Loosdrecht MCM, Picioreanu C. 2012. Effect of flow velocity, substrate concentration and hydraulic cleaning on biofouling of reverse osmosis feed channels. *Chemical Engineering Journal*, 188:30–39.

Ridgway HF, Olson BH. 1981. Scanning electron microscope evidence for bacterial colonization of a drinking-water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology*, 41:274–287.

Shikongo-Nambabi M. 2011. Control of bacterial contamination during marine fish processing. *Journal of Biology*, 3:1–17.

Simões M, Pereira MO, Vieira MJ. 2007. The role of hydrodynamic stress on the phenotypic characteristics of

single and binary biofilms of *Pseudomonas fluorescens*. *Water Science Technology*, 55:437–445.

Stoodley P, Dodds I, Boyle JD, Lappin-Scott HM. 1999. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 85:19S–28S.

Stewart PS, Franklin MJ. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6:199–210

Tarifa MC, Brugnoli LI, Lozano JE. 2013. Role of hydrophobicity in adhesion of wild yeast isolated from the ultrafiltration membranes of an apple juice processing plant. *Biofouling*, 29: 841–853

Trappetti C, Ogunniyi A, Oggioni M, Paton J. 2011. Extracellular Matrix Formation Enhances the Ability of *Streptococcus pneumoniae* to Cause Invasive Disease. *PLoS ONE*, 6:e19844, 2011.

van Loosdrecht MCM, Eikelboom D, Gjaltema A, Mulder A, Tjihuis L, Heijnen JJ. 1995. Biofilm structures. *Water Science Technology*, 32:35–43.

Wäsche S, Horn H, Hempel DC. 2004. Influence of growth conditions on biofilm development and mass transfer at the bulk/biofilm interface. *Water Research*, 36:4775–4784.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT)

EFFECTO DEL TWEEN 20 Y DEL ACEITE DE MAÍZ SOBRE EL CRECIMIENTO DE ZYGOSACCHAROMYCES BAILII EN SISTEMAS QUE MODELAN ADEREZOS.

Zalazar A.L. ^(1,2), **Gliemmo M.F.** ^(1,2), **Campos C.A.** ^(1,2)

(1) Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Intendente Güiraldes s/n, Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina.

(2) CONICET, Buenos Aires, Argentina.
aldizalazar@hotmail.com

Resumen: En el presente trabajo se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de Tween20 y de aceite de maíz sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 en sistemas de pH 3,5 que modelan aderezos. En una primera etapa se estudió el efecto del Tween20 en sistemas acuosos y en una segunda etapa, se evaluó su efecto en emulsiones. Para esta última, se construyó un diseño factorial completo. Las variables y niveles fueron: Tween20 (1,00 y 2,00% m/m) y aceite (11,00 y 44,00% m/m). Los sistemas se formularon en caldo Sabouraud conteniendo 0,25% m/m de goma xántica. En las emulsiones, se adicionó aceite y se emulsificó. Los sistemas se inocularon con *Z. bailii*, se incubaron a 25°C, 10 días y se evaluó el recuento de la levadura. Los datos obtenidos se modelaron con la ecuación de Gompertz modificada obteniéndose la velocidad específica de crecimiento (μ_m) y el valor asintótico (A). En fase acuosa, el agregado de Tween20 disminuyó μ_m y A. Por el contrario, en las emulsiones se observó que μ_m aumentó con el aumento del contenido de Tween20. El efecto del incremento del nivel

de aceite dependió de la concentración de Tween20. Ello pone de manifiesto la existencia de una interacción entre dichos factores.

Palabras Clave: *Z. bailii*, emulsión, Tween 20, goma xántica, aceite de maíz.

Abstract: The present work deals with the evaluation of the effect of different concentrations of Tween 20 and corn oil on the development of *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 in systems of pH 3.5 that model salad dressings. In a first stage, the effect of Tween 20 in aqueous systems was studied and in a second stage, its effect on emulsions was evaluated. For the latter, a full factorial design was applied. The variables and levels were: Tween 20 (1.00 and 2.00% w/w) and oil (11.00 and 44.00% w/w). The systems were formulated in Sabouraud broth containing 0.25% w/w of xanthan gum. In the emulsions, oil was added and the emulsification was performed. The systems were inoculated with *Z. bailii*, incubated at 25°C for 10 days and the count of yeasts was performed. Data obtained were modeled by the modified Gompertz equation obtaining the specific growth rate (μ_m) and the asymptotic value (A). In aqueous phase, the addition of Tween 20 decreased μ_m and A. On the contrary, in the emulsions, it was observed that μ_m increased as Tween 20 concentration increased. Mentioned trends show the existence of an interaction between studied factors.

Keywords: *Z. bailii*, emulsion, Tween 20, xanthan gum, corn oil.

INTRODUCCION

Un gran número de estudios microbiológicos acerca de la estabilidad microbiológica de alimentos se realizan en sistemas acuosos. Sin embargo, muchos alimentos - tales como emulsiones - son sistemas heterogéneos y tienen estructuras complejas. Por lo tanto, es importante conocer los factores que afectan el crecimiento microbiano en estos sistemas heterogéneos (Naïtali *et al.* 2009).

En los últimos años los aderezos para ensaladas crecieron en popularidad. Muchos consumidores eligen ensaladas como una opción saludable, lo que significa también un aumento en el consumo de condimentos (Gledhill, 1998). Los aderezos para ensalada son sistemas químicos complejos ya que se elaboran a partir de una fase oleosa dispersa, un surfactante (generalmente no-iónico) y una elevada concentración de ácidos orgánicos incluidos en una fase acuosa que contiene habitualmente sales e hidrocoloides. A pesar de su alta acidez y reducida actividad acuosa, un limitado grupo de microorganismos acidófilos es capaz de crecer lo que se evidencia por la generación de dióxido de carbono y off-flavors. La microflora causante del deterioro de estos alimentos está restringida a unas pocas especies de *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Smittle 1977). De acuerdo con Kurtzman y *et al.* (1971) *Zygosaccharomyces bailii* es la levadura predominante en los productos almacenados que evidenciaron "off-flavors". En sistemas emulsionados, el crecimiento de *Z. bailii* está influenciado por la cantidad de aceite y la presencia de estabilizantes (Castro *et al.* 2003). Además, la estructura física

y propiedades reológicas de las emulsiones también son importantes desde un punto de vista microbiano. Se demostró que la estructura de una emulsión puede afectar el crecimiento microbiano (Brocklehurst y *et al.* 1995). La inmovilización de las bacterias en forma de colonias (en una emulsión de tipo sólido o en agar) puede ocasionar menores velocidades de crecimiento (Brocklehurst *et al.* 1993, Meldrum *et al.* 2003) y disminuir los límites del crecimiento / no crecimiento en términos de pH y actividad de agua (Koutsomanis *et al.* 2004, Meldrum *et al.* 2003). También puede influir en las propiedades fisicoquímicas de la superficie celular, relacionadas con la adherencia (Allion 2004; Naïtali *et al.* 2009).

Con frecuencia, se utiliza como agente emulsionante, Tween 20, el cual es un surfactante no iónico, que se añade a la fase acuosa de las emulsiones con el fin de estabilizarlo, impidiendo la coalescencia de las gotas de la fase dispersa (Mc Clements 1999). Un surfactante forma micelas en solución acuosa cuando su concentración excede cierto nivel crítico conocido como "concentración micelar crítica" (CMC) (Myers 1988). En general, en las formulaciones de emulsiones, la concentración de los surfactantes no iónicos utilizada excede a la CMC (Mc Clements 1999).

En este contexto, el presente estudio está orientado a evaluar el efecto de la presencia de diferentes concentraciones de Tween 20 (0,0; 1,0 y 2,0% m/m) y de aceite (11,0 y 44,0% m/m) sobre el crecimiento de *Z. bailii* NRRL 7256 en sistemas modelo acuosos y emulsiones ácidas de pH 3,50.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

Los medios utilizados para el cultivo, la preparación de los sistemas y el recuento del microorganismo fueron: caldo y agar Sabouraud (Biokar, Francia). El microorganismo empleado fue *Z. bailii* NRRL 7256. La goma xántica (Cargill, Argentina) y el aceite de maíz fueron de grado alimenticio. El Tween 20 y el ácido cítrico fueron de grado analítico (Anedra, Argentina).

Preparación de los sistemas modelo

Se formularon sistemas modelo en caldo Sabouraud con diferentes concentraciones de Tween 20, goma xántica y aceite de maíz, como se menciona en la Tabla 1, por pesada directa de los distintos ingredientes para obtener 200,0 g de cada sistema. Para poder comparar los sistemas acuosos con los emulsionados, la concentración de Tween 20 y de goma xántica en los sistemas acuosos B y C fue igual a la de las fases acuosas de los sistemas emulsionados E y G. Todos los ingredientes, a excepción del aceite, se suspendieron en agua destilada y se colocaron en frascos de vidrio de base circular. La goma xántica se dispersó en forma de lluvia y se dejó 24 horas en agitación para su hidratación. Los sistemas así constituidos fueron esterilizados en autoclave a 100°C durante 30 minutos. Luego, el pH fue ajustado a 3,50 por agregado aséptico de una solución de ácido cítrico (25 % m/v). El pH se midió con un electrodo de vidrio acoplado a un pHmetro Fisher (USA). Para la elaboración de las emulsiones, se agregó la cantidad correspondiente de aceite en condiciones de esterilidad y se realizó la emulsificación con un

homogeneizador de alta velocidad (Ultra turrax, IKA, Alemania) durante 1 minuto a 13500 rpm para formar la emulsión y luego 3 minutos a 24000 rpm para reducir el tamaño de gota.

Tabla 1. Concentración de goma xántica, Tween 20 y aceite de maíz en los sistemas modelo.

Sistemas	Goma xántica (% m/m)	Aceite (% m/m)	Tween (% m/m)
A	0,44	0,0	0,0
B	0,44	0,0	1,7
C	0,43	0,0	3,5
D	0,25	11,0	1,0
E	0,25	44,0	1,0
F	0,25	11,0	2,0
G	0,25	44,0	2,0
H	0,25	27,5	1,5

Preparación del inóculo, inoculación y almacenamiento

Se elaboró un inóculo transfiriendo una ansada de la cepa pura almacenada sobre agar Sabouraud a caldo Sabouraud. Para que el cultivo alcance la fase estacionaria, el caldo inoculado se incubó a 25°C ± 1°C durante 24 hs. Los sistemas modelo fueron inoculados con *Z. bailii*, de manera tal que permitiera obtener una población inicial de 10⁴ UFC/g. Luego, alícuotas de 30 g de cada uno de los sistemas inoculados fueron colocados por duplicado en frascos de vidrio estériles, los cuales se almacenaron en una cámara de temperatura constante a 25°C ± 1°C por 8 días. El crecimiento de la

levadura se determinó a intervalos de tiempo predeterminados durante el almacenamiento por recuento en placas con agar Sabouraud. Las placas se incubaron a 25°C ± 1°C y luego de 5 días se llevaron a cabo los recuentos.

Análisis de datos y diseño experimental

Los recuentos de *Z. bailii* obtenidos se modelaron con la ecuación de Gompertz modificada (ecuación 1) (Zwietering *et al.* 1990):

$$\ln \left(\frac{N}{N_0} \right) = A \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\mu_m \cdot \frac{e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

la cual expresa el logaritmo de la relación entre la población microbiana a un dado tiempo (N) y la población inicial (N₀) en función del tiempo. De esta manera, se obtuvieron los parámetros biológicos del crecimiento de la levadura: la velocidad específica de crecimiento (μ_m), el tiempo de fase lag (λ) y el valor asintótico (A).

Para establecer el efecto de la presencia de Tween 20 y de aceite sobre el desarrollo de la levadura, la velocidad de crecimiento y el valor asintótico de los sistemas emulsionados (sistemas D al H) se introdujeron en un diseño factorial completo, en dos bloques, con dos variables a dos niveles (2²) y un punto central, realizando un total de 10 experimentos. Las variables y niveles se indican en la Tabla 2. El nivel mínimo de goma xántica fue elegido teniendo en cuenta la cantidad mínima necesaria para mantener estable la emulsión en el transcurso del ensayo.

El efecto de cada variable independiente sobre los parámetros biológicos se evaluó a través del siguiente modelo de regresión, según la ecuación 2:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (2)$$

donde *y* simboliza cada uno de los parámetros biológicos; *x*₁ y *x*₂ son las variables de estudio; β₀, el término de intersección; β₁ y β₂, los coeficientes lineales, y β₁₂, el coeficiente de interacción.

La adecuación de ambos modelos de regresión se examinó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y se obtuvieron los coeficientes de correlación ajustados (R²_{aj}), la desviación media absoluta (AAD) y la raíz del error cuadrático medio (RMSE). Además, el ANOVA y p-valor se utilizaron para evaluar la significatividad de los términos lineales y de interacción de cada modelo de regresión generado por el diseño factorial.

Los parámetros μ_m y A en los sistemas acuosos fueron analizados mediante un ANOVA y el test de Tukey para la comparación de medias.

La regresión no lineal de los datos, la creación del diseño y el análisis de los parámetros de crecimiento se realizaron mediante el empleo del programa Statgraphics® (Statgraphics Centurion para Windows 7, 2005, USA). En todos los casos, la significatividad estadística se evaluó al nivel del 5 % (p ≤ 0,05).

Tabla 2. Niveles de las variables del diseño factorial 2².

Variable independiente	Código de variable	Niveles (% m/m)		
		Mínimo	Punto central	Máximo
Nivel de Tween 20	x ₁	1,0	1,5	2,0
Nivel de Aceite	x ₂	11,0	27,5	44,0

RESULTADOS Y DISCUSION

Curvas de crecimiento

En la **Figura 1** se muestran, a modo de ejemplo, los datos experimentales y las curvas de crecimiento predichas por la ecuación de Gompertz modificada para el sistema acuoso B y para la emulsión F. Cabe destacar que, para evaluar la influencia de los ingredientes sobre el crecimiento de *Z. bailii*, sólo se consideraron los parámetros μ_m y A debido a que el parámetro λ presentaba elevados errores experimentales por haberse colectado pocos datos en esa zona de la curva. Las curvas de crecimiento se modelaron satisfactoriamente obteniéndose valores de R^2 entre 0,98 y 0,99 y bajos valores de AAD y RMSE.

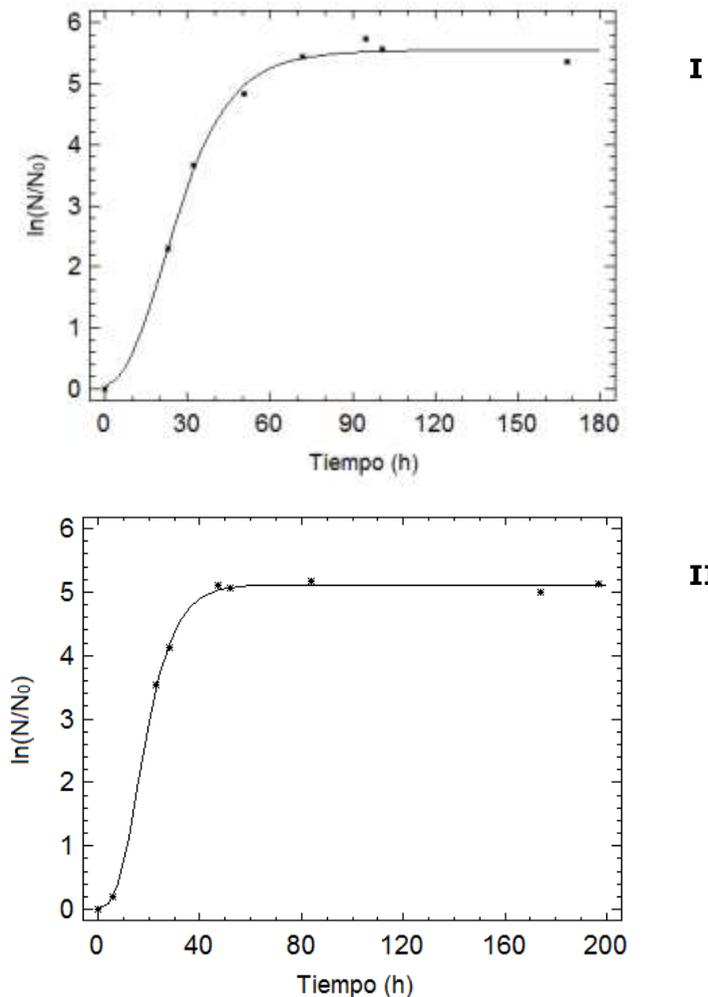


Figura 1. Curvas de crecimiento de *Z. bailii* modeladas. Panel I: sistema acuoso con 0,25 % p/p de goma xántica y 1 % p/p de Tween 20. Panel II: sistema emulsionado con 0,25 % p/p de goma xántica, 11,0 % p/p de aceite y 2 % p/p de Tween 20. (*) datos experimentales, (—) modelo ajustado.

Efecto de la concentración de Tween 20 sobre el crecimiento de *Z. bailii* en medio acuoso

En los sistemas acuosos el agregado de Tween 20 influyó sobre el crecimiento de *Z. bailii*. Al aumentar la concentración del surfactante disminuyó significativamente μ_m y A de la levadura (Figura 2). Este efecto se vincularía con la posible solubilización de los componentes lipídicos de la membrana de *Z. bailii*, producida por la presencia de Tween 20, lo que afectaría su desarrollo (Kurup *et al.* 1991b). Por otra parte, el surfactante en fase acuosa se encuentra formando micelas, las cuales podrían estar atrapando nutrientes y estos se encontrarían menos disponibles para los microorganismos.

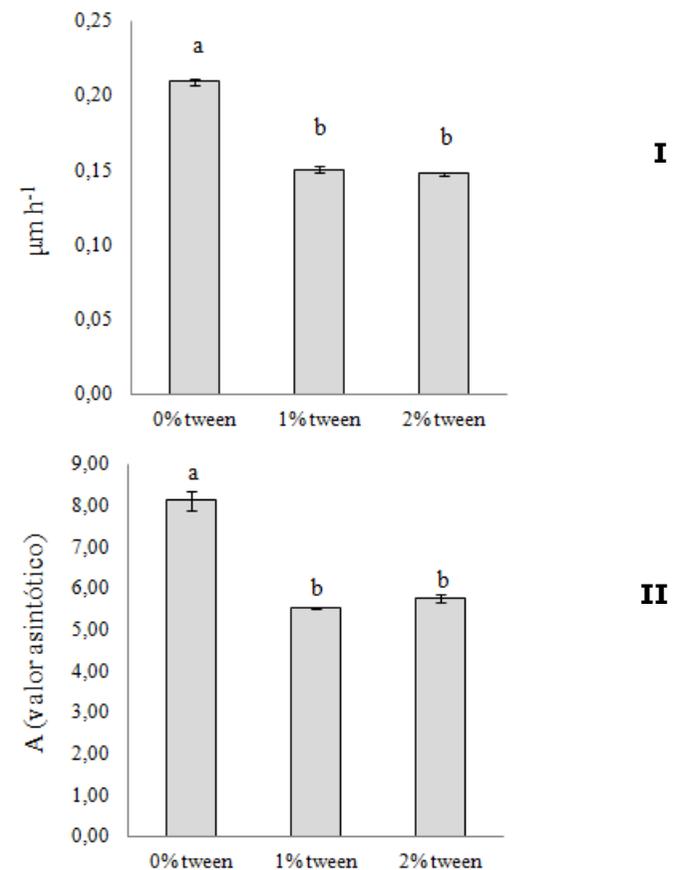


Figura 2. Efecto de la concentración de Tween 20 sobre los parámetros de crecimiento de *Z. bailii* en los sistemas acuosos A, B y C. Panel I: velocidad específica de crecimiento μ_m (h⁻¹). Panel II: Valor asintótico (A). Dentro de cada panel, las barras marcadas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$; test de Tukey).

Efecto de la concentración de Tween 20 y de aceite de maíz sobre el crecimiento de *Z. bailii* en emulsiones

El efecto del Tween 20 y del aceite sobre los parámetros de crecimiento de *Z. bailii* fueron ajustados a modelos de regresión, cuyos coeficientes se muestran en la Tabla 3. Los valores altos de R²aj obtenidos y bajos de AAD y de RSME muestran la existencia de una correlación entre los valores de respuesta observados y predichos, indicando que los modelos dan una buena estimación de las respuestas en el rango estudiado.

Tabla 3. Valores de probabilidad (p), coeficientes de correlación ajustados (R²aj), desviación media absoluta (AAD), raíz del error cuadrático medio (RMSE) y coeficientes de los modelos de regresión para los parámetros de crecimiento de *Z. bailii*.

Respuesta	Coeficientes de regresión				R ² aj	AAD	RMSE	p valor		
	β ₀	β ₁	β ₂	β ₁₂				x ₁	x ₂	x ₁ x ₂
μ _m	0,1641	0,0347	- 0,0003	0,0004	84,5	2,53	0,01	0,0015	0,1886	0,3718
A	6,0188	- 0,4933	- 0,0503	0,0239	93,9	1,01	0,06	0,0385	0,0005	0,0011

β₀: término de intersección; β₁: coeficiente de regresión del nivel de Tween 20; β₂: coeficiente de regresión del nivel de aceite de maíz; β₁₂: coeficiente de interacción nivel de Tween 20*nivel de aceite de maíz. x₁: nivel de Tween 20, x₂: nivel de aceite de maíz y x₁x₂: interacción.

En la Figura 3 se muestra el efecto de los factores estudiados sobre la velocidad de crecimiento y la población máxima alcanzada. Se observó que tanto la presencia de Tween 20 como del aceite afectaron significativamente el desarrollo de

la levadura. El parámetro μ_m aumentó significativamente con el incremento del contenido de Tween 20 (Figura 3, panel I). Esto podría atribuirse a que en las emulsiones, el surfactante está ubicado en la interfase y afectaría de diferente forma el desarrollo de la levadura. Probablemente, el tensioactivo podría ser metabolizado por el microorganismo o actuar como un "portador de nutrientes" entre la fase acuosa y la membrana celular en la fase aceite, promoviendo, de esta forma, su crecimiento o prolongando la supervivencia microbiana (Kurup, 1991).

El efecto del incremento del nivel de aceite dependió de la concentración del surfactante. Como puede observarse en la Figura 3, panel II, en presencia de 1,00 % m/m de Tween 20, el parámetro A disminuyó significativamente, mientras que no se observó efecto en presencia de 2,00 % m/m de Tween 20. Ello pone de manifiesto la existencia de una interacción entre dichos factores. El aumento del volumen de la fase oleosa parecería tener un efecto preservador sobre las emulsiones modeladas. Este efecto podría atribuirse a la consecuente reducción de la fase acuosa donde se hallan los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano (Brocklehurst y col., 1995). Al aumentar la concentración de Tween 20, probablemente se esté contrarrestando el efecto preservador del aceite.

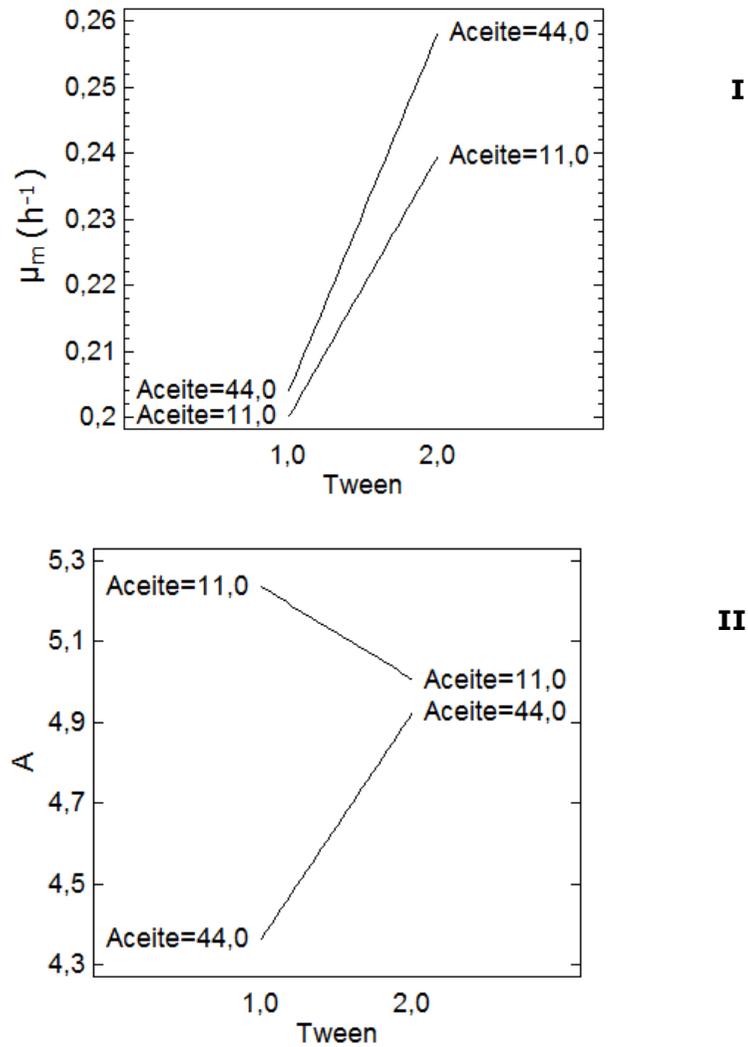


Figura 3. Efecto combinado del Tween 20 y aceite de maíz sobre la velocidad específica de crecimiento (μ_m) (Panel I), y el valor asintótico (A) (Panel II) de *Z. bailii* en las emulsiones.

CONCLUSIONES

En los sistemas estudiados, la concentración de Tween 20 y de aceite afectaron el crecimiento de *Z. bailii* NRRL 7256. La adición de Tween 20 a las fases acuosas disminuyó el crecimiento de las levaduras, pero tuvo un efecto contrario en las emulsiones.

En cuanto al efecto del aceite, el incremento de su concentración disminuyó el crecimiento de la levadura al restringir el espacio para dicho crecimiento. Este efecto fue contrarrestado al aumentar la concentración de Tween 20, lo que evidencia una interacción entre ambos factores.

Los resultados comentados destacan la importancia que ejercen el agente emulsionante y el aceite sobre el desarrollo de la levadura.

BIBLIOGRAFIA

Allion A. 2004. Environnement des bactéries et sensibilité aux biocides - mise au point d'une technique rapide pour déterminer l'activité bactéricide d'agents antimicrobiens. Université d'Orsay, France. Thesis.

Brocklehurst T, Parker M, Gunning P, Robins M. 1993. Microbiology of food emulsions: physicochemical aspects. *Lipid Technology* 83-88.

Brocklehurst TF, Parker ML, Gunning PA, Coleman HP, Robins MM. 1995. Growth of food-borne pathogenic bacteria in oil-in-water emulsions: II - effect of emulsion structure on growth parameters and form of growth. *Journal of Applied Bacteriology*. 78: 609-615.

Castro M, Garro O, Gerschenson LN y Campos CA. 2003. Interaction between potassium sorbate, oil and tween 20: Its effect on the growth and inhibition of *Z. bailii* in model salad dressings. *Journal of Food Safety* 23: 47-59.

Castro M, Garro O, Gerschenson LN y Campos CA. 2003. Effect of preservatives, tween 20, oil content and emulsion structure on the survival of *Lactobacillus fructivorans* in model salad dressings. *LWT-Food Science and Technology*. 42:1428-1434.

Gledhill B. 1998. Soups and saucery. *Food Manufacture*. 4: 22-41.

Koutsomanis KP, Kendall PA, Sofos JN. 2004. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on solid surface. *Food Microbiology* 21: 415-422.

Kurtzman CP, Rogers PR y Hesseltine CW. 1971. Microbiological spoilage of mayonnaise and salad dressings. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 21:870-874.

Kurup TRR, Wan LSC y Chan LW. 1991. Effect of surfactants on the antibacterial activity of preservatives. *Pharm. Acta Helv.* 66, no. 9-10: 274-280.

Mc Clements DJ. 1999. Emulsion Stability. En: *Food Emulsions. Principles, Practice, and Technics*. Ed: CRC Press, Boca Raton, Florida, Estados Unidos. 7:185-232.

Meldrum RJ, Brocklehurst TF, Wilson DR, Wilson PDG. 2003. The effects of cell immobilization, pH and sucrose on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at 10 degrees C. *Food Microbiology* 20: 97-103.

Myers D. 1988. *Surfactant Science Technology*, VCH Publishers, Weinheim, Germany.

Naïtali M, Dubois-Brissonnet F, Cuvelier G, Bellon-Fontaine MN. 2009. Effects of pH and oil-in-water emulsions on growth and physicochemical cell surface properties of *Listeria monocytogenes*: Impact on tolerance to the bactericidal activity of disinfectants. *International Journal of Food Microbiology* 130: 101-107.

Sikora M, Badrie N, Deisingh AK, Kowalski A. 2008. Sauces and Dressings: A Review of Properties and Applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48:50-77.

Smittle RB y Flowers RS. 1982. Acid tolerant microorganisms involved in the spoilage of salad dressing. *Journal of Food Protection*. 45(10):977-983.

Smittle RB. 1977. Microbiology of mayonnaise and salad dressing. *Journal of Food Protection*. 40:415-421.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico de la Universidad de Buenos Aires y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

MODELADO DEL CRECIMIENTO DE ZYGOSACCHAROMYCES BAILII EN EMULSIONES QUE SIMULAN SALSAS ÁCIDAS.

Zalazar A.L.^{1,2}, **Gliemmo M.F.**^{1,2}, **Campos C.A.**^{1,2}

(1) Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Intendente Güiraldes s/n, Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina.

(2) CONICET, Buenos Aires, Argentina.
aldizalazar@hotmail.com

Resumen: El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de goma xántica y de aceite sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 en sistemas modelo acuosos y en emulsiones ácidas de pH 3,50 mediante la aplicación de un modelo secundario. Para tal fin se construyó un diseño factorial completo. Las variables y niveles fueron: goma xántica (0,250; 0,625 y 0,100% m/m) y aceite (11,0; 27,5 y 44,0% m/m). Los sistemas se formularon en caldo Sabouraud. En el caso de las emulsiones, se adicionó aceite de maíz y se realizó la emulsificación. Los sistemas se inocularon con *Z. bailii*, se incubaron a 25°C por 7 días y se evaluó la población de la levadura por recuento de viables en placa a distintos tiempos. Los datos obtenidos se modelaron con la ecuación de Gompertz modificada obteniéndose los parámetros biológicos de crecimiento. Se aplicó el diseño factorial a los parámetros obtenidos, se calcularon las ecuaciones de los modelos predictivos y se realizó su validación. Se verificó que la concentración de goma xántica y de aceite afectaron el crecimiento de *Z. bailii*. Ello destaca la

importancia que ejercen el agente estabilizante, el aceite y su interacción sobre el desarrollo de la levadura.

Palabras Clave: *Z. bailii*, emulsión, goma xántica, aceite de maíz.

Abstract: The objective of the present work was to evaluate the effect of different concentrations of xanthan gum and oil on the development of *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 in aqueous model systems and in acid emulsions of pH 3.50 through the application of a secondary model. For that purpose, a full factorial design was constructed. The variables and levels were: xanthan gum (0,250; 0,625 and 0,100% w/w) and oil (11,0; 27,5 and 44,0% w/w). The systems were formulated with Sabouraud broth. In the case of emulsions, oil was added and emulsification was performed. The systems were inoculated with *Z. bailii*, they were incubated at 25°C for 7 days and the yeast population was evaluated at different times by plate count. Data obtained were modeled with modified Gompertz equation obtaining biological parameters of growth. The factorial design was applied to parameters obtained, equations from predicted models were estimated and validation was performed. It was verified that xanthan gum concentrations and oil influenced *Z. bailii* growth. Mentioned trends highlight the important role exerted by the stabilizing agent, the oil and its interaction on yeast development.

Keywords: *Z. bailii*, emulsion, xanthan gum, corn oil.

INTRODUCCIÓN

Los aderezos para ensaladas son emulsiones de aceite en agua. Se elaboran a partir de una fase oleosa dispersa, un emulsionante y una elevada concentración de ácidos orgánicos incluidos en la fase acuosa que contiene sales y otros aditivos. Debido a que las emulsiones son termodinámicamente inestables, se agregan estabilizantes como la goma xántica con el objetivo de facilitar su formación y mejorar la estabilidad. La goma xántica es un heteropolisacárido dispersable en agua fría y en soluciones ácidas.

A pesar de la alta acidez de los aderezos, un limitado grupo de microorganismos acidófilos es capaz de crecer, formándose dióxido de carbono y off-flavors. La microflora causante del deterioro está restringida a unas pocas especies de *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Smittle 1977). De acuerdo con Kurtzman, Rogers y Hesseltine (1971), *Z. bailii* es la levadura predominante en los productos almacenados que evidenciaron "off-flavors". La importancia se debe a que esta levadura es osmofílica, resistente a la pasteurización y a preservadores lipofílicos, y es capaz de crecer en condiciones anaerobias, de muy elevada acidez y con escasos nutrientes (Thomas y Davenport 1985). En sistemas emulsionados, el crecimiento de *Z. bailii* es influenciado por la cantidad de aceite y la presencia de estabilizantes (Castro *et al.* 2003).

El empleo de un modelo empírico primario, como es la ecuación de Gompertz modificada, permite modelar los cambios que ocurren en una población microbiana en función

del tiempo y obtener los parámetros de crecimiento característicos. A partir de estos y de su variación debido a los factores del entorno, como la presencia de aditivos, se pueden construir modelos secundarios y, de esta manera, predecir los cambios que se producen en la población microbiana cuando es sometida a diversas condiciones ambientales específicas (Hracek *et al.* 2009).

El presente estudio está orientado a evaluar el efecto de diferentes concentraciones de goma xántica (0,25 - 1,00% p/p) y de aceite de maíz (11,0 - 44,0% m/m) sobre el crecimiento de *Z. bailii* en sistemas modelo acuosos y emulsiones ácidas de pH 3,5 mediante la aplicación de un modelo secundario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El microorganismo usado fue *Z. bailii* NRRL 7256. Los medios utilizados para el cultivo, la preparación de los sistemas y el recuento del microorganismo fueron: caldo y agar Sabouraud (Biokar, Francia). El ácido cítrico fue de grado analítico (Anedra, Argentina). La goma xántica (Cargill, Argentina) y el aceite de maíz fueron de grado alimenticio.

Preparación de los sistemas modelo

Se formularon sistemas modelo en caldo Sabouraud con diferentes concentraciones de goma xántica y aceite de maíz como se muestra en la Tabla 1, por pesada directa de los distintos ingredientes para obtener 200,0 g de cada sistema. Para poder comparar los sistemas acuosos con los emulsionados, la concentración de goma xántica en los

sistemas acuosos B y C fue igual a la de las fases acuosas de los sistemas emulsionados F y G. Todos los ingredientes, a excepción del aceite, se suspendieron en agua destilada y se colocaron en frascos de vidrio de base circular. La goma xántica se dispersó en forma de lluvia y se dejó en agitación 24 horas para su hidratación. Los sistemas así constituidos fueron esterilizados en autoclave a 100°C durante 30 minutos. Luego, el pH fue ajustado a 3,50 por agregado aséptico de una solución de ácido cítrico (25% m/v). El pH se midió con un electrodo de vidrio acoplado a un pHmetro Fisher (USA). Para la elaboración de las emulsiones, se agregó la cantidad correspondiente de aceite en condiciones de esterilidad y se realizó la emulsificación con un homogeneizador de alta velocidad (Ultra turrax, IKA, Alemania) durante 1 minuto a 13500 rpm para formar la emulsión y luego 3 minutos a 24000 rpm para reducir el tamaño de gota.

Tabla 1. Concentración de goma xántica y aceite de maíz en los sistemas modelo.

Sistemas	Goma xántica (% m/m)	Aceite de maíz (% m/m)
A	0,000	0,0
B	0,448	0,0
C	1,818	0,0
D	0,250	11,0
E	1,000	11,0
F	0,250	44,0
G	1,000	44,0
H	0,625	27,5

Preparación del inóculo, inoculación y almacenamiento
El inóculo se elaboró transfiriendo una ansada de la cepa pura almacenada sobre agar Sabouraud a caldo Sabouraud. El

caldo inoculado se incubó a 25°C ± 1°C durante 24 hs, tiempo suficiente para que el cultivo alcance la fase estacionaria. Los sistemas modelo fueron inoculados con *Z. bailii*, alcanzando una población inicial de 10⁴ UFC/g. Alícuotas de 30 g de cada uno de los sistemas inoculados fueron colocados por duplicado en frascos de vidrio estériles los cuales se almacenaron en una cámara de temperatura constante a 25°C ± 1°C por 7 días. El crecimiento de la levadura se determinó a intervalos de tiempo predeterminados durante el almacenamiento por recuento en placas con agar Sabouraud. Las placas se incubaron a 25°C ± 1°C y luego de 5 días se llevaron a cabo los recuentos.

Análisis de datos y diseño experimental

Los recuentos de *Z. bailii* obtenidos se modelaron con la ecuación de Gompertz modificada (ecuación 1) (Zwietering *et al.* 1990):

$$\ln \left(\frac{N}{N_0} \right) = A \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\mu_m \cdot \frac{e}{A} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

la cual expresa el logaritmo de la relación entre la población microbiana a un dado tiempo (N) y la población inicial (N₀) en función del tiempo. De esta manera, se obtuvieron los parámetros biológicos del crecimiento de la levadura: la velocidad específica de crecimiento (μ_m), el tiempo de fase lag (λ) y el valor asintótico (A).

Para establecer el efecto de la presencia de goma xántica y de aceite sobre el desarrollo de la levadura, la velocidad de crecimiento y el valor asintótico de los sistemas emulsionados (sistemas D al H) se introdujeron en un diseño factorial

completo, en dos bloques, con dos variables a dos niveles (2^2) y un punto central, realizando un total de 10 experimentos. Las variables y niveles se indican en la Tabla 2. El nivel de goma xántica fue elegido teniendo en cuenta la cantidad mínima necesaria para mantener estable la emulsión en el transcurso del ensayo.

El efecto de cada variable independiente sobre los parámetros biológicos se evaluó a través del siguiente modelo de regresión, según la ecuación 2:

$$y = \beta_0 + \beta_1.X_1 + \beta_2.X_2 + \beta_{12}.X_1.X_2 \quad (2)$$

donde y simboliza cada uno de los parámetros biológicos; x_1 y x_2 son las variables de estudio; β_0 , el término de intersección; β_1 y β_2 , los coeficientes lineales, y β_{12} , el coeficiente de interacción.

La adecuación de ambos modelos de regresión se examinó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) y se obtuvieron los coeficientes de correlación ajustados (R^2_{aj}), la desviación media absoluta (AAD) y la raíz del error cuadrático medio (RMSE). Además, el ANOVA y p-valor se utilizaron para evaluar la significatividad de los términos lineales y de interacción de cada modelo de regresión generado por el diseño factorial.

Los parámetros μ_m y A en los sistemas acuosos fueron analizados mediante un ANOVA y el test de Tukey para la comparación de medias. El mismo análisis se aplicó al estudio del efecto del agregado de aceite a los sistemas acuosos.

La regresión no lineal de los datos, la creación del diseño y el análisis de los parámetros de crecimiento se realizaron mediante el empleo del programa Statgraphics® (Statgraphics Centurion para Windows 7, 2005, USA). En todos los casos, la significatividad estadística se evaluó al nivel del 5 % ($p \leq 0,05$).

Tabla 2. Niveles de las variables del diseño factorial 2^2 .

Variable independiente	Código de variable	Niveles (% m/m)		
		Mínimo	Punto central	Máximo
Nivel de Aceite	x_1	11,0	27,5	44,0
Nivel de Goma Xántica	x_2	0,250	0,625	1,000

Validación

Para la validación externa de los modelos de regresión, se elaboró una emulsión conteniendo 0,375 % m/m de goma xántica y 27,5 % m/m de aceite de maíz, se aplicaron los mismos ensayos, bajo las mismas condiciones experimentales que los realizados para la construcción de los modelos de regresión. Los valores experimentales de la velocidad específica de crecimiento (μ_m) y del valor asintótico (A) obtenidos, fueron comparados gráficamente con los valores predichos por los modelos (Cayre *et al.* 2001). Para evaluar la adecuación del ajuste de los puntos experimentales con los valores predichos por el modelo, se calculó la raíz del error cuadrático medio (RMSE).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento obtenidas fueron modeladas satisfactoriamente mediante la ecuación de Gompertz modificada obteniéndose valores de R^2_{aj} entre 0,98 y 0,99 y

bajos valores de AAD y RMSE. Estos valores indican una buena correlación entre los valores observados y predichos por la ecuación 1.

En la **Figura 1** se muestran, a modo de ejemplo, los datos experimentales y las curvas predichas para el sistema acuoso B y para la emulsión F. Cabe destacar que, para evaluar la influencia de los aditivos sobre el crecimiento de *Z. bailii*, sólo se consideraron los parámetros μ_m y A debido a que el parámetro λ presentaba elevados errores experimentales por el escaso número de muestras evaluadas en ese lapso.

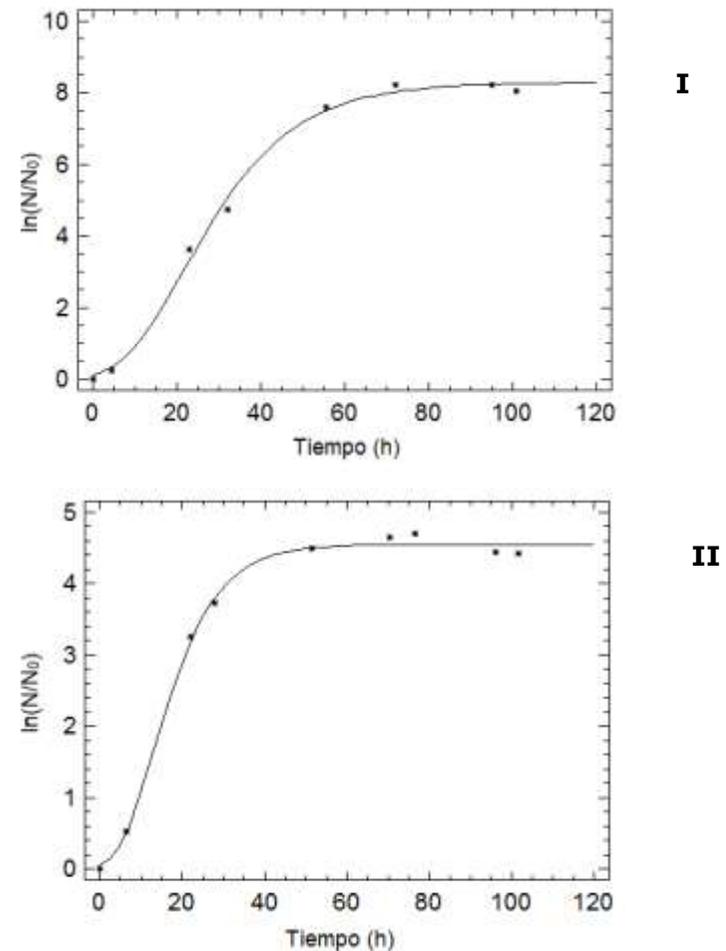


Figura 1. Curvas de crecimiento de *Z. bailii* modeladas. Panel I: sistema acuoso con 1,0 % p/p de goma xántica. Panel II: sistema emulsionado con 0,25 % p/p de goma xántica y 11,0 % p/p de aceite. (*) datos experimentales, (→) modelo ajustado.

Efecto de la concentración de goma xántica sobre el crecimiento de *Z. bailii* en medio acuoso

La concentración de goma xántica en los sistemas acuosos influyó sobre el crecimiento de *Z. bailii*. Al aumentar el contenido de goma xántica se incrementó significativamente la velocidad específica de crecimiento de la levadura (Figura 2, panel I). El valor asintótico aumentó por el incremento de la concentración de goma xántica de 0,00 a 0,25 % m/m. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas al aumentar la concentración de goma xántica de 0,00 a 1,00 % m/m (Figura 2, panel II). Esta tendencia podría vincularse con el hecho de que la goma puede proveer un medio más favorable para el crecimiento microbiano. Sin embargo, se sabe que la presencia de un agente viscosante podría entretener el crecimiento de los microorganismos, los cuales dejan de crecer en forma planktónica para desarrollarse como colonias (Antwi *et al.* 2006). Con 0,25 % p/p de goma xántica se expresa la acción de la goma como nutriente y cuando sube a 1,00 % p/p de goma xántica prima el efecto viscosante.

Efecto del agregado de aceite a los sistemas acuosos sobre el crecimiento de *Z. bailii*

El agregado de aceite a los sistemas acuosos influyó negativamente sobre el crecimiento de *Z. bailii*. (Figura 3). A cada nivel de goma xántica, los parámetros μ_m y A disminuyeron significativamente al agregar aceite. En trabajos previos se observó que en emulsiones donde la concentración de aceite es baja, el crecimiento de las bacterias es en forma planktónica, pero a medida que aumenta la concentración de aceite las bacterias se empiezan a inmovilizar entre las gotitas de aceite y el crecimiento se da en forma de colonias (Wilson

y col., 2002) Al restringir el espacio para el crecimiento, los valores de pH y de actividad de agua que se requieren para la iniciación del crecimiento de las bacterias inmovilizadas son más altos que para las que crecen libremente en forma planktónicas, y por lo tanto la inmovilización por la fase lipídica puede contribuir a la conservación de emulsiones de alimentos (Brocklehurst y Wilson 2000).

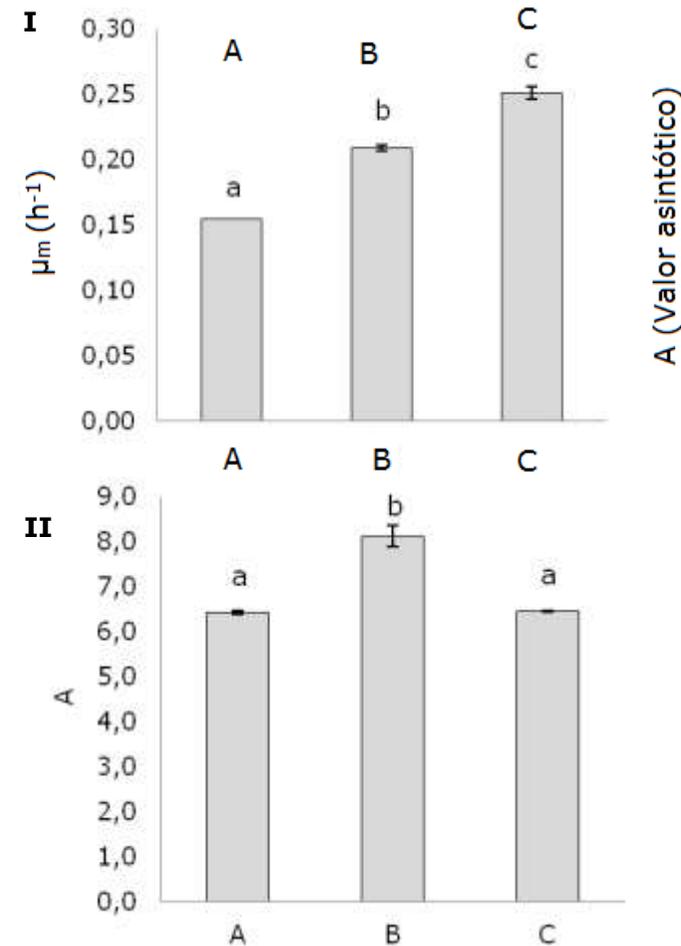


Figura 2. Efecto de la concentración de goma xántica sobre los parámetros de crecimiento de *Z. bailii* en los sistemas acuosos A, B y C. Panel I: velocidad específica de crecimiento μ_m (h^{-1}). Panel II: Valor asintótico (A). Dentro de cada panel, las barras marcadas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$; test de Tukey).

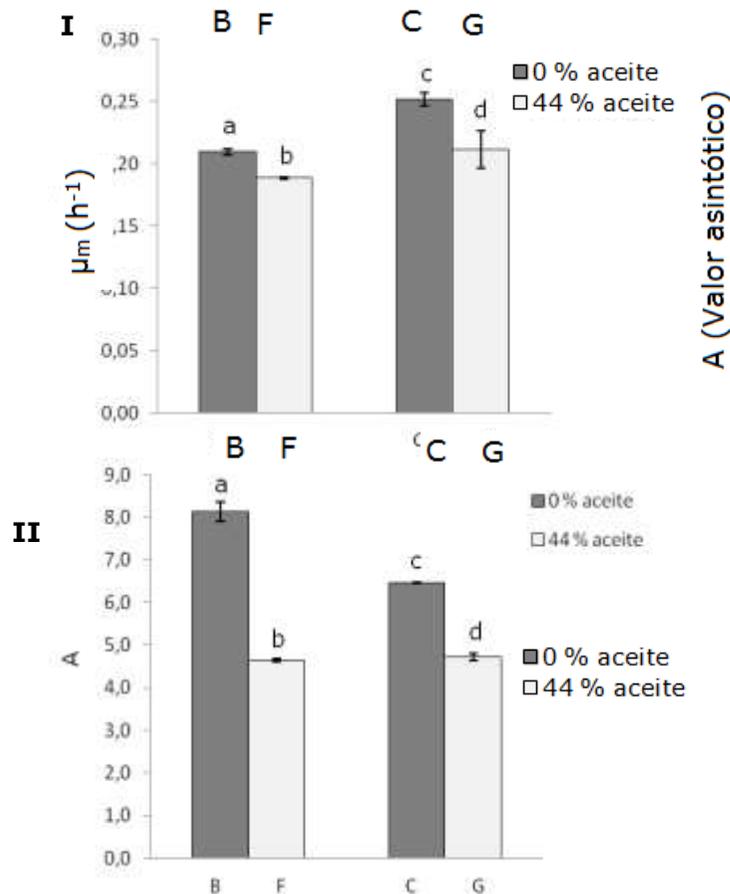


Figura 3. Efecto del agregado de aceite a los sistemas acuosos B y C sobre los parámetros de crecimiento de *Z. bailii*. Panel I: velocidad específica de crecimiento (μ_m). Panel II: Valor asintótico (A). Las diferencias significativas se analizaron para cada nivel de goma xántica por separado. Las barras marcadas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$; test de Tukey).

Efecto de la concentración de goma xántica y de aceite sobre el crecimiento de *Z. bailii* en emulsiones

El efecto del aceite y la goma xántica sobre los parámetros de crecimiento de *Z. bailii* fueron ajustados a modelos de regresión, cuyos coeficientes se muestran en la Tabla 3. Los valores de R^2_{aj} obtenidos, y los de AAD y de RSME bajos muestran la existencia de una correlación entre los valores de respuesta observados y predichos, indicando que los modelos dan una buena estimación de las respuestas en el rango estudiado.

Tabla 3. Valores de probabilidad (p), coeficientes de correlación ajustados (R^2_{aj}), desviación media absoluta (AAD), raíz del error cuadrático medio (RMSE) y coeficientes de los modelos de regresión para los parámetros de crecimiento de *Z. bailii*.

Respuesta	Coeficientes de regresión				R^2_{aj}	AAD	RMSE	P valor		
	β_0	β_1	β_2	β_{12}				x_1	x_2	x_1x_2
μ_m	0,1425	0,0008	0,3676	-0,0077	98,5	2,90	0,01	<0,0001	<0,0001	0,0001
A	6,3655	-0,0397	1,0133	-0,0206	97,4	1,71	0,11	<0,0001	0,0258	0,0627

β_0 : término de intersección; β_1 : coeficiente de regresión del nivel de aceite; β_2 : coeficiente de regresión del nivel de goma xántica; β_{12} : coeficiente de interacción nivel de aceite*nivel de goma xántica. x_1 : nivel de aceite, x_2 : nivel de goma xántica y x_1x_2 : interacción.

En la **Figura 4** se muestra el efecto de los factores estudiados sobre la velocidad de crecimiento y la población máxima alcanzada. Se observó que tanto la presencia del aceite como de la goma xántica afectaron significativamente el desarrollo de la levadura.

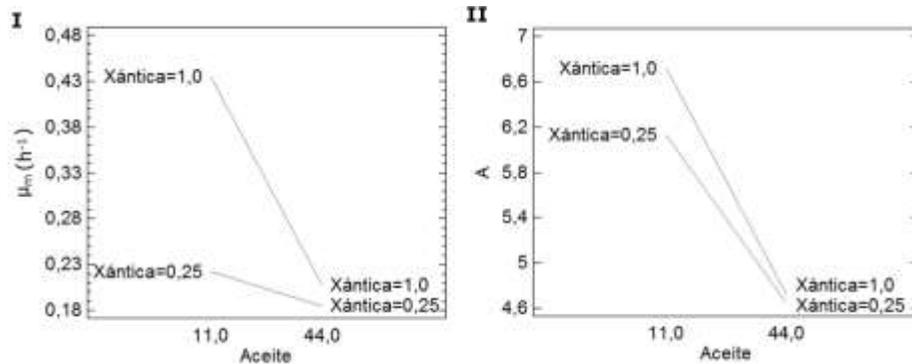


Figura 4. Efecto combinado de goma xántica y aceite sobre la velocidad específica de crecimiento, μ_m , (Panel I), y el valor asintótico, A, (Panel II) de *Z. bailii* en las emulsiones.

En cuanto al efecto de la concentración de fase aceite, se obtuvo que el crecimiento de la levadura disminuyó significativamente al incrementarse la concentración de aceite. Tanto la velocidad específica de crecimiento, como el valor asintótico, se vieron afectados. Esta tendencia probablemente sea ocasionada, como ya se mencionó, por la restricción del espacio disponible para el crecimiento que ejercería el alto nivel de aceite, que promueve el crecimiento en forma de colonias. De esta forma, el aceite actúa como un factor de preservación (Brocklehurst et al. 2000, Castro et al. 2003).

El aumento de la concentración de goma xántica incrementó significativamente la velocidad de crecimiento específica y el valor asintótico. Esta tendencia podría vincularse con el hecho de que la goma puede proveer un medio más favorable para el crecimiento microbiano. En presencia del menor contenido de aceite (11% m/m), al aumentar la concentración de xántica se incrementan los parámetros μ_m y A. Sin embargo, al aumentar la cantidad de aceite (44% m/m) este comportamiento es mucho menos marcado. Esto sugiere que existe una interacción entre ambos factores. Probablemente, la disminución sobre el crecimiento que provoca la presencia de la fase aceite enmascare la acción estimulante de la goma xántica observada anteriormente.

Validación

La validación cuantifica la precisión del modelo para explicar nuevos datos experimentales en condiciones similares a las empleadas para desarrollar el modelo. Para su verificación, en este trabajo, se validaron datos de recuentos obtenidos experimentalmente en un sistema conteniendo 0,375 % m/m de goma xántica y de 27,5 % m/m de aceite de maíz. Estos se modelaron con la ecuación de Gompertz modificada para obtener los parámetros de crecimiento, los cuales se compararon con las predicciones de los modelos de regresión. En la Tabla 4 se muestran los valores de velocidad específica de crecimiento (μ_m) y el valor asintótico (A) calculados a partir de la ecuación obtenida del modelo de Gompertz modificado y los valores obtenidos experimentalmente para el sistema ensayado. Se puede observar que los valores son muy cercanos entre sí.

Tabla 4. Velocidad específica de crecimiento (μ_m) y valor asintótico (A) estimados por los modelos de regresión y los obtenidos experimentalmente.

	μ_m (h^{-1})	A
Estimados por el modelo	0,22	5,44
Determinados en forma experimental	0,20	5,27
	0,19	5,25

En la Figura 5 se pueden observar gráficamente los valores predichos en función de los valores observados por el modelo y los valores obtenidos experimentalmente para μ_m y A del sistema adicional. En ellos se puede observar que los datos adquiridos experimentalmente se correlacionan con los del modelo.

Los resultados obtenidos muestran que los modelos secundarios, desarrollados para la μ_m y A de *Z. bailii*, bajo las condiciones experimentales evaluadas, presentan bajos valores de RMSE (0,0279 para μ_m y 0,1791 para A), lo que indica que el ajuste de los puntos experimentales a los valores predichos por el modelo es adecuado, lográndose hacer estimaciones acertadas del crecimiento de la población en función del tiempo (Buelvas Salgado 2003).

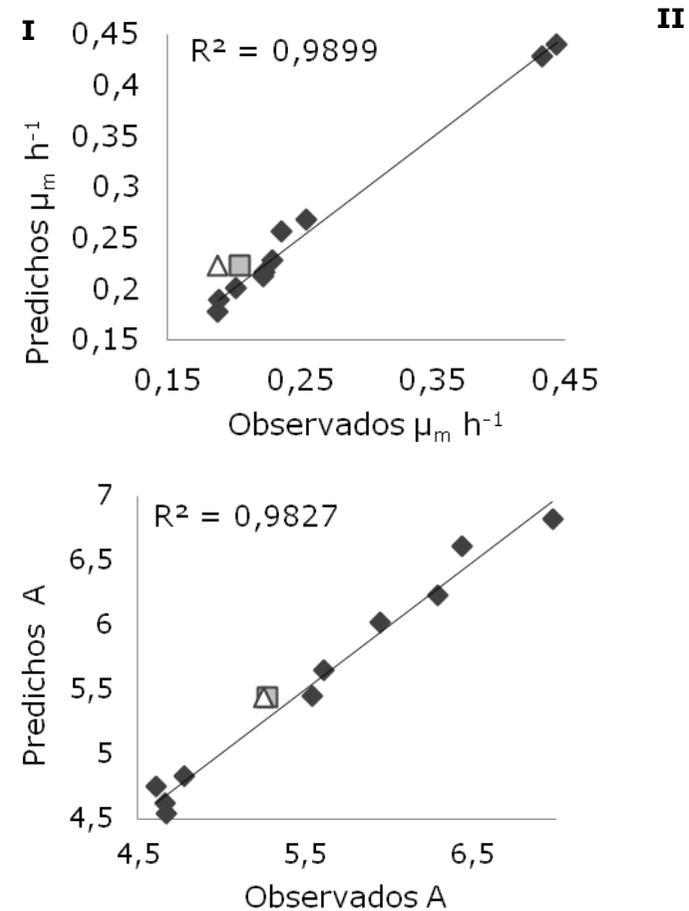


Figura 5. Correlación entre observaciones y predicciones para el modelo y su comparación con los valores obtenidos experimentalmente con un sistema distinto para la velocidad específica de crecimiento, μ_m , (Panel I), y el valor asintótico, A, (Panel II) de *Z. bailii* en las emulsiones. (\blacklozenge) Valores del modelo, (\triangle \square) valores de los sistema con 0,375 % m/m de goma xántica y 27,5 % m/m de aceite.

CONCLUSIONES

En los sistemas estudiados, la concentración de goma xántica y de aceite afectaron el crecimiento de *Z. bailii* NRRL 7256. Tanto en los sistemas acuosos como en los emulsionados, al aumentar el contenido de goma xántica aumentó significativamente el crecimiento de la levadura, comportamiento que se vinculó con la capacidad de la goma para actuar como nutriente. En cuanto al efecto del aceite, el incremento de su concentración disminuyó el crecimiento de la levadura al restringir el espacio para dicho crecimiento. Por lo tanto, actuaría como un factor de preservación. Los niveles de goma xántica empleados permitieron obtener emulsiones estables en el período ensayado.

Los resultados comentados destacan la importancia que ejercen el agente estabilizante y el aceite sobre el desarrollo de la levadura y sobre las características de la emulsión. La validación externa mostró una buena performance dado que describió adecuadamente los datos experimentales. Sin embargo, es necesario continuar con el proceso de validación para verificar la exactitud del modelo en todo el campo de estudio.

BIBLIOGRAFIA

- Antwi M, Geeraerd AH, Vereecken KM, Jenné R, Bernaerts K y Van Impe JF. 2006. Influence of a gel microstructure as modified by gelatine concentration on *Listeria innocua* growth. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7: 124-131.
- Brocklehurst TF y Wilson PDG. 2000. The role of lipids in controlling microbial growth. *Grasas y Aceites*, 51: 66-73.
- Buelvas Salgado GA. 2013. Desarrollo y validación de modelos matemáticos predictivos del crecimiento microbiano para estimación de la vida útil en Jamón lonchado empacado al vacío. Tesis Magister, Universidad Nacional de Colombia.
- Castro M, Garro O, Gerschenson LN y Campos CA. 2003. Interaction between potassium sorbate, oil and tween 20: Its effect on the growth and inhibition of *Z. bailii* in model salad dressings. *Journal of Food Safety*, 23: 47-59.
- Cayré ME, Vignolo G, Garro OA. 2001. Validación y comparación de modelos de crecimiento microbiano. Rev. Facultad de Agroindustrias UNNE - Cerela Conicet. 55(4): 98-104.
- Hracek VM, Schelegueda LI, Gliemmo MF y Campos CA. 2009. Efecto la presencia de sorbato de potasio y de extracto de esteviósidos sobre el desarrollo de *Zygosaccharomyces bailii*. Libro de resúmenes del XII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos-CYTAL, Entre Ríos, Argentina.
- Kurtzman CP, Rogers PR y Hesseltine CW. 1971. Microbiological spoilage of mayonnaise and salad dressings. *Applied of Microbiology and Biotechnology*. 21: 870-874.

Thomas DS y Davenport RR. 1985. *Zygosaccharomyces bailii*- a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiology*, 2: 157-169.

Smittle RB. 1977. Microbiology of mayonnaise and salad dressing. *Journal of Food Protection*. 40: 415-421.

Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM y K van't Riet. 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6): 1875-1881.

Wilson, PDG, Brpcklehurst, TF, Arino, S, Thualt, D, Jakobsen, M, Lange, M, Farkas, J, Wimpenny, JWT y Van Impe, JF. 2002. Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International J of Food Microbiology*. 73, 275-289.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico de la Universidad de Buenos Aires y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.