Ministerio de CIENCIA Y TECNOLOGÍA

ENTRE TODOS | GOBIERNO DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA | VAMOS MÁS ALTO

VI Congreso Internacional
CIENCIA Y TECNOLOGÍA
de los ALIMENTOS 2016
CÓRDOBA - ARGENTINA
— Año Internacional de las Legumbres —

EL ESTADO DEL ARTE DE LA BIOTECNOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA EN LOS ALIMENTOS

El estado del arte de la biotecnología y microbiología en los alimentos :
trabajos completos : VI Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos / Verónica Nolan ... [et al.] ; compilado por Alberto Edel León ; editado por Victoria Rosati ; Carlos Walter Robledo. - 1a ed compendiada.
- Córdoba : Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba, 2017.
Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-987-45380-3-1

1. Biotecnología. 2. Microbiología. 3. Alimentos. I. Nolan, Verónica II. León, Alberto Edel , comp. III. Rosati, Victoria , ed. IV. Robledo, Carlos Walter, ed.
CDD 660.6

Área Biotecnología:
Dra Verónica Nolan (IIBYT, UNC-CONICET; ICTA, FCEFyN-UNC, Córdoba, Argentina)
Dra Ma Angélica Perillo (IIBYT, UNC-CONICET; ICTA, FCEFyN-UNC, Córdoba, Argentina)
Dra Julieta Sánchez (IIBYT, UNC-CONICET; ICTA, FCEFyN-UNC, Córdoba, Argentina)

Área Microbiología
Dr. Abel López (ICTA, FCEFyN-UNC, Córdoba, Argentina)
Dr. Emiliano Salvucci (ICYTAC, UNC-CONICET, Córdoba, Argentina)

PRÓLOGO

La sociedad y la agricultura han evolucionado en forma conjunta durante los últimos 14.000 años, este consorcio ha permitido la domesticación y mejora de especies animales y vegetales destinadas a la alimentación humana. Dicha manipulación condujo a la selección exitosa de cereales como el trigo y el mijo de las grandes gramíneas sembradas en Eurasia y del maíz de su antepasado en Mesoamérica. Esta maniobra que también alcanzó a algunos animales, representan los primeros ejemplos de mejora y selección aplicada a la producción de alimentos. Por otro lado, el uso de los microorganismos en la producción de queso, bebidas fermentadas, alimentos encurtidos y la elaboración de pan leudado fueron también las primeras aplicaciones de la biotecnología a los alimentos. Si entendemos a la biotecnología como el conjunto de técnicas o procesos que emplean organismos o sustancias que provienen de ellos para producir o modificar un alimento, mejorar las plantas o animales de los que provienen los alimentos, o desarrollar microorganismos que intervengan en los procesos de elaboración de los mismos, podemos inferir la estrecha relación que existe entre la microbiología y la biotecnología. Aunque no hay datos escritos, los distintos hallazgos relacionados a la preparación y consumo de alimentos de las civilizaciones más antiguas, nos indicarían que la inocuidad de los productos agropecuarios y biotecnológicos fue establecida por prueba y error. Si bien estas prácticas no contaban con el fundamento científico en el sentido estricto, estaba disponible el conocimiento para poder repetir y elaborar los productos deseados, con una calidad aceptable para la época. Este proceso, que ha estado en constante evolución presenta en la actualidad algunas de las principales incógnitas de los consumidores sobre alimentos, microbiología y biotecnología. La incertidumbre que genera en la población las cuestiones relacionadas a los avances tecnológicos va acompañada de estudios científicos tendientes a reemplazar procesos o aditivos que permitan reducir riesgos en la salud y asegurar la calidad e inocuidad del producto. Actualmente, se busca obtener alimentos más naturales, mínimamente procesados y con el menor agregado de productos químicos de síntesis. En ese sentido, las investigaciones actuales pretenden utilizar el potencial de microorganismos y nuevos procesos para lograr saltos cualitativos en tecnología alimentaria.

Es por ello que los objetivos principales de las presentes disciplinas, tanto el uso de microorganismos como la aplicación de la biotecnología, no solo busca mejorar las características físicas, químicas y nutricionales de los alimentos sino también las propiedades organolépticas o generar productos particulares como alimentos funcionales, nutracéuticos, pre o probióticos, entre otros. Por todo lo mencionado anteriormente, en la presente edición del Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Córdoba, se presentan distintas investigaciones y hallazgos que están orientados a la aplicación de procesos físicos, la utilización de microorganismos y productos derivados de sus metabolismos para mejorar las características organolépticas, la seguridad e inocuidad de los alimentos y otorgar, en definitiva, mayor valor integral al producto alimenticio. Esperamos que la capacidad de elección de los consumidores, el uso de los microorganismos y las herramientas biotecnológicas permitan introducir mejoras significativas para el beneficio de todos.

Los editores

Caracterización de nanopartículas amiláceas conteniendo sorbato de potasio obtenidas mediante la técnica de diálisis

Alzate PC (1,2), Gerschenson L (1,3), Flores SK (1,3)

(1) Departamento de Industrias, FCEN-UBA, Intendente Güiraldes 2160, CABA, Buenos Aires, Argentina.
(2) Becario del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET.
(3) Miembro de la Carrera de Investigador del CONICET.
Dirección de e-mail: sflores@di.fcen.uba.ar

RESUMEN
Actualmente el almidón está siendo estudiado como materia prima para obtener matrices micro/nano estructuradas de aplicación en tecnología de alimentos. Los objetivos del presente trabajo fueron obtener y caracterizar nanopartículas de almidón de mandioca nativo y acetilado adicionadas con sorbato de potasio (KS). Para la obtención de las partículas se aplicó la técnica de diálisis y se utilizaron dos soluciones de almidón (0,33 y 33,3 mg/ml) nativo o acetilado. La caracterización se realizó mediante la determinación del radio hidrodinámico, potencial zeta; contenido de KS y estructura. De acuerdo a los resultados, la fracción másica de nanopartículas fue mayor en los sistemas diluidos y el rango de tamaños estuvo entre 35 y 723 nm, siendo los sistemas acetilados los de mayor dimensión. El potencial zeta fue negativo y mayor (en módulo) para el sistema con almidón nativo de menor concentración. En cuanto al contenido del preservador, los sistemas diluidos retuvieron un mayor contenido de KS. El análisis de la estructura mostró partículas esféricas o irregulares. Se concluyó que, a través de la técnica de diálisis, fue posible obtener partículas de almidón nativo y acetilado de tamaño nanométrico, de potencial zeta negativo y con capacidad para retener KS.

Palabras Clave: almidón de mandioca, nanopartículas, sorbato de potasio, diálisis.

ABSTRACT
Nowadays starch is being studied as raw material to obtain micro/nano structured matrices to be used in food technology. The aim of this work was obtaining and characterizing tapioca starch (native and modified) nanoparticles added with potassium sorbate (KS). To obtain the particles, the dialysis technique was used and two native or acetylated starch solutions (0.33 and 33.3 mg/ml) were analyzed. The particles characterization was performed determining the hydrodinamic ratio, zeta potential, KS content and structure. Results showed that weight fraction of nanometric particles were higher in diluted systems than in concentrated one. The size range was between 35 and 723 nm and the hydrodynamic radius of acetylated systems was higher than those of native starch. The zeta potential observed was negative for all systems and the highest module was observed for diluted native starch system. Regarding the preservative, it was observed that, less concentrated systems had a higher KS content. Structure analysis showed that particles had spherical or irregular shapes. It was concluded that through dialysis technique, it was possible to obtain native and acetylated starch particles with nanometric size, negative zeta potential and capability to retain KS.

Key Words: Dialysis, tapioca starch, nanoparticles, potassium sorbate.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la nanotecnología está siendo utilizada para diseñar sistemas basados en partículas con una variedad de propósitos. Las micropartículas y

nanopartículas están incrementando cada vez más su aplicación en la industria alimentaria debido a sus propiedades fisicoquímicas y sus atributos funcionales particulares. En el área de tecnología de alimentos, se han reportado trabajos en los cuales la nanotecnología fue aplicada para encapsular y liberar controladamente ingredientes activos, imitar la funcionalidad de gotas de lípidos, incrementar la percepción del gusto salado, modificar la reología y alterar las propiedades ópticas(Baldino et al. 2016). Tambiénse ha propuesto la aplicación de nanopartículas en el desarrollo de empaquetamientos activos para alimentos, siendo éste uno de los retos más interesantes en tecnología de alimentos (Siripatrawan y Vitchayakitti 2016).

La dimensión crítica que distingue las micropartículas de las nanopartículas se encuentra todavía en debate. Algunos autores han propuesto un rango de 10-1000 nm (Namazi et al. 2011), mientras otros indican un diámetro de 100 nm como el límite de tamaño máximo para las nanopartículas ya que por encima de dicho valor, las propiedades de las partículas de mayor tamaño, difieren drásticamentede las propiedades de las partículas de dimensiones nanométricas. Sin embargo, esto es altamente dependiente del tipo de material y no se puede aplicar universalmente (Joye y Mc Clements 2014).

El diseño de nanopartículas ha sido recientemente impulsado por medio de la aplicación de técnicas como la diálisis(Chronopoulou et al. 2009). En esta metodología,una solución de unbiopolímero es colocado en el interior de una bolsa de diálisis con un tamaño de poro apropiado. La diálisis se realiza contra un no-solvente miscible con el solvente utilizado para disolver el biopolímero (Prasad Raoa y Geckeler 2011). El desplazamiento del solvente en el interior de la membrana es seguido por una agregación progresiva del polímero debido a la pérdida de solubilidad y la formación de suspensiones homogéneas de nanopartículas, en general de geometría esférica. Este método tiene muchas ventajascomopor ejemplo, que la distribución de tamaño de las nanopartículas puede ser controlada dentro de un rango estrecho y el solvente puede ser completamente removido (Gu et al. 2015).

Las nanopartículas de grado alimenticio pueden ser fabricadas a partir de una gama de diferentes ingredientes que incluyen polisacáridos, proteínas, lípidos, surfactantes y minerales (Joye y Mc Clements 2014).

El almidón es un biopolímero completamente biodegradable, el cual se encuentra disponible a partir de distintas fuentes renovables de bajo costo. Por estas razones se ha incrementado el interés en el uso del almidón para aplicaciones en diferentes desarrollos como la producción de micro/nanopartículas, películas comestibles, envases activos, etc. A pesar de su potencial, el uso del almidón en la industria alimenticia tiene limitaciones debido a su fragilidad, envejecimiento e hidrofilicidad. Por ello, se han llevado a cabo estudios sobre la modificación química del almidón para mejorar las propiedades del biopolímero (Teodoro et al. 2015). El almidón acetilado es un almidón granular esterificado con el grupo CH_3CO. Los almidones acetilados con un grado de sustitución bajo han sido ampliamente usados en la industria de alimentos durante años debido a sus características únicas, tales como baja temperatura de gelatinización, alta solubilidad e hinchamiento, buena cocción y estabilidad en el almacenamiento(Alzate 2016, Mbougueng 2012).

El ácido sórbico y sus sales más solubles en agua son ampliamente usadas como preservadores en productos alimenticios, tales como quesos y bebidas. Una buena solubilidad, estabilidad y facilidad para su fabricación, hacen del KS la forma más usada en sistemas alimenticios (Choia et al, 2005). Estas sales inhiben o retrasan el crecimiento de hongos, levaduras y algunas bacteriascomo *Staphylococcus aureus, Clostridium botulinum, Salmonellaey Pseudomonas* (Baldino et al. 2016); con concentraciones efectivas en el rango de 0.05 – 0.3 g/100 ml.Tradicionalmente, los agentes antimicrobianos son agregados y mezclados directamente con la formulación del alimento; pero es difícil controlar la funcionalidad del agente, debido a las reacciones con los componentes del alimento (Baldino et al. 2016). Esto disminuye la efectividad de los aditivos y por lo tanto la inocuidad de los alimentos. En el caso del KS, su actividad está regulada por el tipo de alimento, su formulación, las condiciones de procesamiento yalmacenamiento, y el nivel del conservante (Sofos 2000). Es sabidoque el KS es propenso a la oxidación en soluciones acuosas. Esta reacción esacompañada por un aumento en la concentración de compuestoscarbonílicos que polimeriza rápidamente a los pigmentos marrones

(Arya yThakur 1988). La degradación oxidativa y el desarrollo de pardeamientodepende del pH, la actividad de agua, la presencia de otros aditivos (nitritos y sulfitos) ylas condiciones de almacenamiento y procesamiento (Campos y Gerschenson 1996, Gerschenson y Campos 1995). Por otra parte, si la degradación del sorbato se produce en una medida importante, resultando en un nivel residual menor a la cantidad necesaria para controlar el crecimiento microbiano, la estabilidad del producto podría verse afectada (Hracek et al. 2010).Una alternativa puede ser el uso de partículas cargadas con antimicrobianos y/o preservadores.Es en este contexto que la compartimentalización de las sustancias potencialmente interactuantesconstituye una estrategia prometedora para minimizar o anular estas interacciones. Hasta el momento, no se encuentra información suficiente con respecto a la obtención y comportamiento de estas partículas cuando actúan como soporte de agentes antimicrobianos.

El objetivo del presente trabajo fue obtener y caracterizar nanopartículas elaboradas a partir de almidón de mandioca nativo y modificado, mediante la técnica de diálisis, capaces de retener en su estructura el preservador KS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las soluciones amiláceas conteniendo KS

Se prepararon en total cuatro soluciones a partir de almidón de mandioca nativo o modificado con el fin de evaluar dos concentraciones para cada tipo de almidón (**Tabla 1**). En primer lugar, se disolvió el almidón en un volumen conocido del solvente dimetilsulfóxido (DMSO) durante toda la noche, con agitación y a temperatura ambiente. Por otro lado, se preparó una disolución de KS en un volumen conocido de agua ultrapura (milli-Q). Posteriormente, se integraron ambas soluciones con agitación y se procedió a desarrollar la técnica de diálisis.

Tabla 1. Composición y nomenclatura de los sistemas ensayados

Sistema	Tipo de Almidón de Mandioca	Concentración Almidón (mg/ml)	Concentración KS (mg/ml)
N1	Nativo	0.33	3.75
A1	Acetilado	0.33	3.75
N2	Nativo	33.3	3.75
A2	Acetilado	33.3	3.75

Obtención de nanopartículas mediante la técnica de diálisis

Una vez obtenida la solución de almidón de mandioca y KS en DMSO; se vertió en una bolsa de diálisis de acetato de celulosa de tamaño de poro 12000 Dalton (Modelo Spectra/Por 4 Dyalisis Membrane. Spectrum Labs, Rancho Domíngez, California). El sellado del extremo de la bolsa se realizó mediante nudos en cada extremo y ajuste con broches. La diálisis se realizó contra agua ultrapura (milli-Q), efectuando cambios periódicos de agua cada 3 h durante las primeras 6 h. Posteriormente, se realizaron cambios cada 12 horas por un periodo total de 48 horas. Después del tiempo previsto de diálisis, la bolsa se abrió y una alícuota del contenido se separó para los análisis posteriores.

La fracción en masa de nanopartículas se evaluó como la relación entre la masa seca de una alícuota del precipitado que fue previamente filtrada a través de un filtro de 0,45 □m de poro y la masa seca de una alícuota equivalente del precipitado total.

Medición del tamaño de partícula y potencial Z de las partículas

Las determinaciones del radio hidrodinámico y el potencial zeta de las partículas, se realizaron en un equipo de dispersión dinámica de luz (Nano ZS ZetaSizer - Modelo ZEN 3500, Reino Unido) equipado con un láser de He-Ne (633 nm). Las

mediciones se realizaron con un ángulo de dispersión fijo de 173°. Para las muestras con una mayor concentración de almidón (tanto nativo como modificado) fue necesario preparar soluciones al 1% (v/v) yadicionalmente, filtrar las muestras a través de un filtro de 0,45 □m de tamaño de poro para alcanzar un índice de polidispersión (IP) adecuado (IP<0,4). Las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado.

Dosaje de sorbato de potasio (KS)

La cuantificación del preservador se realizó, usando la técnica colorimétrica recomendada por la AOAC (1990) sobre las muestras deshidratadas, realizando primero una destilación por arrastre convapor y posteriormente la oxidación del KS a malonhaldehido para finalmente cuantificar el pigmento rojo formado por medio de un espectrofotómetro (Shimadzu Modelo UV-1800, Japón) a una longitud de onda de 532 nm. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Observación de la estructura de las partículas amiláceas conteniendo KS

La estructura de las partículas de almidón adicionadas con KS se caracterizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las soluciones obtenidas luego de las diálisis fueron dispensadas en pequeños volúmenes sobre soportes y vidrio, se evaporó el solvente a temperatura ambiente y posteriormente se almacenaron en un desecador conteniendo $CaCl_2$.Las muestras fueron montadas en el portamuestra del equipo con la ayuda de cinta adhesiva doble faz y metalizadas por bombardeo iónico con una capa de oro (Cressington Scientific Instruments 108 Sputter, UKA). Las micrografías se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de barrido (Zeiss Supra 40, Alemania) operado a un voltaje de aceleración de 3 kV.

Análisis Estadístico

La existencia de diferencias significativas entre los distintos sistemas se establecieron mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor con un nivel de significación de 95% (p<0,05) y aplicando un test *a posteriori* (LSD). Los resultados son informados en base a su promedio y desvío estándar. El programa Statgraphics Centurion XV para Windows, versión 15.2.06, fue utilizado para el tratamiento y análisis de los datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez finalizada la diálisis y a partir de las muestras diluidas N1 y A1, se obtuvieron sistemas coloidales mientras que a partir de las soluciones concentradas N2 y A2 se obtuvieron precipitados. Los porcentajes en masa correspondientes a las partículas de dimensiones nanométricas fueron para N1 y A1 (88±10)% y (14±6)%, mientras que para N2 y A2 fueron de (30±7)% y (5±2)% respectivamente. Puede observarse que los sistemas preparados a partir de 0,33 mg de almidón nativo o acetilado por ml de DMSO generaron una cantidad mayor de nanopartículas en comparación con los sistemas concentrados, probablemente debido a una mayor tendencia a la agregación de las muestras N2 y A2 (33.3 mg/ml). Ha sido reportado que tanto la morfología como el tamaño de las partículas obtenidas por la técnica de diálisis, están moduladas por factores cinéticos y termodinámicos, obteniéndose dimensiones desde los nanómetros a micrómetros dependiendo de las condiciones experimentales (Chronopoulou et al, 2009; Liu et al. 2016).Por otro lado, los almidones nativos presentaron un mayor rendimiento en cuanto a la obtención de nanopartículas.

Tamaño de partícula y potencial Zeta

Las **Figuras 1 y 2**, muestran los resultados obtenidos para el tamaño de partícula de los sistemas amiláceos cargados con KS. En general, se observó que los sistemas N1 y A1 correspondientes a la menor concentración de almidón nativo y acetilado presentaron un perfil monomodal, con un tamaño promediode 323±15 nm y 723±82 nm respectivamente, mostrando diferencias significativas entre ambos (p<0,05). En el caso de A1, se observó un grupo de partículas alrededor de los 27±8 pero en una proporción muy baja (% volumen <10%). A su vez, el sistema más concentrado N2 mostró una distribución bimodal de diámetros promedio de 334±23 nm y 35±9 nm, mientras que el sistema A2 registró un tamaño de 653±66 nm, siendo este último valor significativamente más grande que el correspondiente

a N2 ($p<0,05$). De acuerdo a estos resultados, se puede concluir que el tipo de almidón afectó el tamaño de la partícula resultante ya que los sistemas elaborados a partir de almidón modificado (A1 y A2) tendieron a formar partículas de mayor tamaño que los nativos (N1 y N2). Esto puede deberse a que el proceso de modificación del almidón (acetilación) introduce nuevos grupos funcionales que conllevan a un mayor tamaño de los aglomerados(Manni y Santiago 2008). En cuanto al efecto de la concentración de las soluciones de partida, los resultados obtenidos para ambos tipos de almidón, mostraron poblaciones de tamaño similar ($p>0,05$) (N2 vs N1 y A2 vs A1). En el caso de N2, se observó un segundo grupo de menor tamaño. Estos resultados están en línea con los obtenidos por Chakraborty et al. (2005), quienes obtuvieron nanopartículas a partir de almidón de maíz utilizando la técnica de diálisis e informaron la presencia de dos picos alrededor de 40 y 300 nm en el análisis por DLS, atribuyendo la presencia de partículas de mayor tamaño al fenómeno de agregación.

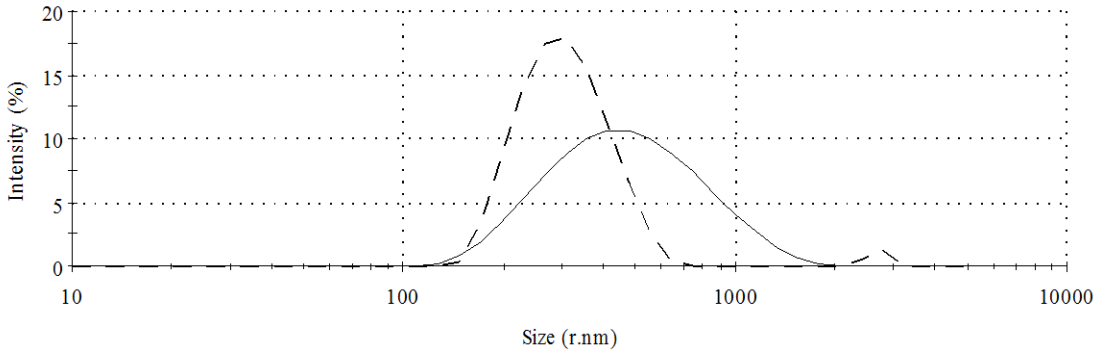


Figura 1. Distribución de tamaño de las partículas amiláceas sistemas N1 (línea punteada) y A1 (línea sólida).

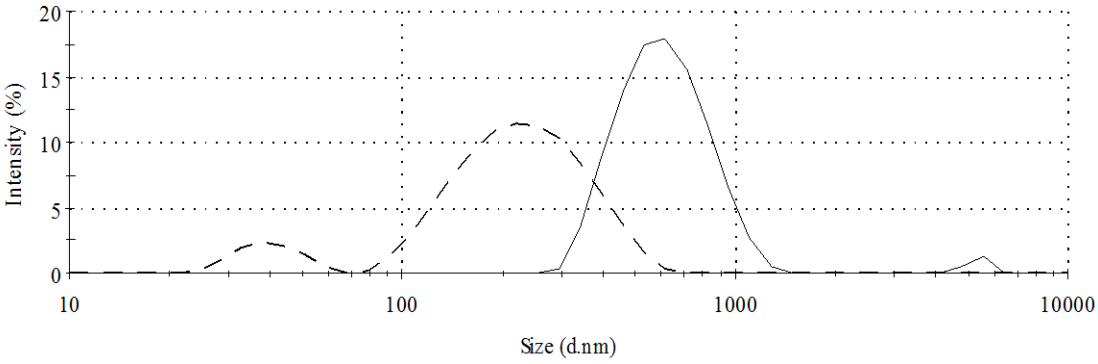


Figura 2. Distribución de tamaño de las partículas amiláceas sistemas N2 (línea punteada) y A2 (línea sólida).

La **Tabla 2** resume los resultados obtenidos para el potencial zeta. Se observó que todos los sistemas evaluados presentan potencial negativo y que N1 mostró el mayor valor (en módulo). Esto indica que los sistemas nativos en baja concentración permitirían obtener partículas con menor tendencia a la agregación debido al alto potencial que provoca la repulsión entre estas partículas. Estos resultados están en concordancia con el alto porcentaje en peso de nanopartículas obtenido para N1 en comparación con el resto de los sistemas los cuales presentaron un contenido menor como se indicó previamente.

Tabla 2. Potencial zeta de las partículas amiláceas conteniendo KS.

Sistema	Potencial Zeta (mV)
N1	-31±3[a]
N2	-3,8±0,6[b]
A1	-9,4±0,6[c]
A2	-5,8±0,5[d]

Letras distintas indican diferencias significativas entre los sistemas (p < 0,05).

Contenido de sorbato de potasio

En la **Tabla 3** se pueden observar los resultados dela determinación de KS (ppm). De manera general se observa que los sistemas con menor concentración de almidón (N1 y A1) retuvieron similar cantidad KS (≈7100 ppm). Sin embargo, para los sistemas concentrados N2 y A2la cantidad de preservador soportada fue significativamente menor que la retenida por N1 y A1. Por lo tanto, la concentración de almidón (nativo o modificado) en cada solución inicial, influyó notoriamente en la cantidad de KS soportado en las nanopartículas. A una menor concentración de almidón, el preservador pudo ser retenido más eficazmente que en los sistemas con mayor contenido del biopolímero. Probablemente,en los sistemas concentrados, los sitios disponibles para la interacción con el KS, estarían comprometidos en interacciones entre moléculas de almidón. Los valores obtenidos en el presente trabajo son similares a los reportadosrecientemente por Alzate et al. 2016, quienes informaron que partículas amiláceas preparados por diálisis utilizando una concentración similar a N2 y A2 retuvieron una concentración de 1372±116 ppm y 2070±450 ppmde KS respectivamente (p<0.05).

Tabla 3. Resultados del contenido de KS

Sistema Almidón	Contenido KS (ppm)
N1	7292± 574[a]
N2	1321 ± 106[b]
A1	6915 ± 1087[a]
A2	2564 ± 385[b]

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa entre los sistemas (p < 0,05).

Observación de la estructura de las partículas amiláceas con KS

En la **Figura 3** se observan las micrografías de las partículas cargadas con KS para los cuatro sistemas evaluados. Para todos los sistemas de almidón de mandioca nativo y modificado se evidenció que luego de la disolución en DMSO y posterior diálisis contra agua ultrapura, la estructura granular se destruyó completamente, observándose partículas esféricas o irregulares de tamaño de hasta 800 nm.En cuanto al tamaño de las partículas, se pudo observar que las obtenidas a partir de almidón nativo fueron de menor tamaño que las acetiladas y esto se corrobora con los tamaños obtenidos mediante dispersión dinámica de luz **(Figuras 1 y 2)**. Namazi et al. (2011), también reportaron cambios radicales en la estructura y tamaño de gránulos de almidón de papa esterificado con derivados de ácidos grasos de cadena larga y sometidos a la técnica de diálisis para la obtención de nanopartículas de entre 500 y 800 nm.

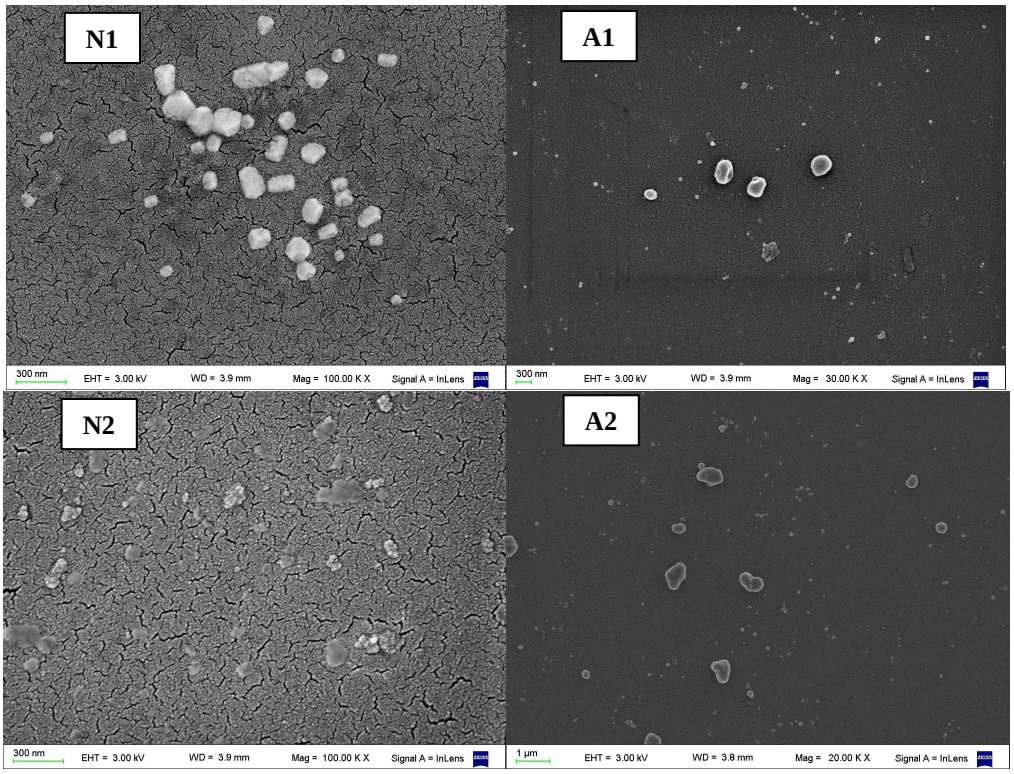


Figura 3. Micrografías SEMde los sistemas amiláceos cargados con KS. N1 (almidón nativo de mandioca en menor concentración), N2 (almidón nativo de mandioca en mayor concentración); A1 (almidón acetilado de mandioca en menor concentración) y A2 (almidón acetilado de mandioca en mayor concentración).

CONCLUSIONES

Por medio de la técnica de diálisis fue posible obtener partículas amiláceas de tamaño nanométrico cargadas con el preservador KS.

Las nanopartículas obtenidas a partir de soluciones de almidón nativo diluido o concentrado presentaron tamaños entre 35 y 334 nm mientras que a partir de almidón modificado las dimensiones fueron de 653 a 723 nm. Las partículas obtenidas presentaron geometría esférica o irregular.

El potencial zeta de todas las nanopartículas obtenidas fue negativo y el sistema elaborado con almidón nativo a menor concentración, tuvo el mayor valor en módulo mostrando menor tendencia a la agregación.

La fracción nanométrica de los sistemas diluidos de almidón nativo y acetilado (A1 y N1) mostró una mayor retención del preservador respecto a la de los sistemas concentrados (A2 y N2).

Las partículas desarrolladas podrían ser usadas para su incorporación en sistemas alimenticios líquidos o semi-sólidos con el fin de introducir un sistema de liberación controlada del preservador y de esta manera extender la vida útil de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

Atichokudomchai N, Varavinit S. 2003. Characterization and utilization of acid-modified cross-linked Tapioca starch in pharmaceutical tablets. Carbohydrate Polymers, 53: 263–270.

Arya SS, Thakur BR. 1988. Degradation products of sorbic acid in aqueous solutions. Food Chemistry, 29: 41−49.

Baldino L, Cardea S, Reverchon E. 2016. Production of antimicrobial membranes loaded with potassium sorbate using a supercritical phase separation process. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 34: 77–85.

Campos CA, Gerschenson LN. 1996. Effect of certain additives on sorbates stability. Food Research International, 29: 147−154.

Chakraborty S, Sahoo B, Teraoka I, Gross R. 2005. Solution properties of starch nanoparticles in water and DMSO as studied by dynamic light scattering. Carbohydrate Polymers, 60: 475–481.

Choia JH, Choia WY, Chaa DS, Chinnanb MJ, Parka HJ, Leed DS, Park JM. 2005. Diffusivity of potassium sorbate in k-carrageenan based antimicrobial film. LWT, 38: 417–423.

Chronopoulou L, Fratoddi I, Palocci C, Venditti I, V. Russo M. 2009. Osmosis Based Method Drives the Self-Assembly of Polymeric Chains into Micro- and Nanostructures. Langmuir, 25(19): 11940–11946.

Gerschenson LN. Campos CA. 1995. Sorbic acid stability during processing and storage of high moisture foods. En G. Barbosa Cánovas, J. Welti Chanes (Eds.). Food preservation by moisture control. Fundamentals and applications. Lancaster, Pa: Technomic Publishing Co. pp. 761−790

Gu F, Li BZ, Xiaa H, Adhikari B, Gao Q. 2015. Preparation of starch nanospheres through hydrophobic modification followed by initial water dialysis. Carbohydrate Polymers, 115: 605–612.

Hracek VM, Gliemmo MF, Campos CA. Effect of steviosides and system composition on stability and antimicrobial action of sorbates in acidified model aqueous systems. Food Research International 43 (2010) 2171–2175.

Joye IJ, McClements DJ. 2014. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 19: 417–427.

Kuplennik N, Tchoudakov R, Ben-Barak Zelas Z, Sadovski A, Fishman A, Narkis M. 2015. Antimicrobial packaging based on linear low-density polyethylene compounded with potassium sorbate. LWT – Food Science Technology, 62: 278 –286.

Liu C, Qin Y, Li X, Sun Q, Xiong L, Liu Z. 2016. Preparation and characterization of starch nanoparticles via self-assembly at moderate temperature. International Journal of Biological Macromolecules, 84: 354–360.

Manni D, Santiago L. 2008. Desarrollo de biomateriales a partir de almidón de amaranto modificado. Segundo encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales – Posadas, Misiones. Asociacion argentina de materiales.

Mbougueng PD, Tenin D, Scher J, Tchiégang C. 2012.Influence of acetylation on physicochemical, functional and thermal properties of potato and cassava starches. Journal of food engineering, 108: 320-326.

Namazi H, Fathi F, Dadkhah A. 2011. Hydrophobically modified starch using long-chain fatty acids for preparation of nano sized starch particles. Scientia Iranica C, 18(3): 439–445.

Prasad Raoa J, Geckeler KE. 2011. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. Progress in Polymer Science, 36: 887–913.

Siripatrawan U, Vitchayakitti W. 2016. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. Food Hydrocolloids, 61: 695 – 702.

Sofos, J. N. 2000. Sorbic acid. In A. S. Naidú (Ed.), Natural Food Antimicrobial Systems. Chap. 23. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Teodoro AP, Mali S, Romero N, De Carvalh GM. 2015. Cassava Starch films containing acetylated starch nanoparticles as reinforcement: Physical and mechanical characterization. Carbohydrate Polymers, 126: 9 –16.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento de las siguientes instituciones: UBA (UBACYT 2011-2014/726, 2014-2017/550BA), CONICET (PIP 2010-2012/531, 2013-2015/507) yAgencia Nacional de promoción Científica y Tecnológica de Argentina (PICT 2008-2131, PICT-2012-0183).

Emulsiones con nanocarriers de clara de huevo con ácido fólico: caracterización y comportamiento durante la digestión gastrointestinal *in vitro*

Arzeni C. (1), Pilosof A. M. R. (1)

(1) CONICET – Departamento de Industrias, FCEN, UBA, Argentina
Dirección de e-mail: carzeni@di.fcen.uba.ar

RESUMEN
La suplementación de alimentos con componentes bioactivos implica un desafío debido a la inestabilidad que presentan frente a factores físicos o químicos. A su vez, luego de suministrarlos, su liberación debe producirse en sitios específicos dentro del cuerpo humano. Para ello, mediante el empleo de nanopartículas se pueden encapsular o unir bioactivos y formar nanocarriers, los cuales proporcionan un medio de transporte adecuado para asegurar su integridad y liberación controlada. En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue evaluar los productos de la digestión *in vitro* de las emulsiones de aceite de chía (AC) con nanocarriers de clara de huevo (EW) con ácido fólico (AF) y comparar el efecto de la incorporación de AF en solución o en emulsión. Se comprobó que el AF permanece unido a los nanocarriers previo a la digestión gastrointestinal *in vitro* y se libera luego de este proceso, tanto en solución como en emulsión. La liberación del AF de los nanocarriers luego de la digestión gastrointestinal *in vitro* es un indicio de que el AF estaría bioaccesible en el sitio de absorción. Los nanocarriers constituirían un sistema adecuado para la preservación, transporte y "*delivery"* sitio dirigido de este bioactivo, tanto en sistemas acuosos como emulsionados.

Palabras Clave: clara de huevo, ácido fólico, digestión, bioaccesibilidad

ABSTRACT
Food supplementation with bioactive compounds implies a challenge due to their instability to physical and chemical factors. Furthermore, after ingestion, the bioactive must be released in specific sites of the human body. For this purpose, with the aid of nanoparticles, bioactives can be encapsulated or bound to produce nanocarriers, which provide an adequate means of transport that ensures their integrity and controlled release. Therefore, the objective of this research was to evaluate the *in vitro* digestion products of chia oil (CO) emulsions with egg white (EW) nanocarriers for folic (FA) acid and to compare the effect of incorporating FA in solution or emulsion. Results proved that FA remained bound to nanocarriers before *in vitro* gastrointestinal digestion and after this process it was released, both in solution and emulsion. The release of FA after *in vitro* gastrointestinal digestion is an indication that FA would be bioaccessible in the site of absorption. The nanocarriers would constitute an adequate system for the preservation, transport and target delivery of this bioactive compound, both in aqueous or emulsified systems.

Keywords: egg white, folic acid, digestión, bioaccessibility

INTRODUCCIÓN

El creciente interés de los consumidores en ingerir alimentos con efectos fisiológicos benéficos o que puedan reducir enfermedades ha derivado en la necesidad de desarrollar productos funcionales que satisfagan estas expectativas. La efectividad de los alimentos funcionales para prevenir enfermedades depende de la preservación y la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos (Chen et al. 2006). Esto representa un gran desafío, dado que sólo una pequeña proporción de moléculas permanece disponible luego de la

administración oral, debido a un tiempo de residencia gástrico insuficiente, baja permeabilidad y/o solubilidad dentro del intestino, como así también por inestabilidad bajo condiciones encontradas en el procesamiento de los alimentos (temperatura, oxígeno, luz) o en el tracto gastrointestinal (pH, enzimas, presencia de otros nutrientes) los cuales limitan la actividad y los efectos benéficos potenciales de los compuestos bioactivos (Bell 2000). El empleo de nanopartículas permite encapsular o unir bioactivos y así formar nanocarriers, los cuales proporcionan un medio de transporte adecuado para asegurar la integridad y liberación controlada de aquellos compuestos. Las proteínas alimentarias son excelentes materiales para diseñar nanopartículas dada su extensa funcionalidad que permite agregarlas en distintos tipos de matrices alimentarias. Además, la mayoría se digiere fácilmente dentro del tracto gastrointestinal, lo cual es indispensable para asegurar la eventual liberación de los compuestos bioactivos luego de su ingestión (Joye y McClements 2014). La EW en polvo es un ingrediente proteico ampliamente utilizado en la industria de alimentos por sus excelentes propiedades gelificantes, emulsionantes y espumantes. La ovoalbúmina es su proteína mayoritaria; constituye cerca del 54% de total de proteínas que la componen (Li-Chan et al. 1995) y por ende, es la principal responsable de su funcionalidad. Mediante el control de las condiciones de sonicación es decir, temperatura y tiempo de procesamiento, como de las condiciones de pH, es posible controlar el tamaño de partícula de la clara de huevo (EW) para generar nanopartículas. Por otra parte, el ácido fólico (AF), una importante vitamina del grupo B, participa en procesos metabólicos tales como la biosíntesis de ADN y ARN e interconversiones de aminoácidos. Los mamíferos no pueden sintetizar folatos; por lo tanto, necesitan un aporte exógeno de esta vitamina (Iyer y Tomar 2009). Por otra parte, esta vitamina es sensible a factores químicos como el pH, o físicos como la exposición a la luz o al calor. Por lo tanto, su complejamiento con proteínas puede mejorar su estabilidad durante los procesos de elaboración de los alimentos en donde se lo incorpora o durante su pasaje por el tracto gastrointestinal. El aceite de semillas de chía (AC) es un aceite de origen vegetal con alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados omega-3. Aporta grandes beneficios en la protección de la salud cardiovascular en el control del nivel de colesterol en sangre, en procesos inflamatorios, desórdenes del sistema inmunológico y adicionalmente, posee efectos antioxidantes (Coates 2011). Para asegurar que la suplementación sea adecuada, es necesario verificar la integridad del bioactivo y su correcta liberación luego de la digestión. A su vez, resulta de interés evaluar la eficiencia de la suplementación en diferentes matrices alimentarias. En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue evaluar los productos de la digestión gastrointestinal *in vitro* de las emulsiones de AC con nanocarriers de EW con AF y comparar el efecto de la incorporación de AF en solución o en emulsión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de soluciones de EW y AF

Se utilizó EW (88,93 ± 1,18 % de proteína, base total) en polvo, donada por Ovoprot (Argentina). Se prepararon soluciones al 5% p/p con agua bidestilada, se centrifugaron a 12857 x g y 20ºC durante 1 h (Centrífuga 5804 R, Eppendorf, Hamburg, Germany). Se usó el sobrenadante para las determinaciones y se ajustó el pH a 3 con HCl 1 N. El AF (DSM Nutritional Products Argentina S.A., pureza: 99.5%, base seca) en polvo fue donado por Laboratorios Bagó S.A. (La Plata, Argentina). Se prepararon soluciones al 1% p/p diariamente y se cubrieron con papel aluminio para evitar la exposición a la luz. El pH fue ajustado a 7 con NaOH 1N (para las mezclas) o a 3 con HCl 1N (control).

Diseño de nanopartículas de EW

Se termosonicaron 5 ml de solución de EW durante 20 min a 85ºC en un procesador ultrasónico Vibra Cell Sonics, modelo VCX 750 (potencia neta máx.: 750W) a una frecuencia de 20 kHz y una amplitud de 20% (amplitud máx. 40%, 228 µm) para generar las nanopartículas de EW (TS).

Generación de nanocarriers de EW para AF

Se agregaron 100 µl de solución de AF (pH 7) a 4 ml de solución de nanopartículas, con agitación continua durante 5 min, de manera de promover su unión y generar los nanocarriers de AF (TSF). Las mezclas se cubrieron con papel aluminio y se prepararon diariamente para cada experimento.

Formación de las emulsiones

Se emulsificó AC comercial con una solución de nanopartículas de EW (AC:TS) o de nanocarriers de EW con AF (AC:TSF) en una relación 10:90, utilizando un procesador ultrasónico Vibra Cell Sonics, modelo VCX 750 (potencia neta máx.: 750W) a una frecuencia de 20 kHz y una amplitud de 20% (amplitud máx. 40%, 228 µm) durante 20 min con circulación de agua a 0,5ºC para disipar el calor generado durante el proceso.

Distribución de tamaño de gota

Se midió el tamaño de partícula de las muestras por dispersión estática de luz usando un analizador Mastersizer 2000 equipado con una unidad de dispersión Hydro 2000MU, de Malvern Instruments Ltd (Reino Unido). Se fijó la velocidad de la bomba a 1800 rpm. Se usó el índice de refracción de la fase dispersa (1,354) y su parámetro de absorción (0.001). Se informa el tamaño de gota como el diámetro medio en volumen-superficie o diámetro de Sauter ($D_{3,2} = \Sigma n_i d_i^3 / \Sigma n_i d_i^2$) y como el diámetro medio equivalente en volumen o diámetro De Broucker ($D_{4,3} = \Sigma n_i d_i^4 / \Sigma n_i d_i^3$) donde n_i es el número de partículas de diámetro d_i(Galazka et al. 1996; Gu et al. 2005; Güzey et al. 2004; Huang et al. 2001; Leroux et al. 2003).

Los tamaños informados son valores promedio de diez mediciones realizadas en cada muestra.

Microscopía óptica

Se tomaron imágenes de los nanocarriers y de las emulsiones formados según las Secciones 2.3 y 2.4 respectivamente, con un microscopio óptico Olympus Corp. modelo BX43 (Tokyo, Japón) equipado con una cámara digital (Q-Color 3C, Canadá). Se empleó el objetivo de 100X y las muestras se observaron directamente sin agregado de colorantes.

Digestión gastrointestinal in vitro

Se realizó según el método de Moreno et al. (2005) con algunas modificaciones. Se diluyeron 5 ml de muestra en 4 ml de una solución que simula el fluido gástrico (SGF, NaCl 0,15M, pH 2,5). Se ajustó el pH a 2,5 con HCl 1M. A continuación, se añadió una solución de pepsina (origen porcino, P7000) en una proporción de 182U de enzima por mg de proteína, L-α-fosfatidilcolina (yema de huevo, tipo XVI-E, P3556), disueltas cada una en 1 ml de SGF y se incubó a 37ºC por 2 h con agitación continua. Al finalizar esta etapa se ajustó el pH a 7,0 con NaHCO3 1M. Se agregaron 3 ml de una solución que simula el fluido intestinal (SIF, 39 mM K_2HPO_4, 150 mM NaCl y 30 mM $CaCl_2$, pH 7,0). Luego, se adicionaron 80 mg de sales biliares (páncreas bovino, B3883) y lipasa (páncreas porcino, L3126, tipo II) disueltas en 1 y 0,5 ml de SIF, respectivamente, tripsina (páncreas bovino, T8003) y α-quimotripsina (páncreas bovino, C4129) en una proporción de 34,5U y 0,44U de enzima por mg de proteína respectivamente, cada una disuelta en 0,5 ml de agua bidestilada. Las muestras se incubaron a 37ºC durante 2 h y al finalizar las enzimas se inactivaron en un baño de agua a 80ºC durante 5 min. Las soluciones finales fueron liofilizadas.

Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC)

Se rehidrataron el AF, los nanocarriers de AF (TSF) y sus hidrolizados correspondientes en agua bidestilada. Las emulsiones AC:TSF y sus hidrolizados fueron extraídas con hexano para eliminar la fase oleosa. Se filtraron todas las muestras por membrana de 0,45 µm y luego se analizaron en un cromatógrafo Waters 1525 (Waters, Milford, MA, USA) usando una columna BioSuiteTM pC18 500, 7 µm (150 × 4.6 mm, Waters, Milford, MA, USA), con un flujo de 1 ml/min, un volumen de inyección de 20 µl y la siguiente fase móvil: solvente A, 0,37 ml/l de TFA en agua bidestilada; solvente B, 0,27 ml/l de TFA en ACN grado HPLC. Se utilizó un gradiente lineal del solvente B en A, de 0 a 65% en 50 min. Se registró la absorbancia a 220 y 280 nm con un detector de arreglo de fotodiodos (Waters 2998, Milford, MA, USA). Se empleó el software Breeze Waters.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En un trabajo previo se desarrollaron nanocarriers de EW con AF y se demostró que la vitamina se unía a la nanopartícula y luego de la digestión se liberaba en el medio. Por lo tanto, este sistema resultó adecuado como nanocarrier de AF ya que la unión promovida podría protegerlo durante el procesamiento y su liberación sería efectiva en el sitio de absorción. En una etapa posterior, se prosiguió a evaluar si los mismos nanocarriers previamente desarrollados podrían ser emulsionados con un aceite rico en omega 3. Para ello, se realizó una emulsificación con AC y se determinó en primer lugar, si el AF presente afectaba el proceso de emulsificación. En la **Figura** 1 se muestra la distribución de tamaño de gota de emulsiones en relación 10:90 de AC con soluciones de nanopartículas de EW y de nanocarriers de AF. Ambas emulsiones presentaron una distribución monomodal, con partículas comprendidas entre 0,1 y 2 μm. No se observaron diferencias significativas entre las muestras, como se puede verificar por los valores de los diámetros promedio $D_{3,2}$ y $D_{4,3}$ (**Tabla 1**).

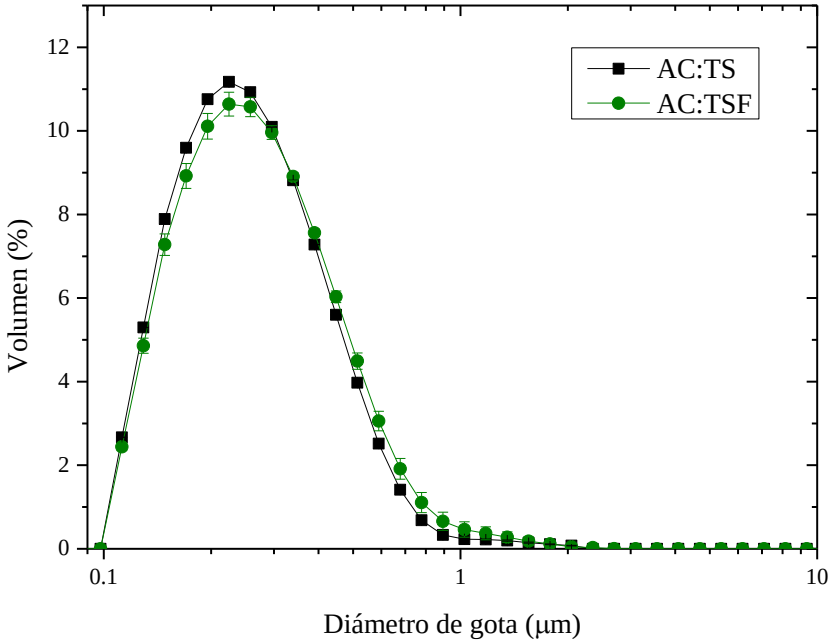


Figura 1. Distribución de tamaño de gota de emulsiones (10:90 O/W) de AC con nanopartículas de EW (AC:TS) y nanocarriers de AF (AC:TSF)

Tabla 1. Diámetros de gota promedio de emulsiones de AC con nanopartículas de EW (AC:TS) y nanocarriers de AF (AC:TSF)

	$D_{3,2}$	**$D_{4,3}$**
AC:TS	0,233 ± 0,000	0,292 ± 0,001
AC:TSF	0,241 ± 0,005	0,309 ± 0,014

En la **Figura 2** se muestran imágenes de microscopía óptica de ambas emulsiones. Tanto para la muestra sin AF (A) como para la que sí lo contiene (B) se observa una distribución de gotas levemente heterogénea, sin presencia de flóculos y no se distinguen diferencias significativas entre muestras. Dada la baja resolución de esta técnica para visualizar pequeños tamaños de gota no es posible observar la emulsión en su

totalidad sino que sólo se evidencian las gotas que tienen tamaños más grandes, aún si éstas no son las poblaciones mayoritarias. A su vez, no es posible comparar estos resultados con los obtenidos mediante dispersión estática de luz, ya que dicha técnica provee un diámetro ponderado en volumen mientras que por medio de la microscopía se obtienen diámetros ponderados en número. Además, existen otros efectos, como el aplastamiento que ocurre en la muestra al colocar el cubreobjetos y la imposibilidad de lograr una capa simple de gotas, que impiden obtener un resultado más preciso que refleje la condición real de la emulsión (Opedal et al. 2009). Por lo tanto, esta técnica sólo permite tener una apreciación general de la emulsión, de su heterogeneidad u homogeneidad y, especialmente, permite distinguir fenómenos como la floculación o coalescencia de las gotas. De los ensayos realizados, se concluye que la presencia de AF no altera la distribución de tamaño inicial de las emulsiones de AC y nanopartículas de EW.

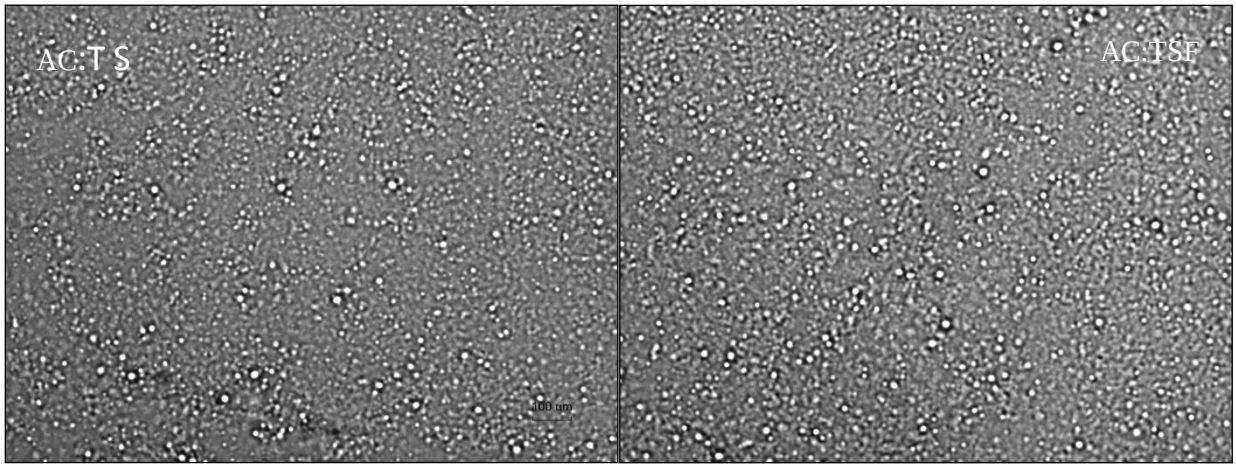


Figura 2. Imágenes de microscopía óptica de emulsiones (10:90 O/W) de AC con nanopartículas de EW (AC:TS) y nanocarriers de AF (AC:TSF)

A continuación las emulsiones se sometieron a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* y los productos de digestión (TSFd, AC:TSFd y AFd) fueron separados por RP-HPLC, así como también se separaron los controles sin digerir. En las **Figuras 3** y **4** se muestran los cromatogramas de las muestras antes y después del proceso de digestión respectivamente, a 220 nm, para visualizar las proteínas y los péptidos y a 280 nm, para una mejor apreciación del pico correspondiente al AF, evitando la interferencia de los péptidos que eluyen en la misma zona de tiempo.
La intensidad del pico correspondiente al AF fue menor en las muestras TSF, en comparación con el AF sólo, lo que puede visualizarse más fácilmente en la **Figura 3.A** a 280 nm. Esto indicaría una interacción entre el AF y las nanopartículas de EW que persiste en las condiciones cromatográficas empleadas y que impide que el AF pueda ser separado y detectado en la misma intensidad que en la muestra control. Otros autores han reportado la formación de complejos entre el AF y diferentes proteínas. Por ejemplo, Liang y Subirade (2002) encontraron por espectroscopía de fluorescencia que el AF podía unirse a la β-lactoglobulina y que el complejamiento reducía la fotodegradación del AF. En otro trabajo, Jha y Kishore (2011) encontraron, por titulación calorimétrica isotérmica en combinación con espectroscopía de fluorescencia y dicroísmo circular, que la albúmina de suero bovino se unía a AF y que dicha unión era dominada por interacciones electrostáticas con una contribución de uniones de puente hidrógeno e interacciones hidrofóbicas.

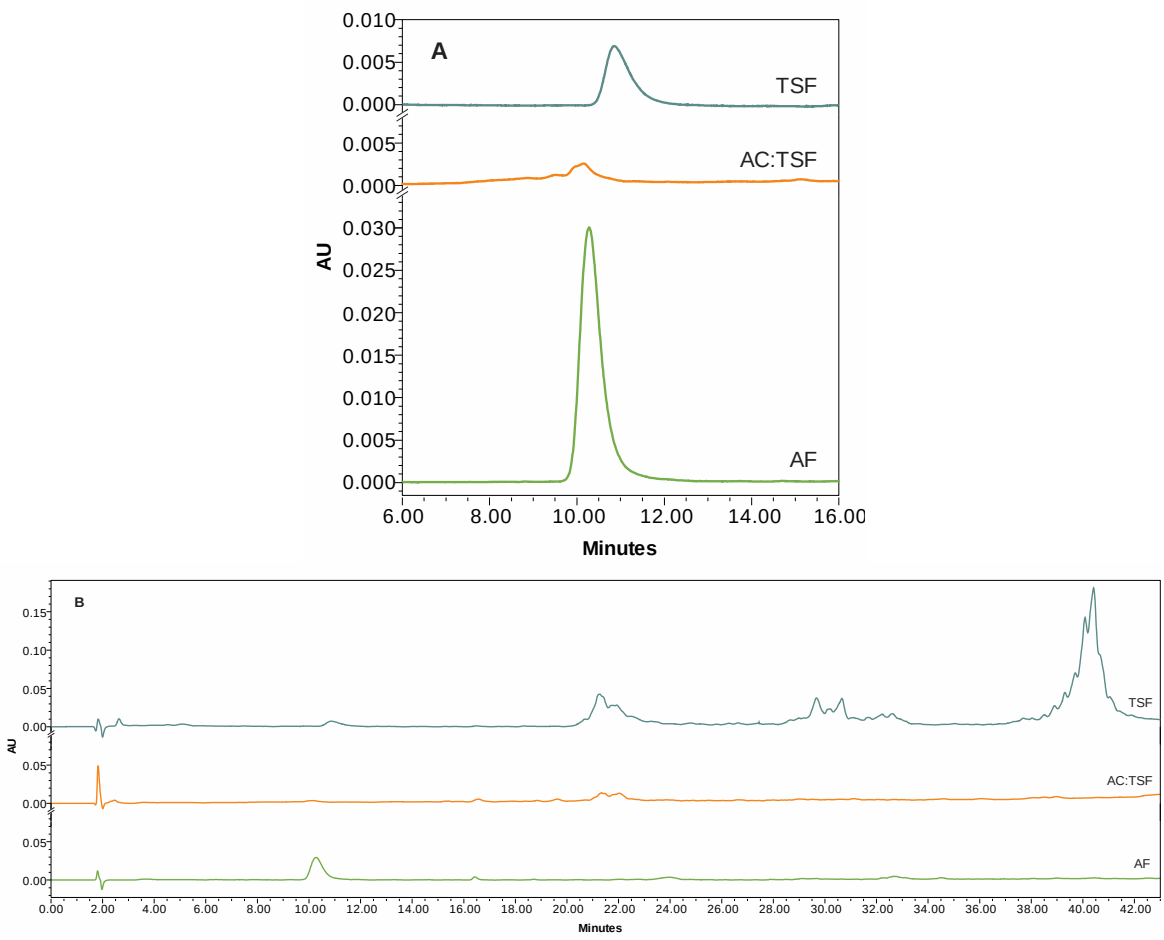


Figura 3. Cromatogramas de muestras TSF, AC:TSF y AF registrados a 280 (A) y a 220 nm (B)

Respecto a la muestra emulsionada, la intensidad del pico correspondiente a AF fue menor que cuando la vitamina se encuentra sola. Este resultado también evidencia que el AF interaccionaría en forma de complejo con las nanopartículas y eventualmente, con algún componente del aceite, de manera que no se produce su separación mediante HPLC. Al comparar esta muestra con los nanocarriers de AF se detectó que el pico correspondiente al AF tuvo una menor intensidad para la muestra emulsionada. Esta diferencia podría deberse a que, durante la extracción del aceite con hexano en las muestras sin digerir, se detectó que una porción de proteína se insolubilizaba y en este proceso el AF unido podría estar co-precipitando en el medio y en consecuencia, se detectaría una menor proporción en la corrida cromatográfica. En la **Figura 3.B** se muestran los cromatogramas de las muestras sin digerir a 220 nm, longitud de onda en la cual se visualizan mejor las proteínas. En las muestras TSF se identificaron los picos de las proteínas mayoritarias de la EW, ovoalbúmina (OVO), ovomucoide (OM) y lisozima (LZ). Sin embargo, en la muestra AC:TSF no se observaron estos picos con la misma intensidad y esto podría deberse a que cierta fracción de proteína resultó insoluble luego de la extracción del aceite realizada con hexano.

En la **Figura 4.A** se muestran los cromatogramas de las muestras digeridas a 280 nm. Se observó claramente que la intensidad del pico de AF fue igual en las muestras TSF, AC:TSF y AF. Esto demuestra que la vitamina fue liberada de los nanocarriers luego de la digestión gastrointestinal, independientemente de la matriz en la que se encontrara (en solución o emulsión), dejando al AF bioaccesible en el sitio en donde se produciría su absorción. En cuanto a los cromatogramas registrados a 220 nm (**Figura 4.B**) no se identificaron los picos correspondientes a las proteínas de la EW, lo que indica que su proteólisis

fue completa durante la digestión *in vitro*. En particular, en la muestra emulsionada se detectaron 3 picos que fueron eluídos en la zona donde el gradiente de solvente tenía una polaridad muy alta. Si bien no fueron identificados, se estableció que corresponderían a productos de digestión hidrosolubles provenientes del AC.

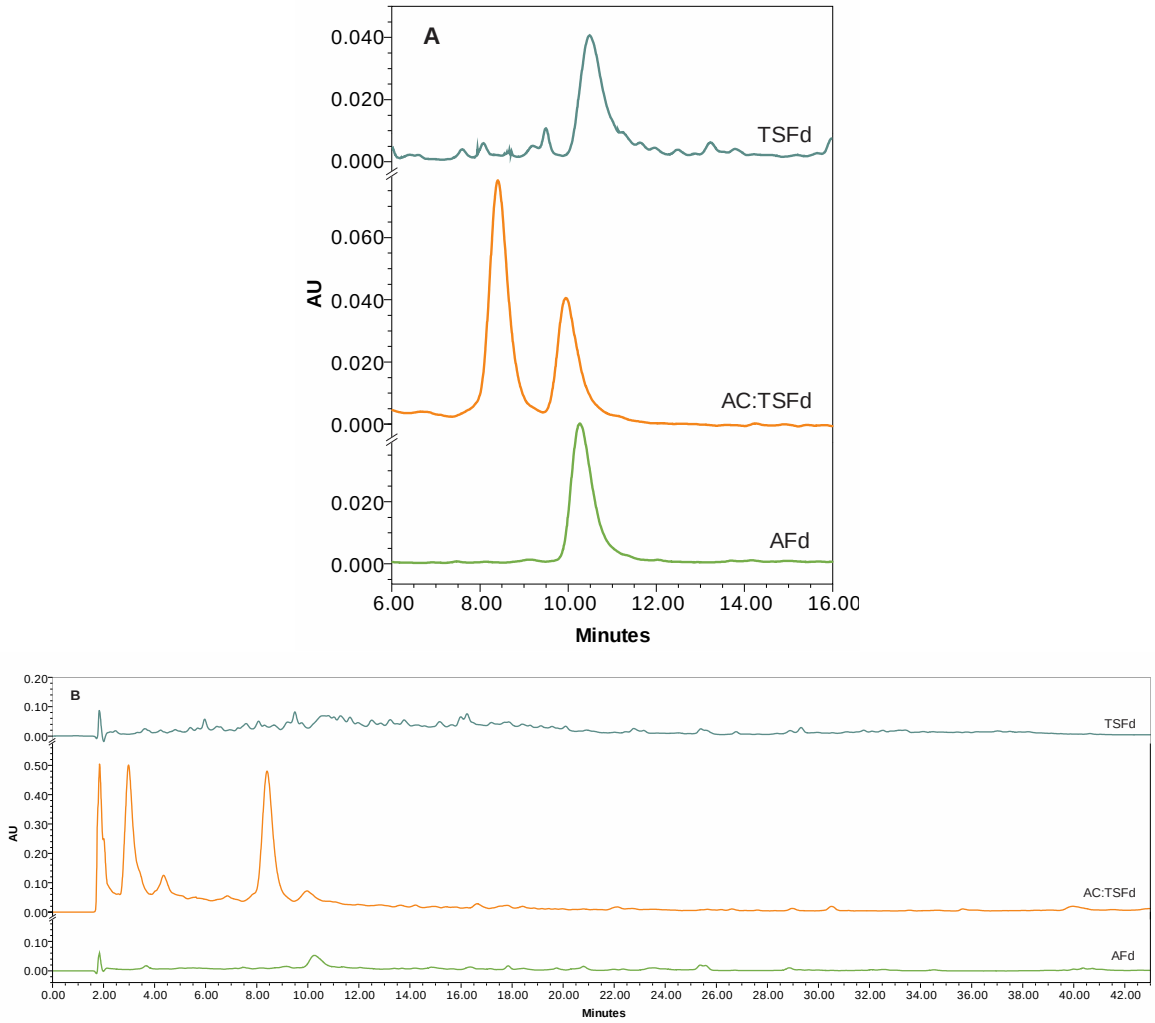


Figura 4. Cromatogramas de muestras TSFd, AC:TSFd y AFd registrados a 280 (A) y a 220 nm (B)

CONCLUSIONES

El AF interacciona con las nanopartículas de EW para formar nanocarriers. Esta interacción se verificó también en sistemas emulsionados. Se demostró que luego de la digestión gastrointestinal *in vitro* la vitamina se libera en el medio y queda disponible para su absorción, tanto en solución como en emulsión. Además, se comprobó que la presencia de AF no altera la digestión de las proteínas de EW. Esto indicaría que los nanocarriers de EW serían sistemas eficientes para el transporte de vitaminas, ya que pueden ser correctamente digeridos en el organismo, luego de liberar al bioactivo. Finalmente, la respuesta similar de los nanocarriers en solución o en emulsión incrementaría la versatilidad de este sistema para ser empleado en la fortificación de distintas matrices alimentarias obteniendo iguales resultados.

BIBLIOGRAFÍA

Bell, L. N. (2000). Stability Testing of Nutraceuticals and Functional Foods. En: Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods. CRC Press.

Coates, W. (2011). Chapter 37 - Whole and Ground Chia (Salvia hispanica L.) Seeds, Chia Oil – Effects on Plasma Lipids and Fatty Acids A2 - Preedy, Victor R. En: R. R. Watson & V. B. Patel. Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention. San Diego: Academic Press. 309-315.

Chen, L., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. Trends in Food Science & Technology, 17: 272-283.

Galazka, V. B., Dickinson, E., & Ledward, D. A. (1996). Effect of high pressure on the emulsifying behaviour of Î²-lactoglobulin. Food Hydrocolloids, 10: 213-219.

Gu, Y. S., Decker, A. E., & McClements, D. J. (2005). Production and characterization of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by multilayer membranes consisting of Î²-lactoglobulin, l-carrageenan and gelatin. Langmuir, 21: 5752-5760.

Güzey, D., Kim, H. J., & McClements, D. J. (2004). Factors influencing the production of o/w emulsions stabilized by b-lactoglobulin-pectin membranes. Food Hydrocolloids, 18: 967-975.

Huang, X., Kakuda, Y., & Cui, W. (2001). Hydrocolloids in emulsions: Particle size distribution and interfacial activity. Food Hydrocolloids, 15: 533-542.

Iyer, R., & Tomar, S. K. (2009). Folate: A Functional Food Constituent. Journal of Food Science, 74: R114-R122.

Jha, N. S., & Kishore, N. (2011). Thermodynamic studies on the interaction of folic acid with bovine serum albumin. The Journal of Chemical Thermodynamics, 43: 814-821.

Joye, I. J., & McClements, D. J. (2014). Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 19: 417-427.

Leroux, J., Langendorff, V., Schick, G., Vaishnav, V., & Mazoyer, J. (2003). Emulsion stabilizing properties of pectin. Food Hydrocolloids, 17: 455-462.

Li-Chan, E., Powrie, W. D., & Nakai, S. (1995). The chemistry of eggs and egg products. En: W. J. Stadelman & O. J. Cotterill. Egg science and Technology. 4th. New York: Food Products Press. 105-175.

Liang, L., & Subirade, M. (2002). Study of the acid and thermal stability of b-lactoglobulin-ligand complexes using fluorescence quenching. Food Chemistry, 132: 2023-2029.

Moreno, F. J., Mellon, F. A., Wickham, M. S. J., Bottrill, A. R., & Mills, E. N. C. (2005). Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber e 1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. FEBS Journal, 272: 341-352.

Opedal, N. v. d. T., Sørland, G., & Sjöblom, J. (2009). Methods for Droplet Size Distribution Determination of Water-in-oil Emulsions using Low-Field NMR The Open-Access Journal for the Basic Principles of Diffusion Theory, Experimen, 7: 1-29.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universidad de Buenos Aires, CONICET y ANPCyT.

Caracterización y uso de bagazo de manzana para la producción de biomasa de levaduras autóctonas destinadas a vinificación

Bravo S. (1,2), Morales M. (2), Constenla D. (3), Caballero A. (1,2)

.

(1) Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas. CONICET-UNComahue. Buenos Aires 1400. Neuquén, Neuquén. Argentina
(2) Facultad de Ciencias y Tecnología de los Alimentos. Universidad Nacional del Comahue. Reconquista y 25 de Mayo. Villa Regina. Río Negro.
(3)Departamento Ing. Química- UNS-PLAPIQUI (UNS-CONICET)
Dirección de e-mail: seb.bravo@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue caracterizar un medio de cultivo a base de bagazo de manzana y ensayar su uso como sustrato para la producción de biomasa de levaduras convencionales y no convencionales indígenas de la región y seleccionadas por su probada aptitud para uso en vinificación. Los bagazos fueron caracterizados en sus contenidos de azúcares reductores (AR), nitrógeno fácilmente asimilable (FAN), humedad, pH y polifenoles totales. Las cepas de levaduras conservadas en glicerol 20% (v/v) fueron reconstituidas en agar GPY y se propagaron en medios aerobios conteniendo bagazo al 10%(p/v), 50%(p/v) y 100%(p/v) a 25º±2C y pH4,5. La cinética de los procesos se caracterizó a través de la evolución de los AR y la producción de biomasa por recuento de viables en agar GPY. Los ensayos se realizaron a escala de laboratorio y cinéticas de crecimiento en medios definidos y completos (GPY) se utilizaron como control. Un 10% (p/v) de bagazo en el medio de cultivo resultó suficiente para el crecimiento de las levaduras. Estos resultados evidencian que el bagazo de manzana constituye una buena alternativa para la producción de biomasa de levaduras.

Palabras clave: Bagazo, Biomasa, *Saccharomyces cerevisiae y Pichia kudriavzevii*

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize a culture medium based on bagasse apple and test its use as a substrate for the biomass production of conventional and non- conventional indigenous yeasts selected for its proven ability to use in winemaking. The bagasse was characterized in their content of reducing sugars (AR), yeast assimilable nitrogen (FAN), humidity, pH, and total polyphenols. Yeast strains preserved in 20% glycerol (v/v) were reconstituted in agar GPY and propagated in aerobic media containing concentrations of bagasse to 10% (w/v), 50% (w/v) and 100% (w/v) at 25ºC and pH 4.5. The kinetics of the process was characterized by the evolution of AR and biomass production by viable count GPY agar. The tests were conducted at laboratory scale and growth kinetics in complete synthetic media (GPY) was used as control. Media containing concentrations of 50% and 10% bagasse were the most suitable for the growth of yeast. These results suggest that bagasse apple is a good regional alternative for yeast biomass propagation.

Keywords: Bagasse, Biomass, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii*

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la vitivinicultura nacional ha recuperado el lugar de relevancia que históricamente tuvo dentro de las agroindustrias. En la región del Comahue (Patagonia noroccidental) este renacer de la vitivinicultura se tradujo en una significativa reactivación de la actividad en las áreas productivas históricas (Alto Valle de Río Negro) y en el desarrollo de nuevas áreas (Departamento de Añelo, provincia del Neuquén). Con clima y suelos aptos para una vitivinicultura de calidad (Le Guillou 2000), la producción regional está mayoritariamente orientada a la elaboración de vinos tintos (80%) jóvenes y secos de variedades neutras de vid, algunas de las cuales, como Pinot noir y Merlot, han encontrado en la región las condiciones agroecológicas óptimas para expresar todo su potencial enológico (Weizman 2009, Catania and Avagnina 2010). En este tipo de vino la biota microbiana responsable de la vinificación tiene una significativa influencia sobre la calidad sensorial del mismo, en particular sobre su aroma (Fleet 2003). En un mercado internacional globalizado y con sobreoferta, el control de la biota de levaduras responsable de conducir la fermentación alcohólica (FA), proceso central de la vinificación, resulta clave para obtener regularidad en la calidad de los vinos, condición indispensable para mantener y mejorar su competitividad en los nichos de mercado ya ganados y para ganar nuevos nichos.

El uso de cultivos iniciadores desarrollados a partir de cepas de levaduras indígenas de cada área productiva es actualmente una práctica en expansión en la vitivinucultura mundial con el fin de obtener vinos de calidad controlada y además, diferencial. Estas cepas ecotípicas, mejor adaptadas a las características agroecológicas de los cultivares de su región, además de presentar una mejor capacidad de competencia que las foráneas para controlar exitosamente los procesos (Lopes et al. 2007), respetan la tipicidad del terruño (Fleet 2008), expresando en los vinos las notas organolépticas distintivas del mismo. No obstante, los cultivos iniciadores de la FA que actualmente se comercializan en el mercado están constituidos por cepas de levaduras procedentes de las regiones vitivinícolas más importantes del mundo excepto de Argentina. Los estudios sobre ecología de levaduras asociadas a vinificaciones de la región patagónica realizados en el ámbito de la UNComahue desde el año 1993 nos han permitido constituir una importante colección de cultivos de cepas de levaduras indígenas de la región (Del Mónaco et al.2016); con alguna de estas cepas de probada aptitud para la elaboración de vinos de calidad tanto a escala de laboratorio (del Mónaco et al. 2014a) como piloto (del Mónaco et al. 2014b), se pretende ahora desarrollar y comercializar cultivos iniciadores locales en la forma de levadura seca activa (LSA) para su uso en la producción vitivinícola regional.

La propagación de la biomasa es una operación central en el proceso de producción de LSA. Actualmente, los sustratos utilizados a escala industrial son melazas de caña de azúcar y de remolacha enriquecidas con diferentes fuentes nitrogenadas. Ya que en la región no existe este tipo de residuos, en este trabajo se evalúa la potencial capacidad del bagazo de manzanas, un desecho de la industria juguera regional, para ser usado como sustrato alternativo a las melazas de caña y remolacha azucareras en la propagación de la biomasa de levaduras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Levaduras enológicas

S. cerevisiae ÑIF8 (ScF8) y *P. kudriavzevii* (ex *Isatchenkia orientalis*)ÑNI15 (Pk I15) fueron las cepas utilizadas en este trabajo. Ambas cepas, aisladas de vinificaciones en tinto patagónicas, se caracterizaron a nivel molecular como indígenas de la región (del Mónaco *et al.* 2015 y 2016b).

Control de pureza y reactivación de las cepas de levaduras

Los cultivos de las levaduras indígenas almacenados en glicerol a -20°C se activaron en caldo GPY (glucosa 20g/L, peptona 10g/L, extracto levadura 10g/L, pH 5,9) a 30°C durante 24h y seguidamente se inocularon en erlenmeyers conteniendo caldo GPY (100 mL de volumen final).

Adicionalmente, se analizó la pureza de los cultivos por aislamiento en GPY agar y posterior análisis molecular.

Bagazo de manzana

Obtención del bagazo: Los bagazos ensayados en este trabajo resultan de la elaboración de jugos naturales exprimidos de manzana (not from concentrate) libres de aditivos (envase bag in box). Para la elaboración de este tipo de jugos la materia prima manzana es inspeccionada por control de calidad para su aceptación o rechazo, aceptándose únicamente los frutos en su estado de madurez óptimo, sanos, de aspecto fresco y consistencia firme, libres de ataques de insectos y enfermedades que demeriten la calidad interna del fruto, libres de humedad externa anormal y de cualquier olor y/o sabor extraño. Luego pasan a producción, limpieza, lavado y prensado. Después del prensado, el bagazo de manzana obtenido es un producto natural, no fermentado y sin aditivos.

Toma de muestra: Se tomaron 5 muestras de 1kg de bagazo de manzana por lote de producción (aproximadamente 1500 Kg de manzana procesada por lote), analizándose cuatro lotes a razón de un lote mensual. Las muestras (20 en total) se guardaron en bolsas estériles de 1L de capacidad a -20ºC.

Preparación de los medios fermentativos: Las muestras se colocaron en frascos de vidrio estériles y se le aplicó un tratamiento térmico con el objetivo de eliminar microorganismos (calentamiento fraccionado de la muestra a 70°C durante 20 min). La muestra se pesó de acuerdo a la concentración deseada y se la diluyo con agua estéril.

Caracterización química

Humedad: Se determinó gravimétricamente, sometiendo la muestra a estufa de aire caliente a 80ºC durante 24hs y presión atmosférica hasta peso constante y se calculó por diferencia de peso.

pH. Método potenciométrico utilizando un pHmetro ORION RESEARCH, model 231.

Actividad del agua: Para determinar el valor de aw se utilizó un testo 650 (instrumento de medición), una sonda de humedad de alta precisión y un dispositivo de medición (accesorios).Se compone de una cámara de medición de presión que se llena hasta la mitad con el producto. El tiempo de estabilización tiende aprox. 30 minutos a temperatura constante.

Azúcares reductores: La cuantificación se realizó utilizando el método de Fehling-Causse-Bonnansque se basa en la reducción del ion cúprico (contenido en el reactivo de Fehling previamente titulado) en medio alcalino y en caliente por parte de los azúcares reductores del bagazo.

*Nitrógeno Fácilmente Asimilable:*El contenido de nitrógeno fácilmente asimilable por las levaduras (catión amonio y aminoácidos libres) se determinó por el Método de Sörensen.

*Amonio:*Se determinó potenciométricamente utilizando un electrodo selectivo de amonio Orion ResearchModelo 95.

Polifenoles totales: Se cuantificaron espectrofotométricamente utilizando el método Folin Ciocalteu y curva de calibración con ácido gálico.

Ensayos de propagación de la biomasa

Se realizaron en erlenmeyer de 500mL conteniendo 100 g de bagazo o 100 mL de suspensiones al 50% (p/v) y 10% (p/v) de bagazo en agua destilada estéril inoculados con los correspondientes cultivos de levadura de manera de tener una densidad inicial en el fermentador de 10^6 cél/mL. Los cultivos se incubaron a 30ºC sin agitación. Cultivos en medio GPY caldo (100 mL) se realizaron como control. La cinética del proceso se caracterizó por recuento de levaduras viables cultivables (UFC/mL) en placas de GPY agar incubadas a 25±2ºC en aerobiosis durante 72h.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa STATISTICA Six Sigma. Se realizaron análisis de ANOVA y test post hoc de Tukey. Los datos experimentales de propagación de biomasa se ajustaron mediante la Ecuación modificada de Gompertz (Zwietering et al., 1990), obteniendo distintos valores en los parámetros de crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la región del Comahue (Alto Valle de Río Negro y Departamento Confluencia de Neuquén) la producción de frutas de pepitas (manzanas y peras) constituye uno de los pilares de la economía; en particular, la provincia Río Negro es la primera productora nacional de manzanas y peras. Si bien la producción primaria se comercializa mayoritariamente en fresco, en el caso de la manzana el 40% se destina a la industria, principalmente para la producción de jugos concentrados y exprimidos (not from concentrated). La cantidad de bagazo generado durante la producción de este último tipo de jugos representa el 35% de la fruta procesada, por lo que su revalorización en la producción de biomasa de levaduras además de resolver el problema de su disposición sin generar pasivos ambientales, mejorará la rentabilidad de la empresa productora y contribuirá a la diversificación productiva regional. Por este motivo, nuestro objetivo fue caracterizar un medio de cultivo a base de bagazo de manzana y ensayar su uso para la producción de biomasa de levaduras indígenas de la región pertenecientes a las especies S. cerevisiae y *P. kudriavzevii* y de probada aptitud para uso enológico (del Mónaco et al. 2016).

Aunque en la región se elaboran jugos de manzana de las variedades Red delicious y Granny Smith, los bagazos evaluados en este trabajo sólo provinieron de la primera de las variedades nombradas.

Con el fin de conocer la composición de los bagazos y el grado de heterogeneidad entre los diversos lotes muestreados en diferentes semanas del período productivo, se realizó el análisis físicoquímico de los mismos, en particular de aquellos parámetros que son determinantes para el crecimiento de las levaduras. Los resultados presentados en la Tabla 1 son consistentes con los valores de dichos parámetros reportados para manzanas regionales de la misma variedad (información suministrada por Jugos SA).

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica del bagazo de manzana variedad Red delicious

Lote	% Humedad	% sólidos Totales	pH	aw	% AR.	FAN mg N* Kg	NH_4^+ mg	Polifenoles Totales
Lote								
1	78,42 ±0,46 A	21,58±0,46^{B}	4,57±0,01 C	SD	8,22±0,5^{A}	124,8±5,5^{A}	2,57±4,0^{A}	1375,5±138,2^{A}
2	80,77±1,46^{B}	19,23± 1,46^{A}	4,42±0,01 A	SD	11,1± 1,1^{B}	140,6±5,2^{A}	0,04±0,1^{A}	2176,24±177,2^{B}
3	80,38 ±0,41 AB	19,62±0,41^{A} B	4,56±0,04 C	SD	9,34± 0,5^{A}	126,3±11,7^{A}	0,07±0,1^{A}	1688,96±95,8^{A}
	79,51 ±0,71 AB	20,49±0,71^{A} B	4,49±0,04 B	SD	9,63± 0,6^{A}	133,8±9,4^{A}	0,15 ±0,1^{A}	1546,78±125,4^{A}

aw : actividad de agua, AR: azúcares reductores, FAN: nitrógeno fácilmente asimilable. SD: sin diferencias, valor experimental 99,9%.

El análisis estadístico de los datos (Anova y test de Tukey con n=5) evidencia diferencias significativas en el porcentaje de humedad y de sólidos totales, dos parámetros relacionados entre sí, únicamente entre los lotes 1 y 2. Otros parámetros que presentaron diferencias entre los lotes analizados fueron el contenido de ART y el pH. Aunque el contenido de azúcares reductores es determinante en la propagación de biomasa de las levaduras, en las concentraciones presentadas por el bagazo las diferencias entre lotes no resultan de importancia para la producción de biomasa ya que se trata de un sustrato en exceso. Lo mismo puede decirse de las variaciones del pH, más allá de las diferencias observadas entre lotes, la acidez de los bagazos resulta la adecuada para el crecimiento de las levaduras en detrimento de las bacterias pudiendo especularse sobre una baja probabilidad de contaminación bacteriana de los cultivos durante el proceso de producción de biomasa, aunque no elimina la posibilidad de una contaminación por hongos filamentosos, generalmente presentes en la cáscara de la fruta. Una etapa inicial en condiciones de anaerobiosis eliminaría esta posibilidad. Por otra parte y afortunadamente, la concentración de compuestos nitrogenados asimilables por las levaduras, representados por el contenido de FAN

y de NH_4^+, no presentan diferencias significativas entre lotes. La concentración de este sustrato, en defecto respecto de los carbonados (azúcares) son determinantes para el crecimiento de las levaduras. Estos resultados obtenidos del análisis fisicoquímico permiten concluir que las variaciones en la composición observadas entre lotes no comprometen la calidad del bagazo como potencial sustrato para la propagación de biomasa.
En la **Tabla 2** se presentan los resultados de las cinéticas de crecimientos de las cepas indígenas SC F8 y Pk I15 en medios conteniendo diferentes concentraciones de bagazo de manzanas y en el medio control.

Tabla 2: Cinéticas del proceso de producción de biomasa de *S. cerevisiae* F8 (a la izquierda, F8) y*P. kudriavzevii* I15 (a la derecha, Pk) representadas como Ln (UFC/UFC inicial) vs tiempo desarrollados a distintas concentraciones de bagazo de manzana variedad Red Delicious. Control: caldo GPY.

Tiempo (Hs)	F8 – Control	F8 - 100%	F8 - 50%	F8 - 10%	Pk - Control	Pk- 100%	Pk - 50%	Pk - 10%
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
4	1,687	1,661	0,450	0,000	0,000	1,139	0,174	1,925
8	2,786	2,599	1,090	2,045	1,705	1,257	1,273	2,079
16	3,256	2,848	1,177	2,045	1,609	1,363	1,338	2,148
20	3,266	2,851	1,257	1,157	1,705	1,893	1,455	2,358
24	3,191	1,543	2,381	1,003	2,015	3,571	2,828	1,966
28	2,940	0,562	2,786	0,310	3,068	2,356	2,349	3,247
32	2,381	0,051	2,735	0,310	2,442	1,006	1,455	3,247
36	1,687	0,799	1,464	1,409	2,833	2,844	1,628	2,922

Estos datos experimentales ajustados a partir de la Ecuación de Gompertzmodificada (**Figura1**) y los valores en los parámetros A: valor máximo de Ln (UFC/UFC inicial), m: velocidad máxima, y L: duración estimada de la fase lag obtenidos del ajuste para las diferentes condiciones de cultivos y cepas se presentan en la **Tabla 3**. En general, los valores de R^2 evidencian un buen ajuste del modelo a los datos. Como era de esperar, la propagación de las células de *Saccharomyces cerevisiae* ÑIF8 y *Pichia kudriavzevii* ÑNI15 dependió de la composición del medio. De acuerdo a los valores de los parámetros reportados en la **Tabla 3** la mayor producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* ÑIF8 se observó en el medio conteniendo una concentración de bagazo del 50% (A=2,43) y la de *Pichia kudriavzevii* ÑNI15 en medios al 10%. Las menores cantidades de biomasa obtenidas para *S. cerevisiae* en medios conteniendo 10% p/v de bagazo podría deberse a un contenido insuficiente del medio en algún compuesto indispensable para el crecimiento de la levadura (como vitaminas, por ejemplo). Los resultados obtenidos para *P. kudriavzevii*, una especie capaz de crecer en medios libres de vitaminas (del Mónaco *et al.* 2014a) parecen apoyar este supuesto. Finalmente, las diferencias en la cantidad de biomasa producida entre la mayoría de los medios experimentales y el medio control presentan al bagazo de manzana como un medio complejo completo para el crecimiento las levaduras ensayadas.

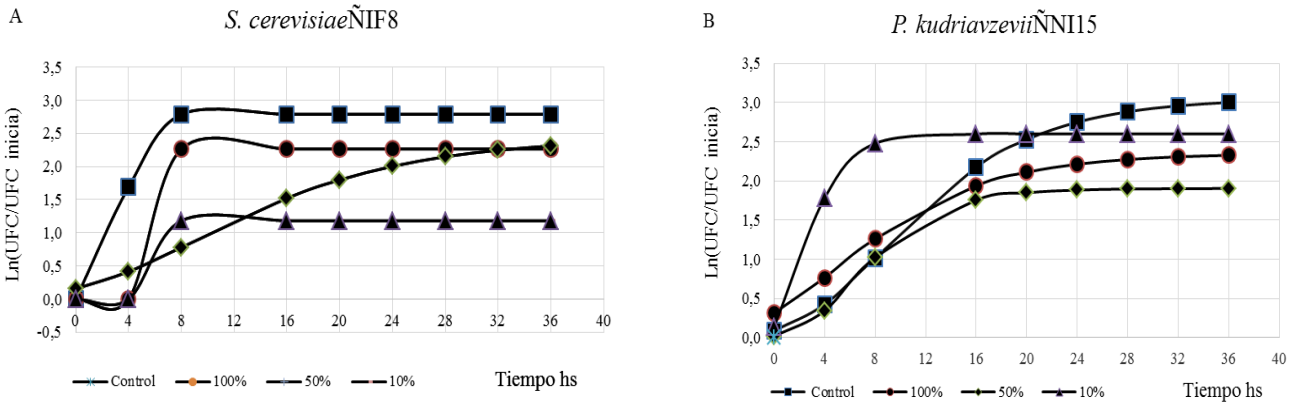


Figura 1: Perfiles cinéticos expresados como Ln (UFC/UFC inicial) obtenidos a partir del ajuste de la ecuación de Gompertz modificada a los datos experimentales de cultivos de **A.** *S.cerevisiae* ÑIF8 y **B.** *P. kudriavzevii* ÑNI15 realizados con concentraciones de bagazo de manzana variedad Red delicious del 10%(triángulos), 50%(rombo), 100%(circulo) y en el medio control GPY (cuadrados).

	Pk Control	Pk 100%	Pk 50%	Pk 10%
R^2	0,847	0,723	0,851	0,876
A	3,059	2,352	1,905	2,601
m	0,165	0,126	0,177	0,493
L	1,822	0,000	2,188	0,186

Tabla 4. Parámetros de la ecuación Gompertz modificada mediante el modelado de la producción de biomasaen distintas concentraciones de bagazo de manzana al 10%, 50%, 100% y control. Variedad Red Delicious. Cinéticas del proceso fermentativo conducido por *S. cerevisiae* ÑIF8 (Izquierda), ycinéticas del proceso fermentativo conducido por*P. kudriavzevii*ÑNI15 (Derecha). A (valor máximo de Ln (UFC/UFC inicial)), m (velocidad máxima – horas $^{-1}$), l (Duración estimada de la fase lag en horas).

	F8 Control	F8 100%	F8 50%	F8 10%
R^2	0,885	0,899	0,856	0,643
A	2,787	1,614	2,436	1,183
m	1,860	2,241	0,099	2,035
L	3,069	0,301	0,110	4,246

CONCLUSIONES

Aunque preliminares, estos resultados permiten concluir que el bagazo de manzana es una buena alternativa para producir biomasa a partir de levaduras vínicas autóctonas de la región, comportándose en las condiciones ensayadas de manera similar al medio definido completo (GPY) específicamente diseñado para el crecimiento de células de levaduras independientemente de la especie.

BIBLIOGRAFÍA

Catania C, Avagnina S.2010. El terruño argentino. Mendoza, INTA y Editora Andina Sur.p. 111-121.
del Mónaco SM, Barda NB, Rubio NC, Caballero AC. 2014a. Selection and characterization of a Patagonian*Pichia kudriavzevii* for wine deacidification. Journal of Applied Microbiology, 117: 451-464.
del Mónaco S.M., Bravo S.M.E., Curilén Y.L., Carreño V.A., Caballero A.C. 2014b. A regional starter forhigh quality wines: an Argentinean Patagonia experience. Bulletin de l'OIV 87 (998-999-1000): 217-224
del Mónaco SM, Rodríquez ME, Lopes CA. 2015. *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of NorthPatagonian winemaking terroir. International Journal of Food Microbiology, 230:31-9
del Mónaco SM, Curilen Y, Maturano RC, Bravo SME, Simes AB and Caballero AC. 2016. The use of indigenous yeasts to develop high-quality Patagonian Wines. En: Morata A and Loira I Eds. Grape andWine Biotechnology. Rijeka: InTech. pp. 325-344
Fleet GH. Yeast interactions and wine flavour. 2003. International Journal of Food Microbiology, 86: 11–22.
Fleet G. 2008. Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Research, 8:979–995.
Le Guillou B. 2000. Río Negro. De la vigne dans des oasis de la Patagonie argentine. La Vigne 116:112-113.
López CA, Rodríguez ME, Sangorrín M, Querol A, Caballero AC. 2007. Patagonian wines: the selection of
an indigenous yeast starter. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 34(8):539-546
Weizman D. 2009. Mapa vitivinícola de Argentina. Revista Rumbos 326: 18-24.
Zwietering, M., I. Jongenburger, F. Rombouts, and K. Van't Riet. "Modeling of the Bacterial Growth Curve." *Applied and Environmental Microbiology*, 1990: 1875-1881.

Modificación del comportamiento reológico, compuestos fenólicos y actividad antioxidante de masa de chía (*Salvia hispanica* L.) por fermentación láctica

Bustos A.Y.(1,2), Gerez C.L.(3), Mohtar Mothar L.G.(1), Paz Zanini V.(1,4) , Nazareno M.A.(1,4), Taranto M.P. (3), Iturriaga L.B.(1,4)

(1) Centro de Investigaciones y Transferencia de Santiago del Estero (CITSE –CONICET). Argentina.
(2) Universidad de San Pablo T. Tucumán, Argentina.
(3) Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET). Tucumán, Argentina.
(4) Universidad Nacional de Santiago del Estero. Argentina.

RESUMEN

En este trabajo se aislaron y seleccionaron bacterias lácticas (BAL) autóctonas de masa fermentada de chía (*Salvia hispanica* L.). Se seleccionó la cepa *Lactobacillus (L.) plantarum* C8 en base a su cinética de acidificación y actividad proteolítica. Posteriormente, se preparó y caracterizó masa madre de chía con el cultivo iniciador seleccionado y fue utilizada como ingrediente para la producción de panes de trigo. Luego de 24 h de fermentación se observó un significativo ($P < 0.05$) incremento del carácter viscoso de la masa y de la concentración de ácidos orgánicos (láctico, acético y fenil-láctico), compuestos fenólicos y actividad antioxidante. El ácido clorogénico sólo se encontró luego de la fermentación, mientras que el ácido ferúlico se detectó desde el principio de la fermentación siendo 32% más alto en masa ácida de chía. El agregado de masa fermentada de chía mejoró las características generales del pan blanco, incluyendo propiedades físicas (reducción de la dureza y masticabilidad de la miga) y antioxidantes (incremento del 25% en promedio), en comparación con el agregado de harina de chía no fermentada. Este trabajo muestra por primea vez que cepas de BAL son capaces de fermentar masa de chía, mejorando sus características lo cual tendría potenciales aplicaciones en la industria de los alimentos funcionales.

Palabras claves: Masa ácida de chía; *Lactobacillus plantarum;* Actividad antioxidante; Compuestos fenólicos.

ABSTRACT

In this work autochthonous lactic acid bacteria (LAB) were isolated from fermented chia (*Salvia hispanica* L.) dough. *Lactobacillus (L.) plantarum* C8 was selected on the basis of its acidification kinetics and proteolytic activity. Then, a chia sourdough was prepared and characterized with the selected starter culture and used as an ingredient for the production of wheat breads. Rheological analyses indicated that after 24 h of fermentation, the chia dough showed less consistency and increased viscosity. Additionally, organic acid (lactic, acetic and phenyl lactic acid) concentrations, phenolic compound content, and antioxidant activities significantly ($P < 0.05$) increased in sourdough, compared to unfermented chia dough. Chlorogenic acid was only found in fermented dough, while ferulic acid was detected from the beginning, being 32 % higher in chia sourdough. The use of fermented chia dough (sourdough) improved the overall characteristics of white bread, including physical (e.g. less hardness and chewiness of the crumb) and higher antioxidant properties, compared with unfermented chia flour addition.

To our knowledge, this work shows for first time that LAB strains are able to ferment chia dough improving its characteristics with potential applications in the functional food industry.

Keywords: Chia sourdough; *Lactobacillus plantarum;* Physical properties; Antioxidant activity; Phenolics compounds

INTRODUCCIÓN

Chía es una planta anual perteneciente a la familia de las *Lamiaceae*, nativa del sur de México y Norte de Guatemala (Álvarez-Chávez et al., 2008). Fue un alimento básico para las civilizaciones de México y su cultivo era probablemente el tercero en importancia económica, superado sólo por el maíz y el frijol. Actualmente, debido a sus destacadas propiedades nutricionales y funcionales, los científicos han recuperado el interés por esta semilla. En efecto, la semilla de chía contiene gran cantidad de antioxidantes, minerales, vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados, especialmente ácidos grasos omega-3 y omega-6, importantes constituyentes del sistema nervioso central (Reyes-Caudillo et al., 2008). Por lo tanto, la incorporación de chía en diferentes alimentos tales como *pound cakes* (Pizarro et al., 2013), pan de trigo (Coelho et al., 2015) y pan libre de gluten (Moreira et al., 2013) fue recientemente reportado. Sin embargo, a pesar de sus valiosas características nutricionales y funcionales, la incorporación de chía en productos de panadería afecta negativamente la formación de la red de gluten y la retención de gas en la masa panaria generando productos de baja calidad tecnológica (Coelho et al., 2015; Steffolani et al., 2015). En consecuencia, la obtención de una masa estable y adecuada para panificación representa un importante reto tecnológico. Para superar estas limitaciones se han desarrollado diferentes estrategias tales como adición de hidrocoloides, emulsionantes, proteínas y masas ácidas ("*sourdough*").

La masa ácida consiste en una mezcla de harina y agua fermentada con bacterias lácticas (BAL) principalmente cepas heterofermentativas que generan ácidos láctico, acético y CO_2 como productos finales. Numerosos estudios han reportado efectos positivos de la adición de sourdough en diferentes parámetros de calidad del pan (estructura de la miga, volumen de la masa, sabor, aroma) así como incremento en la vida de estante del producto (Clarke et al., 2004; Gerez et al., 2010; Mamhoud et al., 2016; Thiele et al., 2002). Adicionalmente, el metabolismo de las BAL durante la fermentación facilita la hidrólisis de macromoléculas, por lo tanto, mejora la digestibilidad y la calidad nutricional de los panes (Bartkiene et al., 2012; Rizzello et al., 2016). Sin embargo, los procesos de fermentación dependen de numerosos factores específicos que deben ser estrictamente controlados para obtener un producto de la calidad deseada. Entre estos determinantes, el tipo de harina y el cultivo iniciador son los más importantes. La harina seleccionada afecta tanto las características tecnológicas como el valor nutricional de los productos horneados (Coda et al., 2014). Por otra parte, el éxito en la aplicación de masa ácida en panificación radica principalmente en la selección de las BAL que van a ser usadas como iniciadores. Se ha demostrado que los cultivos comerciales diseñados para masas ácidas de cereales que contienen gluten no son adecuados para la fermentación de harinas libres de gluten y por ello resulta imprescindible la selección cuidadosa de nuevos microorganismos iniciadores (Rizzello et al., 2016). En este sentido, a nuestro entender, no hay datos sobre la selección de cepas lácticas adecuadas para la preparación de masas madres de harina de chía. De lo expuesto hasta aquí surgió el objetivo general de este trabajo que fue la selección de cepas de BAL autóctonas a partir de masa de chía fermentada. Posteriormente se preparó y caracterizó una masa madre de chía, elaborada con el cultivo iniciador seleccionado, en términos de su comportamiento reológico, producción de ácidos orgánicos, contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante. Esta masa madre se utilizó como ingrediente para la producción de panes de trigo. Por último, se evaluó el perfil tecnológico y funcional de los panes elaborados con el fin de poner en evidencia las ventajas del uso de masa madre respecto del uso de harina de chía sin fermentar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

La harina de trigo y otros ingredientes se obtuvieron del mercado local, mientras que la harina de chía se obtuvo mediante la molienda de semillas comerciales de chía (A. Sturla, Buenos Aires, Argentina) en un molino de escala de laboratorio (Hammer mill, Antofagasta, Chile). El 1,1-difenil-2-picrilo-hidracilo (DPPH); 2,4,6-Tris (2-

piridil)-s-triazina (TPTZ); ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-carboxilico (Trolox) y ácido ascórbico (AA) se adquirieron de Sigma -Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

Análisis de harinas

Las muestras de las harinas fueron analizados a fin de conocer el contenido de: grasa (método 920.39), cenizas (método 923.03), nitrógeno total (método 954.01) y humedad (método 925.09). Los análisis se llevaron a cabo siguiendo las normativas AOAC (1990).

Aislamiento de BAL

Se aislaron BAL a partir de masa fermentada de harina de chía, las cuales fueron preparadas para obtener un rendimiento de masa (RM: peso de la masa/peso de harina x 100) de 300 y fermentadas a 30 o 37°C durante 24 h. La fermentación de masa de chía se realizó aplicando el protocolo tradicional utilizada para la fermentación de harina de trigo, sin el agregado de cultivos iniciadores ni levadura de panadería (Rizzello et al., 2016).

Después de esta primera fermentación, se llevaron a cabo 5 refrescos sucesivos mezclando 25% de la masa previamente fermentada con harina y agua (RM de 300), e incubando durante 24 horas a 30 o 37°C. Para la determinación del pH se tomaron muestras a diferentes tiempos tal como se indica a continuación: 10 g de cada muestra se mezclaron con 90 ml de agua destilada y se agitaron y luego se centrifugaron a 9000 *g* durante 15 min. La medida de pH se realizó en el sobrenadante utilizando un peachímetro (pH 209; Hanna Instruments, Amorim-Póvoa de Varzim, Portugal). Después de cinco refrescos la tasa de acidificación fue estable y la masa de chía fermentada se utilizó para el aislamiento de BAL siguiendo el siguiente esquema: 10 g de masa fermentada de chía se homogeneizaron con 90 ml de solución salina estéril (0,85% NaCl) y se cultivaron en agar MRS Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) suplementado con cicloheximida (0,1 g/L). Las placas se incubaron a 30 o 37°C durante 48 h. Las bacterias autóctonas, fueron seleccionados al azar de las placas que contenían entre 30 y 300 colonias. Los cultivos puros se cultivaron en agar MRS a 30 o 37°C durante 24 h, y después las cepas purificadas se almacenaron a -70°C en caldo MRS con 15% (v/v) de glicerol hasta su utilización. Cincuenta cepas (Gram positiva, catalasa- negativa y capaces de acidificar el medio de cultivo) fueron seleccionados y cultivadas durante 24 h en caldo MRS a 30 o 37°C (dependiendo de la temperatura de aislamiento). Las células fueron recolectadas por centrifugación (4000 *g* durante 10 min) y se lavaron dos veces con solución salina. 100 gramos de harina de chía y 200 ml de agua corriente conteniendo la suspensión celular anterior (densidad de células en la masa de 7 ufc/g de masa), se utilizaron para obtener un RM de 300. La mezcla se realizó manualmente durante 5 min. Las masas se fermentaron a 30 o 37°C por 24 h. El crecimiento de LAB se determinó por el método de dilución en placa con agar MRS; las placas se incubaron a 37°C durante 48 h y los resultados se expresaron como log ufc/g. Se determinó el pH de masas como se describió anteriormente y las concentraciones totales de aminoácidos libres en masas se determinaron utilizando el método de *o*-ftalaldehído (OPA) (Iglesia, Porter, Catignani, y Swaisgood, 1985)

Identificación genotípica de BAL seleccionada

La identificación del genotipo de la cepa seleccionada se determinó sobre la base de la secuenciación de la región variable (V1) del rDNA 16S. Los oligonucleótidos para las reacciones de PCR fueron: PLB16, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; y MLB16, 5'-GGCTGCTGGCACGTAGTTAG-3'. La amplificación por PCR consistió en 30 ciclos de 30 s / 94°C, 30 s / 50°C y 1 min / 72ºC. Los productos finales de PCR se purificaron usando un kit comercial (AccuPrep® PCR kit de purificación; Bioneer Corporation, Genbiotech, Bs As, Arg) y se sometieron a secuenciación (Servicio de Secuenciación, Centro Científico Tecnológico CONICET Tucumán, Argentina). Las secuencias resultantes se analizaron en línea utilizando los algoritmos BLAST del NCBI (Centro Nacional de Información sobre Biotecnología, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) y el Proyecto de Base de Datos ribosomal (http: // RDP. cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp).

Preparación y caracterización de masa madre de chía preparada con la cepa seleccionada

Se preparó masa madre de chía utilizando como cultivo iniciador la cepa *L. plantarum* C8 (cepa seleccionada). El pH de la masa se determinó de igual manera a la descripta en el párrafo anterior, excepto que la temperatura de incubación fue de 37°C (temperatura óptima de crecimiento de la cepa seleccionada). El crecimiento de las BAL se determinó por el método de dilución en placa con agar MRS; las placas se incubaron a 37°C durante 48 h. La cuantificación de ácido láctico se realizó por amperometría usando un sistema electroquímico de tres electrodos optimizados previamente para la detección de ácido láctico (Zanini, de Mishima, y Solís, 2011). Los ácidos acético y fenil-láctico se midieron como fuera descripto previamente (Gerez et al., 2010) por HPLC (CIUO 2350 modelo) usando una columna de exclusión iónica HPX-87H Aminex (300 mm x 7,8 mm, Bio-Rad, Hercules, CA). Las concentraciones de ácidos orgánicos se expresaron como g o □g por Kg de masa.

Caracterización reológica de masa de chía fermentada

Las medidas reológicas se llevaron a cabo utilizando un reómetro de tensión controlada (AR 2000, TA Instruments, New Castle, DE) con un software para reología (Programa de Análisis de Datos Reología Advantage). Las muestras de masa (0 y 24 h de fermentación) se fijaron entre las placas (D = 40 mm con una separación de 1,500 □m) y las mediciones se iniciaron después de un tiempo de relajación de 10 min. Las pruebas se llevaron a cabo a temperatura constante (25°C) usando un sistema de placa Peltier acoplado a una unidad de circulación de agua. Los barridos de frecuencia se realizaron en la región viscoelasticidad lineal y en rango de frecuencias de 0,1 a 10 Hz. Los parámetros reológicos medidos fueron: módulo de almacenamiento (G '), módulo de pérdida (G''), módulo complejo (G*) y la tangente del ángulo de pérdida (tan δ).

Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de la masa de chía fermentada

Preparación del extracto: Se secaron diez gramos de masas de chía (0 y 24 h de fermentación) y muestras de panes a 50°C durante 12 h y luego fueron triturados manualmente en un mortero tradicional hasta polvo. Para la extracción, 1 g de cada muestra se mezcló con 10 ml de una solución metanol:agua 80:20 durante 2 h a temperatura ambiente. Seguidamente las muestras se centrifugaron (9000 *g* durante 15 min). Los sobrenadantes (extractos) se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Compuestos fenólicos y su identificación mediante electroforesis capilar de zona

El contenido de polifenoles totales se determinaron colorimétricamente usando el método de Folin-Ciocalteu como se ha descripto previamente (Ezekiel et al., 2013). La absorbancia se determinó a 725 nm con el espectrofotómetro Jasco V-630 (Medson, Paczkowo, Polonia). Se realizó una curva de calibración con ácido gálico (15 a 200 ppm) a fin de determinar la concentración de compuestos fenólicos.

La identificación de los polifenoles presente en masas (0 y 24 h de fermentación) se realizó mediante electroforesis capilar de zona en el instrumento Agilent CE equipado con un detector UV ajustado a 206 nm. La separación y el análisis se llevaron a cabo en un tubo capilar de sílice fundida (50 µm de diámetro interno y 56 cm de longitud total) a 25°C. Se utilizaron los siguientes estándares: kaempferol, galangina, quercetina y ácidos: benzoico, caféico, ferúlico, clorogénico, 3,4 dihidroxibenzoico y cumárico.

Actividad antioxidante

Capacidad captadora del radical DPPH○ (1,1 difenil-2-picrilhidrazilo)

Se determinó la actividad antioxidante de muestras de masas y panes. Diferentes alícuotas de cada uno de los extractos (preparados como se ha descripto anteriormente) se añadieron a una solución metanólica de DPPH (absorbancia inicial a 515 nm de 1,20). La disminución de la absorbancia a 515 nm se determinó durante 30 min usando un espectrofotómetro. La actividad antioxidante se expresó como ARA%/ g de peso seco (ps); donde el porcentaje de la desaparición DPPH por los extractos se calculó según la siguiente ecuación: ARA% = (1 – ASS/A0) x 100 donde ASS es la absorbancia de la solución en un estado de equilibrio y A0 es la absorbancia de la solución de DPPH antes de añadir el antioxidante. La absorbancia del sistema en el estado estacionario se estimó mediante un ajuste matemático de curvas cinéticas

realizadas con software Origin 7.0. Los valores de CI50 calculados denotan la concentración de la muestra requerida para disminuir la absorbancia a 515 nm en un 50%.

Método de FRAP (ferric reducing/antioxidant power)

El ensayo de FRAP se llevó a cabo de acuerdo con Benzie y Strain, (1996). La mezcla de reacción consistió en una solución de cloruro férrico solución (20 mmol/L), TPTZ, (10 mmol/L TPTZ en 40 mmol/L de HCl) y tampón de acetato (pH = 3,5) en una proporción de 1: 1: 10, respectivamente. Para cada reacción 0,05 ml del extracto, preparado como se describe anteriormente, se añadieron a 0,95 ml de la mezcla de reactivos, se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 min. Posteriormente, se midió la absorbancia y los resultados finales se expresaron como □g Trolox g/ps.

Elaboración de pan de trigo utilizando masa fermentada de chía

Masa de chía preparada a partir de *L. plantarum* C8 se utilizó para la producción de pan de trigo (CS-WB). Las diferentes formulaciones se muestran en la **Tabla 1**. Pan tradicional de harina de trigo (WB) y pan de trigo con agregado de harina de chía sin fermentar (CF-WB) fueron fabricados y utilizados como controles. La levadura comercial *S. cerevisiae* (Calsa, levadura Company Argentina S.A.) se utilizó como agente de fermentación para todas las masas (7 log ufc/g de masa). Se empleó el siguiente programa de elaboración: mezcla de los ingredientes durante 10 minutos (primero 2 minutos a velocidad lenta y 8 min a mayor velocidad). Las masas se colocaron individualmente en bandejas de aluminio y fermentaron a 30 ± 1°C y 85% de humedad relativa durante 60 min. Después de la fermentación, las masas se cocieron en horno eléctrico (180ºC durante 20 min), y las piezas de pan se enfriaron a temperatura ambiente durante 120 min para luego ser envasados en bolsas de polietileno y almacenados a 25ºC.

Tabla 1. Formulaciones de los diferentes panificados

Ingredientes (% base seca)	WB	CF-WB	CS-WB
Harina de trigo	100	80	80
Harina de chia	-	20	0
Masa ácida de chía		-	40
NaCl	2	2	2
S. cerevisiae	3	3	3
Agua	55	55	35

WB: Pan de trigo; CF-WB: Pan de trigo con harina de trigo sin fermentar; CS-WB: Pan de trigo con masa de chía fermentada. La relación trigo:chía fue 4:1 en ambas formulaciones.

Evaluación de parámetros de calidad tecnológica

En los panificados elaborados se evaluaron los siguientes parámetros tecnológicos:

a) Volumen específico: Se efectuó el análisis de volumen especifico siguiendo la técnica de desplazamiento de semillas de colza; la cual consiste en colocar una cantidad medida de semillas en un recipiente cilíndrico; medir la altura inicial, luego introducir la pieza de pan, agregar nuevamente las semillas de colza y medir nuevamente la altura final. El volumen específico se calculó con la siguiente fórmula: Vesp= (π x r2 x D)/P, (donde; D: diferencia de altura, r: radio de recipiente, P: peso del pan).

c) Análisis instrumental de textura

Se realizó análisis de perfil instrumental de textura (TPA) empleando el texturómetro TAXT Plus (Stable Micro Systems, UK) aplicando compresión uniaxial en dos ciclos con 5 segundos de intervalo hasta un 50% de deformación con la sonda SMS P/20 a una velocidad de 5 mm/s. Las mediciones de realizaron de acuerdo con el método 74-10 de la AACC (2000), con algunas modificaciones; para ello se cortó una

rebanada del centro de cada pan de 2 cm de espesor en la que se determinaron los siguientes parámetros: dureza, masticabilidad y cohesividad.

Análisis de los datos

Todas las mediciones se llevaron a cabo por lo menos en tres ensayos independientes y los resultados obtenidos se informaron como valores medios con sus respectivas desviaciones estándar. El análisis de la varianza (ANOVA) y post pruebas de LSD de Fisher se realizaron con InfoStat 2014, InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. http://www.infostat.com.ar URL. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con un nivel de significación de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis proximal de harina de chía y trigo

Con el fin de caracterizar la materia prima utilizada en este trabajo, se determinó la composición proximal de la harina de chía y trigo. El contenido de proteínas (25,08 ± 2,1%), cenizas (6,75 ± 0,22 %) y grasas (19,41 ± 1,5 %) registrados en harina de chía fueron más elevados que los obtenidos en harina de trigo (14,59 ± 1,11; 0,73 ± 0,32 y 1,63 ± 0,12 %, respectivamente). Estos resultados son coincidentes con lo reportado en la literatura (Pizarro et al., 2013). El alto porcentaje de lípidos se debe a que las semillas de chía poseen un 60-70% de ácido linolénico (Ixtaina, Nolasco, y Tomás, 2008), cuyo consumo es benéfico para salud humana (Reyes-Caudillo et al., 2008). Estos datos indican que la adición de harina de chía a panes de trigo podría mejorar su contenido de proteínas y grasas. Además, el alto contenido de cenizas en la harina de chía podría complementar la harina de trigo (con bajo contenido de minerales) para satisfacer las necesidades diarias de los distintos elementos.

Aislamiento y selección de bacterias lácticas de masas fermentadas de chía

A partir de masas fermentadas de harina de chía se aislaron cepas autóctonas, de las cuales 50 cepas (33 cocos y 17 lactobacilos) fueron gram-positivos, catalasa-negativa, no móviles y capaces de acidificar el caldo MRS. Frecuentemente, los lactobacilos son seleccionados como cultivos iniciadores para masas fermentadas principalmente por sus propiedades de competitividad y adaptación a este entorno particular. Así, se continuaron los estudios en masa madre de chía inoculadas individualmente con los 17 lactobacilos. Las 17 cepas fueron capaces de disminuir el pH (pH inicial= 6,30 ± 0,10), observándose valores de ΔpH (diferencia entre el pH antes y después de la fermentación) entre 1,5 ± 0,05 a 2,0 ± 0,1. Luego de la fermentación también se observó un incremento (2-3 veces) en la concentración de aminoácidos libres totales dependiendo de la cepa láctica inoculada. Los mejores resultados (ΔpH= 2.0 y concentración total de aminoácidos libres 28.3 ± 1.1 □M/g de masa) se obtuvieron en masas fermentadas por la cepa C8, por lo tanto, posteriormente esta cepa fue identificada bioquímica y genotípicamente como *L. plantarum* C8.

Producción de masa madre de chía inoculada con L. plantarum C8

La harina de chía fue fermentada por *L. plantarum* C8 para obtener una masa madre. Después de 24 h de fermentación, se observó un incremento en el recuento celular (9,25 ufc/g) y un descenso del pH de las masas (4,30). Esta disminución del pH se debió a la producción de ácidos orgánicos, observándose un aumento gradual de ácido láctico durante la fermentación hasta alcanzar un valor de 12,30 g/kg de masa después de 24 h (**Figura 1**).

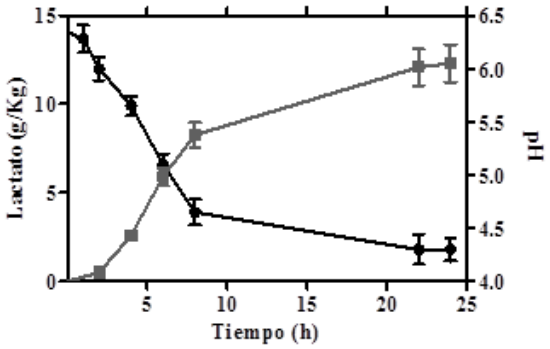


Figura 1. Concentración de ácido láctico (■) y valores de pH (●) en masa de chía inoculada con la cepa *L. plantarum* C8

Además, se detectó ácido acético (1,02 g/kg de masa) y fenil-láctico (PLA: 23,8 g/Kg de masa) en las masas fermentadas de chía. El PLA es un ácido orgánico producido por algunas cepas de BAL y es un agente antimicrobiano capaz de prevenir el deterioro fúngico (Gerez et al., 2010). Al final de la fermentación el valor del coeficiente de fermentación, dado por la relación ácido láctico/ácido acético ácidos, fue 12,06. Este valor está en el rango de los reportados previamente en masas fermentadas de quinua y centeno (Banu y Aprodu, 2012; Rizzello et al., 2016)

Pruebas oscilatorias de masas madre de chía C8

Las características viscoelásticas de las masas madre de chía fermentadas con la cepa C8 fueron evaluadas. La **Figura 2** muestra los barridos de frecuencia de la masa madre chía al principio y al final de la fermentación. Las pruebas de barrido de frecuencia oscilatoria en el dominio viscoelástico lineal indicaron que los módulos de almacenamiento, pérdida y complejo tuvieron una tendencia creciente durante todo el dominio de frecuencia observándose un comportamiento similar al sólido (G '> G' ') en ambas muestras estudiadas. G * mostró diferencias entre las muestras; la masa madre sin fermentar mostró los valores más altos a 1 Hz de frecuencia (9149 ± 819 Pa), mientras que después de 24 h de fermentación alcanzó un valor de 6902 ± 420 Pa. El análisis del espectro permitió inferir que la fermentación láctica de chía produjo una pérdida de consistencia y un aumento en el carácter viscoso. Similares resultados fueron reportados en masas de amaranto y trigo sarraceno fermentadas con diferentes cepas *lácticas* (Houben, Götz , Mitzscherling, y Becker, 2010; Moroni, Dal Bello, Zannini, y Arendt, 2011). Estos cambios reológicos podrían atribuirse en parte a la actividad proteolítica observada en la masa de chía después de la fermentación por la cepa C8. En otros estudios, la actividad proteolítica de cepas lácticas fue reportada como la causante de cambios reológicos en masas de trigo y centeno (Clarke et al, 2004; Thiele et al, 2002). Por otro lado, acidificación de las masas también puede producir cambios en el comportamiento reológico. Sin embargo, algunos autores mostraron que masas acidificadas químicamente (trigo, amaranto, entre otros) tuvieron un comportamiento opuesto (masas más elásticas) probablemente porque la acidificación fue instantánea y no progresiva como en la fermentación de masa madre (Houben et al, 2010; Katina, 2005).

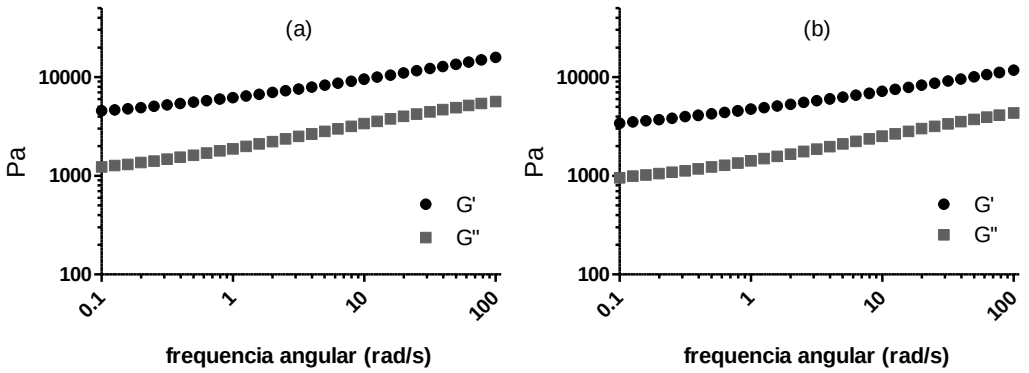


Figura 2. Módulo de almacenamiento (G') y módulo de pérdida (G") en función de frecuencia angular para masa madre de chía al principio (a) y final (b) de la fermentación.

Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de masas madre de chía C8

La presencia de compuestos fenólicos (CF) en la dieta es beneficioso para la salud, principalmente debido a su actividad antioxidante (Hoyo et al., 2012; Reyes-Caudillo et al., 2008). El contenido de CF totales de las masas madre de chía C8 se muestran en la **Tabla 2**. Se observó que luego de 24 h de fermentación el contenido de CF incrementó significativamente (1490 a 2080 mg AG/100 g de masa). Posteriormente, se identificó el perfil de CF mediante electroforesis capilar en las masas de chía fermentadas y no fermentados (**Figura 4**). La fermentación láctica modifico el contenido y el perfil de CF de las masas madre de chía (tiempo 0 y 24 h de fermentación) como se observó en los electroferogramas. Catorce picos del eletroferograma se modificaron durante la fermentación láctica, nueve de ellos aumentaron su concentración y cinco mostraron el comportamiento opuesto. Todos los CF reportados anteriormente en productos de chía (Capitani et al., 2013; Reyes-Caudillo et al, 2008) fueron usados como estándares para la identificación (ver Materiales y métodos). Sin embargo, solamente los ácidos ferúlico y clorogénico se identificaron en los extractos metanólicos de masa de chía (**Figura 4**). El ácido clorogénico solamente se evidenció después de la fermentación láctica (2,52 x 10^3 mg/ kg), mientras que el ácido ferúlico fue detectado desde el principio de la fermentación, siendo un 32% superior en masa fermentada 24 h.

Algunos autores reportaron que la fermentación láctica de centeno, cebada, avena y otros vegetales (por ejemplo, los pepinos, repollos, aceitunas, zanahorias, judías verdes, calabacines, alcachofas, alcaparras y berenjenas) incrementó el contenido de CF (Hole et al., 2012; Hoyo et al., 2012; Katina et al., 2007). Cepas de *L. plantarum* se aíslan con mayor frecuencia en vegetales fermentados, y su capacidad para metabolizar el CF ha sido ampliamente reportada (Curiel et al., 2010; Rodríguez et al., 2009). Durante la fermentación de harinas de cereales, enzimas microbianas tales como decarboxilasas, reductasas, esterasas y/o glicosidasas y enzimas endógenas de la harina (que se activan por el descenso de pH) incrementan el contenido total de compuestos fenólicos (Nionelli et al., 2014; Rodríguez et al., 2009).

La actividad antioxidante de masas madre de chía también fue evaluada mediante dos métodos complementarios, DPPH y FRAP (**Tabla 2**). Como se observa en la **Figura 3**, el efecto antiradicalario del extracto de masas de chia sobre DPPH mostró cinética de primer orden, siendo la masa fermentada la más afectiva. Así, se observa que la actividad antioxidante aumenta 33,33- 39,60% después de 24 h de fermentación. La actividad de la masa madre de chía, determinada por la eliminación de radicales DPPH (ARA y IC50), alcanzó un valor de 2,863%/g) al final del proceso de fermentación (IC50: 1,98 mg/ml), mientras que en masas sin fermentar el valor fue de 1732%/g(IC50: 3,08 mg/ml). Por método de FRAP se observó una tendencia similar. Otros autores también reportaron un aumento en la actividad antioxidante en masas madre preparadas a partir de diferentes harinas tales como centeno, trigo integral, entre otros respecto a las masas no fermentadas y, además, demostraron la capacidad de BAL para liberar

péptidos antioxidantes a través de la proteólisis de las proteínas de cereales nativas (Banu y Aprodu, 2012; Coda et al., 2014).

Tabla 2. Contenido de fenoles totales y actividad antioxidante de masas y panes

Muestras	Contenido de fenoles totales (mg AG 100 g)	Actividad antioxidante		
		DPPH IC_{50} (mg/ml)	DPPH ARA (%/g)	FRAP □mg Trolox/g)
Masa ácida de chía				
0 h	1490 ± 50[a]	3.08 ± 3.7[a]	1732 ± 85[a]	14.11 ± 1.82[a]
24 h	2080 ± 90[b]	1.98 ± 5.5[b]	2863 ± 99[b]	21.13 ± 3.30[b]
WB	n.d.	72.11 ± 10.5[c]	58.33 ± 1.3[c]	0.47 ± 0.05[c]
CF-WB	63.47 ± 3.5[c]	16.27 ± 0.99[d]	277.77 ± 15[d]	2.84 ± 0.08[d]
CS-WB	113.38 ± 8.2[d]	12.07 ± 0.58[e]	366 ± 17[e]	3.75 ± 0.11[e]

WB: Pan de trigo; CF-WD: Pan de trigo con harina de trigo sin fermentar; CS-WD: Pan de trigo con masa de chía fermentada; n.d.: no detectado; GA: ácido gálico; DPPH: 1,1-Dipfenil-2-picril-hydrazilo; Trolox: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2- ácido carboxílico; FRAP: Ferric Reducing Ability of Plasma. Variables con el mismo superíndice en la misma columna no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

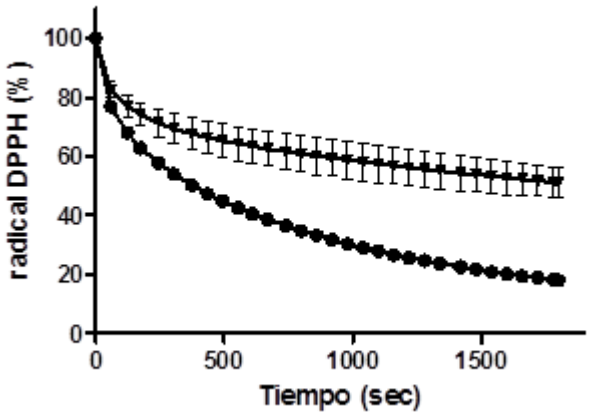
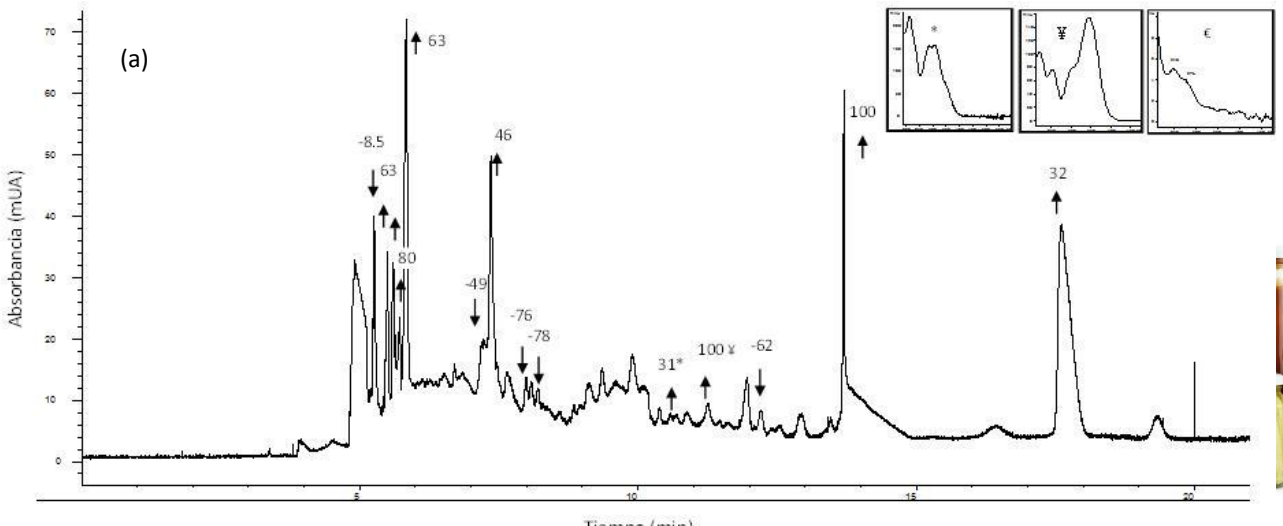


Figura 3. Ensayo de inhibición de DPPH para un extracto de masa ácida (3 mg/ml) a 0 h (círculos) y luego de 24 h de fermentación (triángulos).



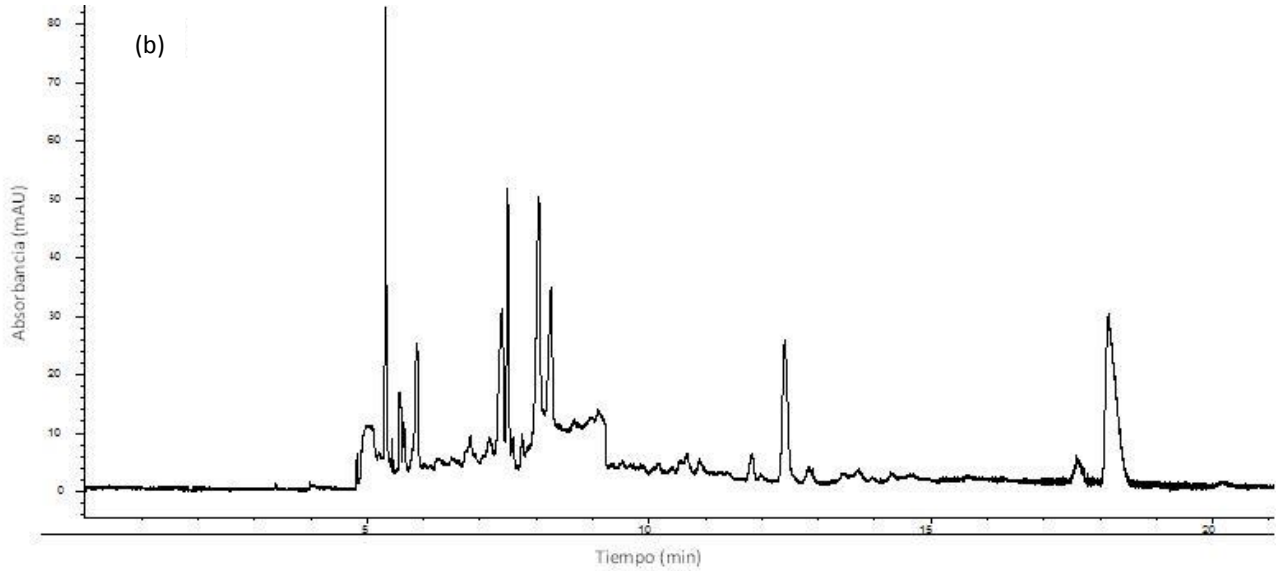


Figura 4. Electroferogramas de masa fermentada (a) y sin fermentar de chía (b). Cada flecha corresponde a los picos cuyas áreas fueron modificadas por efecto de la fermentación. * corresponde a ácido ferúlico, ¥ corresponde a ácido clorogénico y € corresponde a compuestos no identificados que sólo fueron detectados luego de la fermentación.

Evaluación de los panificados

Se utilizó masa fermentada de chía preparada a partir de *L. plantarum* C8 para la producción de pan de trigo (CS-WB). Panificados con y sin el agregado de harina de chía sin fermentar (CF-WB y WB, respectivamente) se utilizaron como controles. De acuerdo con los resultados anteriores, se encontró que el contenido de CF fue mayor (113,38 mg AG/100 g ps), en los panes CS-WB (**Tabla 2**). En coincidencia, la actividad antioxidante fue 1,3 veces mayor que la encontrada en los panes con harina sin fermentar y 7 veces mayor que los panes de trigo.

Los volúmenes específicos de los diferentes tipos de panes se muestran en la **Tabla 3**. La adición de harina o masa madre de chía reduce ligeramente el volumen específico de los panes respecto al pan de trigo. Coelho y de las Mercedes Salas-Mellado (2015), y Steffolani et al., (2015) han informado comportamientos similares en panes enriquecidos con 5-11% (p/p) de harina de chía. Como se ha informado, el agregado de chía disminuye la cantidad de gluten presente en la formulación y por lo tanto reduce la retención de burbujas de aire en la masa (Steffolani et al., 2015). Por otra parte, numerosos autores han reportado que el uso de masa madre de trigo es capaz tanto de reducir como incrementar el volumen de panes de trigo (Revisión Katina, 2005). Se ha propuesto que la influencia de masa fermentada en el volumen del pan se debe principalmente a reacciones enzimáticas que tienen lugar durante la fermentación. Con la disminución gradual del pH se produce la activación de enzimas amilolíticas y proteolíticas (entre otras) que conducen a modificaciones de componentes de la masa.

En el caso de firmeza de la miga y la masticabilidad, nuestros estudios indican que la adición tanto de harina como masa madre de chía redujo estos parámetros en comparación con los observados en panes de trigo. La disminución de la firmeza podría explicarse a partir del comportamiento reológico descripto anteriormente (**Figura 1**). En este sentido, Moroni et al. (2011) observaron una disminución en la masticabilidad y firmeza con bajos niveles de adición de masa fermentada en panes de alforfón.

La cohesión es un parámetro que está vinculado a la integración de los componentes de una muestra cuando se somete a una deformación. En ambos tipos de panes (CS-WB y CF-WB) se observó un significativo incremento en la cohesión respecto de los panes de trigo, sin diferencias significativas entre ellos.

Tabla 3. Efecto de la adición de harina de chía y de masa fermentada de chía en parámetros de calidad panaria

Muestras	Volumen específico (mL/g)	Análisis de perfil de textura		
		Firmeza (g)	Masticabilidad (g)	Cohesividad
WB	3.33 ± 0.23^{a}	1815 ± 66^{a}	1150 ± 139^{a}	0.84 ± 0.03^{a}
CF-WB	2.69 ± 0.30^{b}	1324 ± 225^{b}	1050 ± 280^{a}	1.31 ± 0.07^{b}
CS-WB	2.85 ± 0.19^{b}	966 ± 147^{c}	605 ± 80^{b}	1.25 ± 0.05^{b}

WB: Pan de trigo; CF-WD: Pan de trigo con harina de trigo sin fermentar; CS-WD: Pan de trigo con masa de chía fermentada. Variables con el mismo superíndice en la misma columna no presentan diferencias significativas ($P < 0.05$).

CONCLUSIONES

En los últimos años, la harina de chía ha sido estudiada por sus características nutricionales y funcionales. En este estudio se caracterizó masa de chía fermentada por una cepa seleccionada de *L. plantarum*. Después de 24 h de fermentación se observó pérdida de consistencia y un aumento en el carácter viscoso. Además, la concentración de compuestos fenólicos y actividad antioxidante incrementaron mediante la fermentación láctica. Por último, el uso de esta masa madre chía mejoró características globales, incluidas las propiedades físicas y antioxidantes respecto del uso de harina de chía sin fermentar e incluso mejores que los observados en el pan tradicional de trigo.

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez-Chávez LM, Valdivia-López MA, Aburto-Juarez ML, Tecante A. 2008. Chemical characterization of the lipid fraction of Mexican chia seed (*Salvia hispanica* L.). International Journal of Food Properties, 11(3), 687-697.

Banu I, Aprodu I. 2012. Studies concerning the use of *Lactobacillus helveticus* and *Kluyveromyces marxianus* for rye sourdough fermentation. European Food Research and Technology, 234(5), 769-777.

Bartkiene E, Juodeikiene G, Vidmantiene, D. 2012. Nutritional quality of fermented defatted soya and flaxseed flours and their effect on texture and sensory characteristics of wheat sourdough bread. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 63(6), 722-729.

Capitani MI, Ixtaina VY, Nolasco, SM, Tomás MC. 2013. Microstructure, chemical composition and mucilage exudation of chia (*Salvia hispanica* L.) nutlets from Argentina. Journal of the Science of Food and Agriculture, 93(15), 3856-3862.

Clarke CI, Schober TJ, Dockery P, O'Sullivan K, Arendt EK. 2004. Wheat sourdough fermentation: effects of time and acidification on fundamental rheological properties. Cereal Chemistry, 81(3), 409-417.

Coda R, Di Cagno R, Gobbetti M, Rizzello CG. 2014. Sourdough lactic acid bacteria: exploration of non-wheat cereal-based fermentation. Food Microbiology, 37, 51-58.

Coelho MS, de las Mercedes Salas-Mellado M. 2015. Effects of substituting chia (*Salvia hispanica* L.) flour or seeds for wheat flour on the quality of the bread. LWT-Food Science and Technology, 60(2), 729-736.

Curiel JA, Rodríguez H, Landete JM, de las Rivas B, Muñoz R. 2010. Ability of *Lactobacillus brevis* strains to degrade food phenolic acids. Food Chemistry, 120(1), 225-229.

Church FC, Porter DH, Catignani GL, Swaisgood HE. 1985. An o-phthalaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. Analytical Biochemistry, 146(2), 343-348.

Ezekiel R, Singh N, Sharma S, Kaur A. 2013. Beneficial phytochemicals in potato—a review. Food Research International, 50(2), 487-496.
Gerez C, Torino M, Obregozo M, Font de Valdez G. 2010. A ready-to-use antifungal starter culture improves the shelf life of packaged bread. Journal of Food Protection, 73(4), 758-762.
Hole AS, Rud I, Grimmer S, Sigl S, Narvhus J, Sahlstrøm S. 2012. Improved bioavailability of dietary phenolic acids in whole grain barley and oat groat following fermentation with probiotic *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, and *Lactobacillus reuteri*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(25), 6369-6375.
Houben A, Götz H, Mitzscherling M, Becker T. 2010. Modification of the rheological behavior of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) dough. Journal of Cereal Science, 51(3), 350-356.
Ixtaina VY, Nolasco SM, Tomás MC. 2008. Physical properties of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. Industrial Crops and Products, 28(3), 286-293.
Katina K. (2005). Sourdough: a tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread. VTT Technical Research Centre of Finland VTT Publications. 2005; 569: 13-41, 53-75.
Katina K, Liukkonen KH, Kaukovirta-Norja A, Adlercreutz H, Heinonen S-M, Lampi .-M, Poutanen K. 2007. Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. Journal of Cereal Science, 46(3), 348-355.
Mamhoud A, Nionelli L, Bouzaine T, Hamdi M, Gobbetti M, Rizzello CG. 2016. Selection of lactic acid bacteria isolated from Tunisian cereals and exploitation of the use as starters for sourdough fermentation. International Journal of Food Microbiology, 225:9-19.
Moreira R, Chenlo F, Torres M. 2013. Effect of chia (*Salvia hispanica* L.) and hydrocolloids on the rheology of gluten-free doughs based on chestnut flour. LWT-Food Science and Technology, 50(1), 160-166.
Moroni, AV, Dal Bello F, Zannini E, Arendt EK. 2011. Impact of sourdough on buckwheat flour, batter and bread: biochemical, rheological and textural insights. Journal of Cereal Science, 54(2), 195-202.

Nionelli L, Curri N, Curiel JA, Di Cagno R, Pontonio E, Cavoski I, Rizzello CG. 2014. Exploitation of Albanian wheat cultivars: characterization of the flours and lactic acid bacteria microbiota, and selection of starters for sourdough fermentation. Food Microbiology, 44, 96-107.
Pizarro PL, Almeida EL, Sammán NC, Chang YK. 2013. Evaluation of whole chia (*Salvia hispanica* L.) flour and hydrogenated vegetable fat in pound cake. LWT-Food Science and Technology, 54(1), 73-79.
Reyes-Caudillo E, Tecante A, & Valdivia-López M. 2008. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. Food Chemistry, 107(2), 656-663.
Rizzello CG, Lorusso A, Montemurro M, Gobbetti M. 2016. Use of sourdough made with quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour and autochthonous selected lactic acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread. Food Microbiology, 56, 1-13.
Rodríguez H, Curiel JA, Landete JM, de las Rivas B, de Felipe FL, Gómez-Cordovés C, Muñoz R. 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 132(2), 79-90.
Steffolani E, Martinez MM, León AE, Gómez M. 2015. Effect of pre-hydration of chia (*Salvia hispanica* L.), seeds and flour on the quality of wheat flour breads. LWT-Food Science and Technology, 61(2), 401-406.
Thiele C, Gänzle M, Vogel R. 2002. Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor. Cereal Chemistry, 79(1), 45-51.
Zanini VP, de Mishima BL, Solís V. 2011. An amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilized in laponite–chitosan hydrogel on a glassy carbon electrode. Application to the analysis of l-lactate in food samples. Sensors and Actuators B: Chemical, 155(1), 75-80.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada con subsidies otorgados por la Universidad de San Pablo-T (IC-502), Universidad Nacional de Santiago del Estero y CONICET (PIO-CONICET 14520140100005CO) y Secretaría de Ciencia y Tecnología (SECyT; PICT 393).

Análisis de las principales variables que afectan el crecimiento y consumo de lactosa de*Kluyveromyces marxianus*

Ceruti R.J.1, Eluk D. (1), Nagel O.G. (1), Molina M.P. (2), Althaus R.L. (1)

(1) Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, R.P.L. Kreder 2805- (3080). Esperanza, Santa Fe, Argentina.
Dirección de e-mail: robertojul@hotmail.com

RESUMEN

Resulta de interés encontrar diferentes alternativas para el tratamiento del lactosuero, a fin de reducir el impacto ambiental de su descarte.Por ello, se propone a menudo el uso de *Kluyveromyces marxianus*,por su capacidad de utilizar lactosa como fuente de carbono,como una alternativa eficiente para el futuro tratamiento del lactosuero. En el presente trabajo se evaluó la influencia de las variables pH, temperatura y fuente nitrogenada sobre el crecimiento y la concentración de lactosa residual durante el crecimiento de*K. marxianus*, utilizando una matriz compuesta por lactosa (4%), extracto de levadura (0,5%) y fuente nitrogenada (2,5%). Se observó mayor consumo de lactosa y crecimiento celular paravalores de pH cercanos a la neutralidad. Se verificó también un mayor crecimiento a valores más elevados de temperatura (40°C), mientras que no se observó efecto significativo de las diferentes fuentes nitrogenadas sobre el crecimiento celular,aunque el consumo de lactosa fue mayor cuando se utilizó peptona de caseína o triptona de soja. Los resultados obtenidos establecen condiciones de referencia (pH=6,5, T=40°C, peptona de caseína o triptona de soja) para una futura optimizaciónen un biorreactor, a fin de maximizar la producción de biomasa y el consumo de lactosa por parte de *K. marxianus*.

Palabras Clave: *Kluyveromyces marxianus*, consumo de lactosa, crecimiento celular, variables operativas

ABSTRACT

There is an increasing interest in different alternatives for cheese whey treatment, aimed at reducing the impact of its disposal to the environment. Due to lactose utilization as carbon source and other growth characteristics, the yeast *Kluyveromyces marxianus* has been proposed as an efficient alternative for whey treatment. In the present work, the influence of pH, temperature and nitrogen source on cellular growth of *Kluyveromyces marxianus*and residual lactose concentration was studied, using a matrix containing lactose (4%), yeast extract (0,5%) and a nitrogen source (2,5%). Higher lactose consumption and cellular growth was observed at pH values near neutrality. High temperature values (40°C) also increased yeast growth, and nitrogen source type showed no effect on this quantity, but caused lower residual lactose values when casein peptone or soy tryptone were used. The results obtained in this work may be a starting point for future optimization in a bioreactor, aimed at maximizing biomass production and lactose consumption by *K. marxianus*.

Keywords:*Kluyveromyces marxianus*, lactose consumption, cellular growth, operational variables

INTRODUCCIÓN

El descarte del lactosuero sin la aplicación previa de tratamientos depurativos constituye una fuente muy importante de contaminación ambiental, debido a los grandes volúmenes que se producen y su alta carga orgánica. La mayor parte de la demanda bioquímica y química de oxígeno (BOD, COD) del lactosuero se debe a la lactosa (Koutinas et

al. 2009). Por ello, el excedente de lactosuero constituye un desafío para la industria, y debe ser consideradocomo un recurso más que como un desecho (Guimarães et al. 2010).
La disponibilidad de lactosa y la presencia de otros nutrientes esenciales para el crecimiento de microorganismos hacen del lactosuero un sustratoadecuado para el crecimiento de levaduras. Por ello, algunos autores sugieren utilizar este material como base para la producción de biomasa microbiana por su buen valor nutritivo (Panesar et al. 2008, Guimarães et al. 2010).Entre las especies de levaduras que poseen la capacidad de asimilar lactosa, *Kluyveromyces marxianus* es muy utilizada por su elevada tasa de crecimiento, alta capacidad de secreción proteica, posibilidad deobtener energía del medio por respiración o fermentación, y termotolerancia (todas las cepas pueden crecer a temperaturas de 44°C) (Morrisey et al. 2015).Debido a sus características particulares, diversas investigaciones han propuesto a *K. marxianus*como una alternativa eficiente para el tratamiento del lactosuero (Fonseca et al. 2008). Sin embargo, existen notorias discrepancias en estos trabajos con respecto a cuáles son las mejores condiciones para el crecimiento y la utilización de lactosa por parte de *K. marxianus*. Así,Aktaş et al. (2006) establecenun consumo máximo de lactosa a 35°C y pH=6,0, mientras otros autores optimizan el crecimiento celular, proponiendocondiciones diferentes, con temperaturas cercanas a 31°C y valores de pH más próximos a 5,0 (Moresi et al. 1980, Belem y Lee, 1999).Por su parte, Rech et al. (1999) reportan el mayor crecimiento de la levadura a una temperatura de 37°C y un pH de 5,5. En cuanto a la fuente nitrogenadaadicionada para lograr el crecimiento de *K. marxianus*, se debe destacar que son muy variadas en la bibliografía, incluyendo fuentes complejas como proteínas del lactosuero solas (Revillion et al. 2003) o suplementadas con extracto de levadura y sales de amonio(Belem y Lee 1999, Rech et al. 1999, Aktaş et al. 2006) oel uso de fuentes nitrogenadas más simples como peptonas, extracto de levadura y/o sales de amonio (Grubb y Mawson 1993, Yönten 2013).
Por todo ello, y en virtud de las discrepancias reportadas en la literatura consultada, el objetivo de este trabajo ha sido determinar las mejores condiciones de trabajo (temperatura, pH y fuente nitrogenada) para lograr una mayor producción de biomasa y menores valores de lactosa residual.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de los experimentos

Se realizaron experimentos a fin de evaluar la influencia delpH (5,0; 5,5; 6,0 y 6,5),temperatura (30, 37 y 40°C) y fuente nitrogenada (peptona de caseína, peptona de carne y triptona de soja) sobre el crecimiento celular y el consumo de lactosa por parte de*K. marxianus.* Para ello, se utilizó un medio base compuesto por 4g/100 ml de lactosa (Laboratorios Cicarelli, Argentina), 0,5 g/100 ml de extracto de levadura (Laboratorios Britania, Argentina) y 2,5 g/100 ml de fuente nitrogenada.
Los cultivos se realizaron en 10 frascos de vidrio de boro silicato de 100mL para evaluar los 4 valores de pH, 3 de temperatura y las 3 fuentes nitrogenadas diferentes, utilizando 50 mL de medio de cultivo en cada frasco. Se analizó la fermentación de *K. marxianus* durante un tiempo de 12hs, realizando agitaciones cada 1h y muestreos cada 2hs (0, 2, 4, 6, 8,10 y 12 horas de iniciado el cultivo) para evaluar el crecimiento celular y la concentración de lactosa residual relativa.En todos los casos el pH fue ajustado en cada muestreo mediante el agregado de NaOH 1N.
Para la activación de la levadura, se utilizó un medio base con una composición igualala empleada posteriormente en cada experimento. Se utilizó un volumen de inóculo correspondiente al 20% del volumen final. Previamente se estandarizó la concentración del inóculo a una densidad óptica DO = 1.200.

Crecimiento celular

El crecimiento celular se analizó a través de mediciones de Densidad Óptica (DO) a 620nm utilizando un espectrofotómetro Boeco Modelo S-20 Vis & S-22 UV/Vis (Hamburg, Germany). Para esto, se tomaron muestra de 2 mL de cada frasco (por duplicado) y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min. Luego, los sedimentos se re-suspendieron en igual volumen con solución fisiológica estéril y se determinaron

las absorbancias. Estas lecturas se convirtieron a peso seco a utilizando una curva de calibración previamente construida. Los resultados se expresan en términos de biomasa (g/L).

Concentración de lactosa residual

La cuantificación de la lactosa fue realizada mediante una técnica enzimática colorimétrica basada en la hidrólisis de lactosa a galactosa y glucosa, utilizando la enzima β-galactosidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, E.E.U.U.) y posterior determinación enzimática-colorimétrica de la glucosa obtenida conun kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina) en el que se produce un compuesto coloreado que se leyó a 505nm, utilizando un espectrofotómetro Boeco Modelo S-20 Vis & S-22 UV/Vis (Hamburg, Germany). Para interpretar los resultados en términos de consumo de lactosa, las lecturas de absorbancia en cada muestra y para cada tiempo fueron expresadas como lactosa residual (LR), cantidad adimensional definida como el cociente entre dicha lectura (L_t) y su valor inicial al comienzo de la fermentación (L_0), $LR = L_t/L_0$.

Análisis estadístico

Para evaluar los efectos de pH, temperatura y naturaleza de la fuente nitrogenada sobre el crecimiento celular y la concentración residual de lactosa, se utilizó la opción stepwise del modelo lineal general (GLM: General linear model) de segundo grado con interacción, que permite incluir en el modelo aquellas variables significativas ($p<0.05$). Para ello, se empleó el paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI (Statgraphics, 2009). El modelo matemático utilizado fue:

$$Yijk = \beta_0 + \beta_{1i}\,t + \beta_{2j}x_2 + \beta_{11i}\,t^2 + \beta_{22j}\,{x_2}^2 + \beta_{12ij}\,t * x_2 + \varepsilon_{ijk}$$

Siendo:Y: Variable dependiente (biomasa en g/L, o lactosa relativa residual),β_0: intercepto, t:tiempo (i= 6: 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas), x_2: efecto de temperatura (j=4), pH (j=3), o fuente nitrogenada(FN) en términos de variable dummy (j=3: FN= peptona de caseína: $X_{21}=0$ y $X_{22}=0$, FN= triptona de soja: $X_{21}=1$ y $X_{22}=0$ y peptona de carne: $X_{21}=0$ y $X_{22}=1$), β_{11j}: efecto cuadrático del tiempo, β_{22j}: efecto cuadrático del pH (o temperatura), β_{12ij}: interacción del tiempo con pH (o temperatura o fuente nitrogenada),ε_{ijk}: error residual aleatorio del modelo.

Además, se calculó el coeficiente de regresión cuadrático ajustado como parámetro del ajuste logrado con el modelo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** se exponen las ecuaciones matemáticas calculadas mediante el Modelo Lineal General para los efectos de pH, temperatura y fuente nitrogenada (FN) sobre el crecimiento celular y concentración de lactosa residual relativa. Como puede apreciarse, los coeficientes porcentuales de regresión ajustados (R_{aj}^2) resultaron en todos los casos mayores a 87%, indicando de esta manera que hubo un adecuado nivel de ajuste de los datos experimentales a los modelos propuestos.

Tabla 1: Modelos que representan los efectos de pH, temperatura y fuente nitrogenada sobre el crecimiento celular de *K. marxianus* y la concentración residual de lactosa

Variable	$Y = \beta_0 + \beta_1 t + \beta_{11} t^2 + \beta_2 X + \beta_{22} X^2 + \beta_{12} t*X$	R_{aj}^2
Crecimiento celular		
pH	$Y = 0{,}2772 - 0{,}2773\ t + 0{,}0026\ t^2 - 0{,}0066\ pH^2 + 0{,}0515\ t*pH$	97.36
Temperatura (T)	$Y = 0{,}0519 - 0{,}0700\ t + 0{,}0027\ t^2 + 0{,}0027\ t*T$	98.43
Fuente Nitrogenada	$Y = 0{,}0482 + 0{,}0312\ t + 0{,}0044\ t^2$	98.52
Lactosa residual relativa		
pH	$Y = 1{,}044 - 0{,}0508\ t + 0{,}0041\ t^2 - 0{,}0065139\ t*pH$	89.13
Temperatura (T)	$Y = 1{,}041 - 0{,}0853\ t + 0{,}0037\ t^2$	87.79
Fuente Nitrogenada	$Y = 1{,}035 - 0{,}0351t - 0.0019*X_{21}*\ t + 0.0067\ *X_{22}*t$	95,52

R_{aj}^2. Coeficiente porcentual de regresión ajustado, X. variable independiente, Y. Variable dependiente (biomasa o lactosa residual relativa), X_{21}: triptona de soja, X_{22}. Peptona de carne.

Para todas las condiciones ensayadas se observó el crecimiento de *K. marxianus* en el medio de cultivo utilizado a lo largo de la experiencia (**Fig. 1A, 2A y 3A**), debido a la capacidad de esta levadura para utilizar lactosa como fuente de carbono. Se observó de esta manera que el crecimiento de la levadura acompañó a una disminución en la concentración de lactosa residual (**Fig. 1B, 2B y 3B**). El hecho que el crecimiento de la levadura se haya producido a lo largo de cada experimento pone de manifiesto que la levadura se encuentra en fase cuadrática ($\beta_{11}>0$) y aún no ha comenzado la fase estacionaria de crecimiento. Esto último coincide con lo observado en trabajos anteriores, donde se ha reportado una fase de crecimiento exponencial con una duración mayor del tiempo de cultivo (20 hs) en condiciones aeróbicas (Beausejour et al. 1981, Belem y Lee 1999) y 14 hs en condiciones de anaerobiosis (Zafar y Owais, 2006).

Con respecto al efecto delpH, los resultados indican que valores más bajos (5,0; 5,5) disminuyeron de manera significativa ($p<0{,}05$) el crecimiento de la levadura en comparación con valores cercanos a la neutralidad (pH 6,0 o 6,5) (**Fig. 1A**). Pudo observarse también un consumo de lactosa significativamente mayor ($p<0{,}05$) a valores más altos de pH (**Fig. 1B**). En forma similar,Aktaş et al. (2006)destacan un mayor consumo de lactosa a pH 6,0 por parte de *K. marxianus* cuando estudian un rango de pH comprendido entre 3,0 y 6,0.

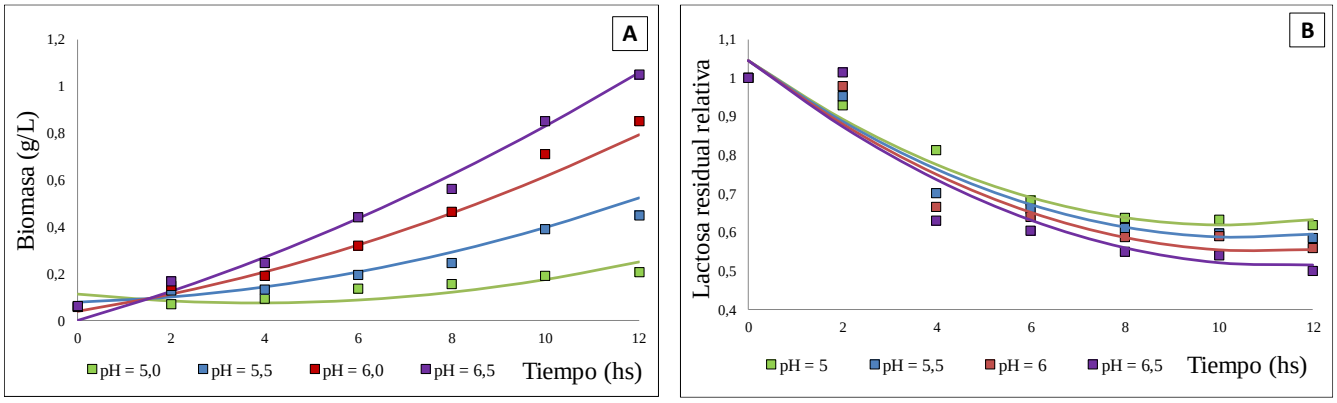


Figura 1. Efecto del pH sobre los valores de biomasa (**A**) y lactosa residual relativa (**B**) en cultivos de *K. marxianus*a 37°C y fortificado con peptona de caseína como fuente nitrogenada

Con respecto a la temperatura, se debe destacar que los mayores crecimientos celulares ($p<0,05$) se obtuvieron a temperaturasmás elevadas (37°C y 40°C) en comparación con unatemperatura menor (30°C), según se muestra en la ecuación de **Tabla 1** y **Fig. 2A**, mientras que esta variable no afectó al consumo de lactosa ($p>0,05$), **Fig. 2B**. Numerosos autores señalan que el crecimiento celular y el consumo de lactosa resultan óptimos a temperaturas comprendidas entre 30 y 37°C (Belem y Lee1999, Aktaş et al. 2006, Diniz et al. 2014) en experimentos que emplearon diferentes condiciones de cultivo y fuentes nitrogenadas, aunque no debe descartarse la posibilidad de llevar a cabo futuras investigaciones a mayores temperaturas debido a la termotolerancia de *K. marxianus* puesto que pueden crecer a temperaturas mayores a 40°C (Lane y Morrisey 2010).

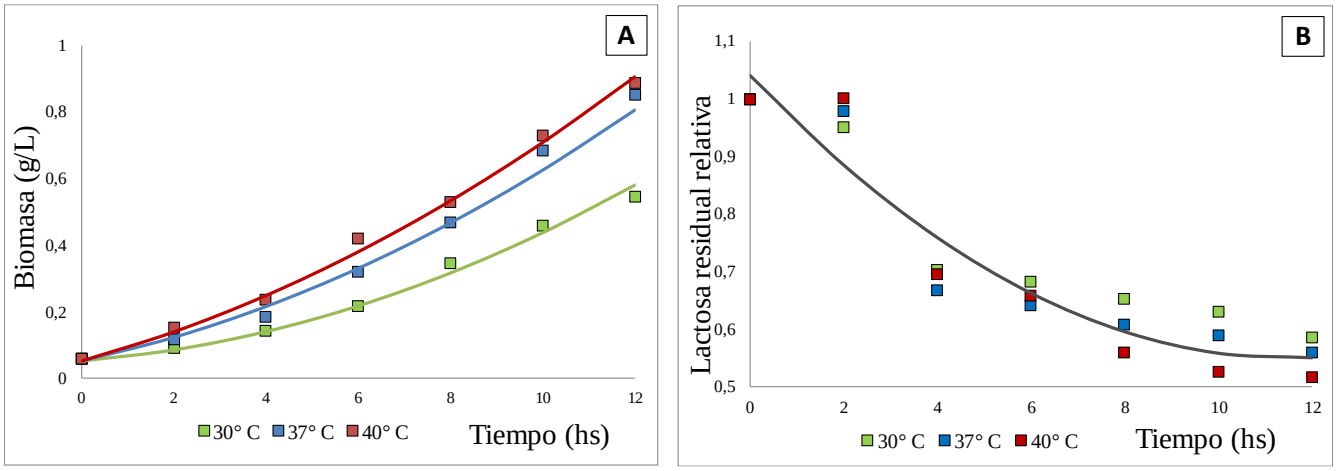


Figura 2. Efecto de la temperatura sobre los valores de biomasa (**A**) y lactosa residual relativa (**B**) en cultivos de *K. marxianus* a pH 6,0 y fortificado con peptona de caseína como fuente nitrogenada

En cuanto a las diferentes fuentes nitrogenadas empleadas en este trabajo, no se observó efecto significativo ($p> 0,05$) sobre el crecimiento celular (**Fig. 3A**), mientras que el mayor consumo de lactosa se obtuvo cuando se adiciona peptona de caseína o triptona de soja en comparación con la peptona de carne (**Fig. 3B**).

Con respecto al consumo de lactosa, es de destacar que las muestras (con un nivel de lactosa inicial en las muestras del 4%, cercano al que suele encontrarse en el lactosuero, De Jesús et al. 2015) experimentaron un consumo del 50% transcurridas 12 h de incubación cuando se utiliza peptona de caseína como fuente nitrogenada a pH 6,5 y 37°C. Belem y Lee (1999) obtienen un consumo de cerca del 70% a las 12 h en condiciones de aerobiosis en un biorreactor tipo batch.En forma similar, Aktaş et al. 2006 logran que se consuma prácticamente la totalidad de la lactosa inicial, para algunas de las condiciones ensayadas y también con una elevada oxigenación del medio. Estos resultados resultan alentadores para estudios futuros donde las variables temperatura y pH sean un punto de partida, y donde se incluya otras variables tales como oxigenación yvelocidad de agitación, con el propósito de incrementar la producción celular y el consumo de lactosa. Es de esperar que con un adecuado nivel de oxigenación se logre una elevada remoción de la lactosa en el medio, debido a que*K. marxianus* tiene mejores niveles de crecimientoen condiciones aeróbicas (Belem y Lee 1999, Silveira et al. 2005).

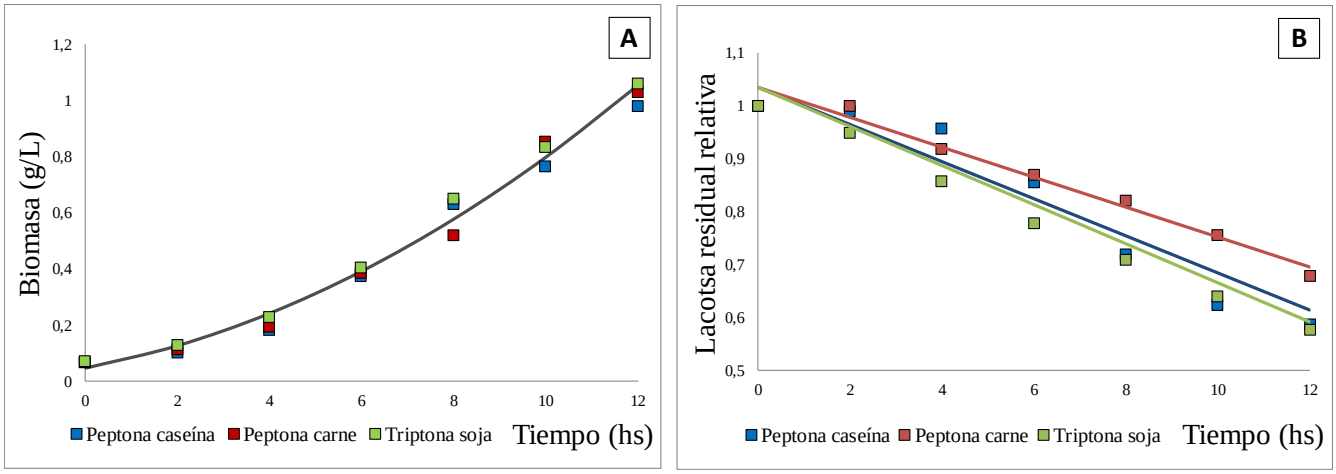


Figura 3. Efecto de la fuente nitrogenada (FN) sobre los valores de biomasa (**A**) y lactosa residual relativa (**B**) en cultivos de *K. marxianus* a pH 6,0 y 37°C.

CONCLUSIONES

En el presente estudio se observó que el crecimiento de *K. marxianus* se ve favorecido a temperaturas comprendidas entre 37 y 40°C y valores de pH cercanos a la neutralidad, mientras que el mayor consumo de lactosa se obtuvo a 37°C y pH 6,5 cuando se emplea triptona de soja o peptona de caseína como fuente nitrogenada, siendo en este caso que la lactosa residual relativa disminuyó un 50% en un tiempo de 12 horas. Sin embargo, se realizarán estudios futuros con el propósito de optimizar parámetros en un biorreactor, tales como oxigenación y velocidad de agitación para disminuir aún más esta concentración residual de lactosa, de modo tal de contribuir a estrategias para disminuir el impacto ambiental del efluente lactosuero mediante el tratamiento con *K. marxianus*.

BIBLIOGRAFÍA

Aktaş N, Boyacı İH, Mutlu M, Tanyolaç A 2006. Optimization of lactose utilization in deproteinated whey by *Kluyveromyces marxianus* using response surface methodology (RSM). Bioresource Technology, 97(18): 2252-2259.

Beausejour D, Leduy A, Ramalho RS 1981. Batch cultivation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey. The Canadian Journal of Chemical Engineering, 59(4): 522-526.

Belem MAF y Lee, BH 1999. Fed-batch fermentation to produce oligonucleotides from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey. Process biochemistry, 34(5): 501-509.

Diniz RH, Rodrigues MQ, Fietto LG, Passos FM, Silveira WB. 2014. Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by Kluyveromyces marxianus UFV-3. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 3(2): 111-117.

Fonseca GG, Heinzle E, Wittmann C, Gombert AK. 2008. The yeast Kluyveromyces marxianus and its biotechnological potential. Applied Microbiology and Biotechnology, 79(3): 339-354.

Grubb CF, & Mawson AJ. 1993. Effects of elevated solute concentrations on the fermentation of lactose by *Kluyveromyces marxianus* Y-113. Biotechnology letters, 15(6): 621-626.

Guimarães PM, Teixeira JA, Domingues L. 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. Biotechnology Advances, 8(3): 375-384.

Koutinas AA, Papapostolou H, Dimitrellou D, Kopsahelis N, Katechaki E, Bekatorou A, Bosnea LA. 2009. Whey valorisation: A complete and novel

technology development for dairy industry starter culture production.Bioresource Technology, 100(15): 3734-3739.
Lane MM, Morrissey JP. 2010. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. Fungal Biology Reviews, 24(1): 17-26.
Moresi M, Colicchio A, Sansovini F. 1980. Optimization of whey fermentation in a jar fermenter. European journal of applied microbiology and biotechnology, 9(3): 173-183.
Morrissey JP, Etschmann MM, Schrader J, Billerbeck GM. 2015. Cell factory applications of the yeast *Kluyveromyces marxianus* for the biotechnological production of natural flavour and fragrance molecules. Yeast, 32(1): 3-16.
Panesar PS. 2008. Production of β-D-Galactosidase from Whey Using *Kluyveromyces marxianus*. Research Journal of Microbiology, 3(1): 24-29.
Rech R, Cassini CF, Secchi A, Ayub, MAZ. 1999. Utilization of protein-hydrolyzed cheese whey for production of β-galactosidase by *Kluyveromyces marxianus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 23(2): 91-96.
Revillion JP, Brandelli A, Ayub, MAZ. 2003. Production of yeast extract from whey using *Kluyveromyces marxianus*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 46(1): 121-128.
Silveira WB, Passos FJV, Mantovani HC, Passos FML. 2005. Ethanol production from cheese whey permeate by Kluyveromyces marxianus UFV-3: a flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels. Enzyme and Microbial Technology, 36(7): 930-936.
Yönten V. 2013. Detecting optimum and cost-efficient of microbial growth rate and lactose consumption of *Kluyveromyces lactis* Y-8279 using RSM. Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures, 8(3): 1023-1035
Zafar S, Owais M 2006. Ethanol production from crude whey by *Kluyveromyces marxianus*. Biochemical engineering journal, 27(3): 295-298.

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen a la Universidad Nacional del Litoral y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el financiamiento recibido.

Diseño del fermento para quesos duros y su impacto en la maduración

Cuffia F (1), Wolf IV (1), Pozza L (1), Hynes ER (1), Bergamini CV (1), Perotti MC (1)

(1) Instituto de Lactología Industrial (INLAIN-UNL/CONICET), Facultad de Ingeniería Química - Santiago del Estero 2829, S3000AOM Santa Fe. Argentina.
Dirección de e-mail: cvberg@fiq.unl.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el impacto de la metodología de preparación de fermentos primarios y adjuntos (en suero - SF- y en caldo MRS), constituidos por las cepas *L. helveticus*(Lh209) y*L. paracasei* (Lp90) respectivamente, en la maduración de quesos duros. Cuatro tipos de quesos fueron elaborados: SF_{Lh209}; $SF_{Lh209+Lp90}$; MRS_{Lh209}; $MRS_{Lh209+Lp90}$. Se analizaron la composición fisicoquímica, la proteólisis y los perfiles de ácidos orgánicos y compuestos volátiles.Los quesos SF mostraron un mayor nivel de proteólisis secundaria (NS-PTA) y menor proteólisis primaria (NS-pH4,6) respecto a los quesos MRS. Además, la forma de preparación del fermento incidió en los niveles de acético y propiónico, y modificó el perfil de volátiles. La incorporación del adjunto disminuyó los niveles de ácido cítrico en todos los quesos, mientras que solamente en los quesos SF disminuyó el láctico e incrementó el propiónico; además, modificó el perfil de compuestos volátiles, sobre todo en los quesos MRS, e incrementó NS-PTA solamente en los quesos SF. Estos resultados reflejan la relevancia de la preparación del fermento (composición microbiana y medio de crecimiento) en los perfiles de maduración de los quesos.

Palabras claves. Preparación de fermentos, agregado de adjunto, quesos duros, maduración, volatiloma

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the impact of the methodology of primary and adjunct starters preparation (in whey – SF- and in MRS broth), composed by *L. helveticus* (Lh209) and *L. paracasei* (Lp90) strains, respectively, in the ripening of hard cheeses. For that, four types of cheeses were made: SF_{Lh209}; $SF_{Lh209+Lp90}$; MRS_{Lh209}; $MRS_{Lh209+Lp90}$. Gross composition, proteolysis and profiles of organic acids and volatile compounds were analyzed. SF cheeses showed a higher level of secondary proteolysis (NS-PTA) and lower level of primary proteolysis (NS-pH4.6) in comparison with MRS cheeses. The methodology of starter preparation had an impact on the levels of acetic and propionic acids, and modified the volatile compounds profile. The incorporation of adjunct culture decreased the levels of citric acid (in all cheeses), while it decreased lactic acid and increased propionic acid only in SF cheeses; in addition, Lp90 modified the volatile profiles, specially in MRS cheeses, and increased the levels of NS-PTA only on SF cheeses. These results reflect the relevance of the preparation of the starter cultures (microbial composition and growth media) in the ripening profiles of cheeses.

Keywords. starterpreparation, adjunct culture, hard cheeses, ripening, volatilome.

INTRODUCCIÓN

En la elaboración de quesos duros pueden utilizarse fermentos naturales de suero. Dado que su composición microbiana es indefinida, variable y puede estar influenciada por las condiciones medioambientales, la calidad de los quesos obtenidos es poco constante y las características sensoriales son variables. Como alternativa se pueden utilizar cepas de lactobacilos termófilos, ya sea como cultivos de adición directa a tina (congelados o liofilizados) o resuspendidas e incubadas en un medio de crecimiento. Dependiendo del medio que se utilice puede ser necesario realizar una acidificación química de la leche de elaboración con ácido láctico, ácido cítrico o □-gluconolactona (GDL) para regular la acidez que, en la tecnología tradicional, es aportada por el fermento de suero (Bottazzi et al. 1999, Candioti et al. 2002). Por otro lado, los procedimientos de crecimiento/incubación de la cepa antes de su incorporación a la leche de elaboración, pueden conducir a quesos con diferentes perfiles de maduración, por modificaciones en las actividades proteolíticas/peptidolíticas y lipolíticas que impactan finalmente en la formación de los compuestos aromáticos (Kieronczyk et al. 2004, Bergamini et al. 2009, De Angelis et al. 2010).

El rol principal del fermento primario es lograr la acidificación de la leche durante la elaboración del queso a través del metabolismo de la lactosa y la producción de ácido láctico; sin embargo, también puede contribuir al desarrollo de flavor en base a sus múltiples actividades enzimáticas (Klein et al. 2001, Tanous et al. 2002, Smit et al. 2005, Slattery et al. 2010). Por su parte, el uso de fermentos adjuntos persigue otros objetivos tales como el control de la microflora potencialmente perjudicial y el mejoramiento, intensificación o diversificación de las características sensoriales del producto (Crow et al. 2001). Un aspecto a tener en cuenta de la incorporación de fermentos adjuntos a una tecnología de queso específica consiste en analizar su efecto en asociación con el fermento primario utilizado.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la aptitud de una cepa de *L. helveticus* (Lh209) como fermento primario y de *L. paracasei* 90 (Lp90) como fermento adjunto, en la elaboración de quesos miniatura tipo Reggianito y su impacto en la maduración. Se analizó en particular la forma de preparación de los fermentos y la conveniencia de incluir o no el fermento adjunto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de los fermentos

Se emplearon dos metodologías de preparación de los fermentos: suero y caldo MRS. En el primer caso, dos porciones de 200 y 400 mL de suero (pH = 5,89±0,09; acidez = 20±2,0°D) se trataron a 85ºC por 15 min. Luego del enfriamiento a 37ºC ó 43°C, se inocularon (2% v/v) individualmente con las cepas de lactobacilos mesófilo y termófilo respectivamente, previamente repicadas e incubadas overnight en caldo MRS. Los sueros inoculados se incubaron durante 24 h a 37ºC ó 43°C, según corresponda, luego de lo cual se adicionaron (4% v/v) en la leche de elaboración, según se indica a continuación: **quesos SF_{Lh209}**: 200 mL de SF_{Lh209} + 200 mL de $SF_{estéril}$; **quesos $SF_{Lh209+Lp90}$**: 200 mL de SF_{Lh209} + 200 mL de SF_{Lp90}.

En la segunda metodología de preparación, se realizaron tres repiques overnight sucesivos de las cepas en caldo MRS, los dos primeros en 5 mL y el tercero en 50 mL. Las células fueron cosechadas por centrifugación (10000 *g*/10 min) a partir del último cultivo; el pellet resultante se lavó con buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7 y se resuspendió en 50 mL de leche estéril que se incorporaron a la leche de elaboración para alcanzar una concentración microbiana de 10^6 UFC/mL para Lh209 (**quesos MRS_{Lh209}** y **quesos $MRS_{Lh209+Lp90}$**) y de 10^7 UFC/mL para Lp90 (**quesos $MRS_{Lh209+Lp90}$**).

Elaboración de quesos

Cuatro tipos de quesos en los que se usaron Lh209 y Lp90 como fermentos primario y adjunto, respectivamente, rotulados como SF_{Lh209}; $SF_{Lh209+Lp90}$; MRS_{Lh209}; $MRS_{Lh209+Lp90}$, fueron elaborados con la metodología estándar de queso Reggianito adaptada a pequeña escala (Vélez, 2012). Dos réplicas de elaboración fueron realizadas en días diferentes.

La leche cruda (20 L) de gran mezcla se pasteurizó a 65ºC durante 20 min y se repartió en cuatro tinas a razón de 5 L en cada una. Cuando la leche alcanzó una temperatura de 33ºC, se adicionó $CaCl_2$(0,02% p/v). Se inoculó con el ó los fermento/s, según corresponda. En los quesos MRS, se adicionó además GDL (2g/L), para regular la acidez que en los quesos SF es aportada por el fermento. Se corroboró que el pH de la leche se encuentre en 6,2-6,3 al momento de la adición de la enzima coagulante (Chy-Max; Chr. Hansen Inc., Dinamarca), la cual se agregó a razón de 0,35% (v/v). Luego de 20 - 25 min se procedió al lirado de la cuajada hasta alcanzar un tamaño similar a la mitad de un grano de arroz. La mezcla se agitó suavemente y se calentó hasta 52ºC (1ºC/min). La cuajada se colocó en moldes, se prensó durante 12 h a temperatura ambiente y se saló por inmersión en salmuera (20% p/v, pH 5,4) durante 12 h a 12ºC. Los quesos obtenidos (aprox. 500 g) se envasaron al vacío cuando alcanzaron el nivel de humedad adecuado (< 36% p/p) y se maduraron a 12ºC y 80% de humedad relativa por 3 meses. A los 7, 45 y 90 días de maduración se realizaron recuentos microbiológicos y mediciones de pH; la composición global, proteólisis, perfiles de azúcares, ácidos orgánicos y compuestos volátiles se analizaron al final de la maduración.

Determinaciones analíticas

Composición fisicoquímica: el pH y la composición global (grasa, proteínas, sólidos totales) se analizaron con métodos normalizados (Bradley et al. 1993; ISO 5534:2004, ISO 3433:2008, ISO 8968: 2001).

Recuentos microbiológicos: El recuento de lactobacilos se realizó en MRS-ágar (Biokar Diagnostics, Francia). Las placas se incubaron 48 h a 43ºC y 37ºC para los lactobacilos termófilos y mesófilos, respectivamente.

Proteólisis: se analizó el contenido de nitrógeno soluble (NS) a pH 4,6, en ácido tricloroacético (TCA) al 12% y en ácido fosfotúngtico (PTA) al 2,5% según Gripon y col. (1975).

Perfiles de azúcares y ácidos orgánicos: se determinaron en los extractos ácidos de las muestras de queso (preparadas con H_2SO_4 0,01 M), mediante HPLC utilizando una columna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) con guardacolumna Aminex Cation-H (30 x 4,6 mm) (Bio-Rad Laboratories, Estados Unidos), termostatizados a 65ºC, empleando H_2SO_4 0,01 M como fase móvil (0,6 mL min^{-1}, isocrático). El detector UV (210 nm) se utilizó para la detección de los ácidos orgánicos y el IR para los azúcares.

Perfil de volátiles: se utilizó la metodología de microextracción en fase sólida (SPME) acoplado a un cromatógrafo gaseoso (GC) con detector de ionización de llama (FID) (Perkin Elmer, Estados Unidos) para aislar, separar y semi-cuantificar los compuestos. La desorción se efectuó térmicamente en el puerto de inyección durante 5 min a 250ºC, se utilizó una columna HP-INNOWAX (60mx0,25µmx0,25mm) (Agilent J&W, Estados Unidos) y el detector se mantuvo a 290ºC. Los picos fueron tentativamente identificados comparando sus tiempos de retención con los de compuestos estándares (Sigma Aldrich, Italia) inyectados bajo las mismas condiciones y se confirmaron por espectrometría de masas (GC Varian CP-3800 - MS Saturn 2000). Las áreas de los compuestos se expresaron en unidades arbitrarias.

Análisis estadístico

Se aplicó análisis de varianza de una vía con el propósito de detectar diferencias significativas y el test de Duncan para comparar las medias con un 95% de confianza. Se utilizó el software IBM SPSS Statistics 20.0 (SPSS Inc., Estados Unidos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición fisicoquímica

En las **Tablas 1** y **2** se presentan los resultados de composición global y pH para los distintos quesos.

No se encontraron diferencias (p>0,05) en los contenidos de humedad, proteínas y materia grasa al final de maduración, lo que indica que la forma de preparación de los fermentos y la presencia o ausencia de Lp 90 no impactó en la composición

de los quesos. La utilización de fermentos de suero produjo una disminución ($p<0,05$) de pH respecto a los fermentos preparados en MRS, mientras que la incorporación del cultivo adjunto no afectó el pH. En cuanto a la evolución del pH durante la maduración, los valores se mantuvieron estables en todos los quesos. En todos los casos los valores de pH estuvieron de acuerdo a los establecidos por la SAGPyA (Res. N°: 16/2008) para quesos Reggianito.

Tabla 1. Composición global de los quesos (g 100 g^{-1}) al final de la maduración (90d). (Valores promedio ± desviación estándar de dos réplicas de elaboración).

Quesos	Humedad	Grasa	Proteína
SF_{Lh209}	33,2±0,3	33,8±0,7	29,3±1,2
$SF_{Lh209+Lp90}$	32,1±1,0	32,7±0,7	30,2±0,1
MRS_{Lh209}	31,4±0,1	32,8±0,1	31,3±0,6
$MRS_{Lh209+Lp90}$	33,4±0,7	31,8±0,6	30,9±0,5

Tabla 2. Valores de pH de los quesos durante la maduración (Valores promedio ± desviación estándar de dos réplicas de elaboración)

Quesos	7 (d)	45 (d)	90 (d)
SF_{Lh209}	$4,98±0,04^{c}$	$4,97±0,01^{b}$	$4,98±0,01^{b}$
$SF_{Lh209+Lp90}$	$4,93±0,04^{c}$	$4,91±0,01^{b}$	$4,99±0,01^{b}$
MRS_{Lh209}	$5,43±0,04^{a}$	$5,23±0,13^{a}$	$5,18±0,11^{a}$
$MRS_{Lh209+Lp90}$	$5,10±0,01^{b}$	$5,15±0,06^{a}$	$5,25±0,05^{a}$

Diferentes superíndices en una misma columna indican la presencia de diferencias significativas ($p<0,05$).

Recuentos microbiológicos

La población de lactobacilos termófilos fue de aprox. 8,5 órdenes logarítmicos al inicio de maduración y decreció un orden a la mitad de dicho período, para luego mantenerse en esos niveles hacia los 90 d (**Figura 1**). Por su parte, la concentración de lactobacilos mesófilos estuvo entre 8 y 9 órdenes logarítmicos a los 7 d, se mantuvo en similares niveles hacia mediados de maduración y luego decreció ~ 2 órdenes logarítmicos hacia el final del período(**Figura 2**). Este hecho ha sido reportado en muchas variedades de quesos y se ha asociado a la exposición de los fermentos a las condiciones adversas presentes en la matriz casearia tales como la falta de nutrientes, el alto contenido de sales y el potencial redox negativo, entre otros, lo que puede involucrar la permeabilización/lisis celular y la liberación de enzimas que participan posteriormente en la maduración (Farkye 2000, Beresford et al. 2001). Si bien se observó una disminución de la población de lactobacilos mesófilos durante la maduración, los niveles fueron superiores a 6 órdenes logarítmicos lo que indica la buena adaptación de la cepa al medio ambiente del queso.

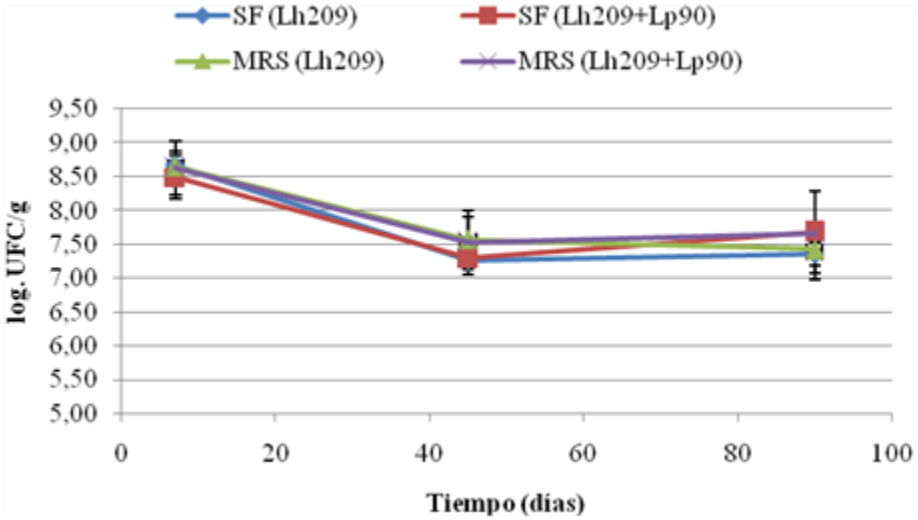


Figura 1. Evolución de la población de lactobacilos termófilos en los quesos durante la maduración.

Proteólisis

La evolución de la proteólisis mostró diferentes comportamientos según la metodología de preparación de los fermentos y la incorporación del adjunto (**Tabla 3**). Por un lado, los niveles de NS-4,6/NT fueron mayores ($p<0,05$) en los quesos preparados con los fermentos preparados en MRS, mientras que los niveles de NS-PTA/NT fueron superiores en los quesos elaborados con fermentos de suero ($p<0,05$). La presencia del adjunto mostró un efecto significativo en esta última fracción solamente cuando se lo incorporó en suero; los niveles en los quesos $SF_{Lh209+Lp90}$ fueron superiores ($p<0,05$) que en los otros quesos. Es de destacar que la incorporación de Lp 90 a quesos Pategrás y Cremosos, también produjo incrementos de la proteólisis (Milesi et al. 2009). Nuestros resultados indican que la expresión y actividad de las enzimas peptidolíticas de los fermentos utilizados fue influenciada por el medio de crecimiento (Jensen y Ardö, 2009, Pedersen et al. 2013).

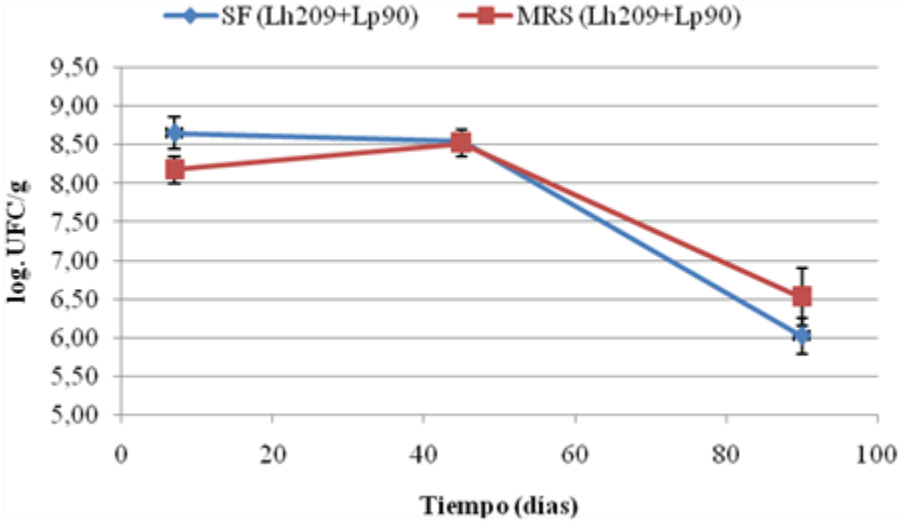


Figura 2. Evolución de la población de lactobacilos mesófilos en los quesos durante la maduración.

Tabla 3. Nitrógeno soluble a pH 4,6 (NS-4,6), en ácido tricloroacético (NS-TCA) y en ácido fosfotúngstico (NS-PTA), expresados como porcentaje de nitrógeno total (NT), y relación porcentual NS-TCA y NS-PTA en relación a NS-4,6 (%), en los quesos al final de la maduración (90 d) (Valores promedio y desviación estándar de dos réplicas de elaboración).

Quesos	NS-4,6/NT	NS-TCA/NT	NS-PTA/NT	NS-TCA/NS-4,6	NS-PTA/NS-4,6
SF_{Lh209}	11,8±0,3^{b}	10,2±0,4	5,6±0,1^{b}	86,4	47,5
$SF_{Lh209+Lp90}$	11,8±0,1^{b}	10,8±0,3	7,5±0,3^{a}	91,5	63,6
MRS_{Lh209}	15,5±0,3^{a}	10,9±0,3	3,9±0,4^{c}	70,3	25,2
$MRS_{Lh209+Lp90}$	14,4±0,3^{a}	11,0±0,4	4,6±0,4^{c}	76,4	31,9

Diferentes superíndices en una misma columna indican la presencia de diferencias significativas ($p<0,05$).

Perfiles de azúcares y de ácidos orgánicos

No se detectaron concentraciones significativas de lactosa, glucosa ni galactosa en ninguno de los quesos analizados. Este hecho no es sorprendente teniendo en cuenta que aprox. el 98% de la lactosa se pierde en el suero y el remanente es rápidamente metabolizado por la microbiota presente en la cuajada, que la glucosa es una de las principales fuentes de energía de las bacterias lácticas y se consume en las primeras horas de elaboración y que la galactosa puede ser metabolizada por la mayoría de las especies de lactobacilos (Fox et al. 1995, Beresford et al. 2001).

El láctico fue el ácido mayoritario en todos los quesos, de manera similar a lo reportado por otros autores (Califano y Bevilacqua 2000, Izco et al. 2002). Su concentración fue menor ($p<0,05$) en los quesos con la inclusión del adjunto y con los cultivos preparados en suero ($SF_{Lh209+Lp90}$). La presencia de Lp 90 produjo una disminución ($p<0,05$) en el contenido de ácido cítrico; este efecto fue más pronunciado en los quesos SF. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por otros autores (Lues y Botha 1998, Buffa et al. 2004), quienes detectaron un consumo de ácido cítrico en ausencia de azúcares fermentables por lactobacilos mesófilos presentes en el queso. Los niveles de acético fueron mayores ($p<0,05$) en los quesos elaborados con los fermentos preparados en MRS, mientras que un comportamiento inverso se observó para el ácido propiónico. El agregado de Lp90 no afectó los niveles de ácido acético, mientras que incrementó la concentración de ácido propiónico solamente en los quesos SF (**Tabla 4**).

Tabla 4. Concentración de ácidos orgánicos en los quesos (mg 100 g^{-1}) al final de la maduración (90d) (Valores promedio ± desviación estándar de dos réplicas de elaboración).

Quesos	Concentración (mg 100 g^{-1})			
	Ácido láctico	Ácido cítrico	Ácido acético	Ácido propiónico
SF_{Lh209}	1670,5±139,7[a]	76,5±9,6[a]	88,5±13,8[b]	282,6±24,1[b]
$SF_{Lh209+Lp90}$	1168,4±12,1[b]	8,9±0,5[c]	75,3±4,5[b]	373,7±15,4[a]
MRS_{Lh209}	1475,5±138,1[a]	87,5±9,6[a]	120,9±15,8[a]	176,7±3,7[c]
$MRS_{Lh209+Lp90}$	1464,1±15,3[a]	44,0±8,7[b]	122,3±5,7[a]	188,6±16,2[c]

Diferentes superíndices en una misma columna indican la presencia de diferencias significativas ($p<0,05$).

Perfil de compuestos volátiles

En la **Figura 3** se muestran los valores porcentuales de los distintos grupos químicos en los que se agruparon los compuestos volátiles identificados en los quesos.

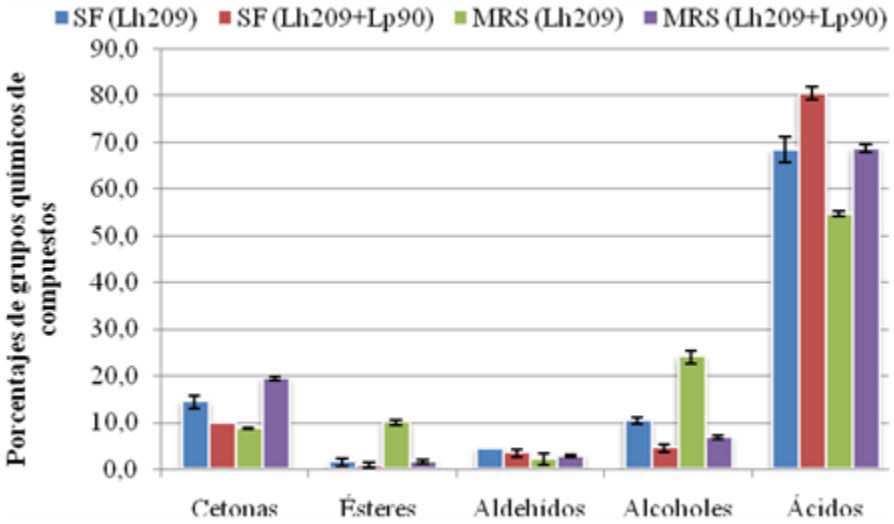


Figura 3. Perfiles de compuestos volátiles en los quesos al final de la maduración (Valores promedio y desviación estándar de dos réplicas de elaboración).

Globalmente, los ácidos fueron el grupo predominante en los cuatro tipos de quesos, mientras que el segundo grupo en importancia dependió del queso. La presencia del adjunto se puso de manifiesto en el incremento de los ácidos y la disminución de los alcoholes, para las dos formas de preparación de los fermentos.

En particular, en los quesos SF_{Lh209}los ácidos alcanzaron porcentajes en torno al 70%. Los compuestos mayoritarios fueron los ácidos de cadena lineal y número par de átomos de carbono (C2:0 a C12:0), específicamente los ácidos butírico, caproico y acético. También se identificaron ácidos de cadena lineal y número impar de átomos de carbono (C5 y C7) y de cadena ramificada (2-metil propanoico y 3-metil butanoico). Las cetonas y los alcoholes fueron los grupos que siguieron en abundancia, con valores promedios del 14% y 10%, respectivamente. Entre las cetonas se identificaron metilcetonas (propanona, butanona, 2-hexanona, 2-heptanona y 2-nonanona), dicetonas (diacetilo) e hidroxicetonas (acetoína), siendo las mayoritarias el diacetilo, acetoína y 2-heptanona. Entre los alcoholes se encontraron alcoholes primarios de cadena lineal (etanol, 1-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol y 1-heptanol), secundarios de cadena lineal (2-pentanol y 2-heptanol) y primarios de cadena ramificada (2-metil 1-propanol, 3-metil 1-butanol y 2-etil 1-hexanol); etanol, 1-pentanol y 2-heptanol fueron los que tuvieron las

áreas más altas. Los aldehídos alcanzaron porcentajes alrededor del 5%, identificándose aldehídos de cadena lineal (hexanal, heptanal y nonanal), de cadena ramificada (2- y 3-metil butanal) y aromáticos (benzaldehído); hexanal, heptanal, nonanal y 3-metil butanal fueron los más abundantes. Los ésteres fueron minoritarios (<2%), identificándose acetato, butanoato y hexanoato de etilo.

En los quesos $SF_{Lh209+ Lp90}$se identificaron los mismos compuestos que en los quesos sin el agregado del adjunto (SF_{Lh209}). Los ácidos representaron el 80% del área total, siendo butírico, hexanoico y acético los mayoritarios. De los restantes grupos de compuestos, las cetonas, alcoholes y aldehídos representaron el 10%, 5% y 4%, respectivamente; diacetilo, acetoína y 2-heptanona fueron las cetonas mayoritarias; etanol y 1-pentanol constituyeron el 50% del total de alcoholes; hexanal, heptanal, nonanal y 3-metilbutanal fueron los aldehídos con mayores valores de áreas. La comparación de los valores de áreas individuales de los compuestos entre los quesos elaborados con y sin la adición del adjunto mostró que Lp 90 incrementó ($p<0,05$) los niveles de acetoína, 2-etil 1-hexanol y los ácidos acético, butírico, hexanoico y octanoico.

En los quesos MRS_{Lh209} la fracción volátil se caracterizó por niveles elevados de ácidos (55%) y en menor medida alcoholes (24%), ésteres (10%) y cetonas (9%). Una menor prevalencia de los ácidos y una mayor incidencia de los restantes grupos de compuestos se observó en este tipo de quesos respecto a los elaborados con fermentos de suero. Los ácidos butírico y hexanoico fueron los mayoritarios. El etanol fue el alcohol más abundante seguido del 3-metil 1-butanol. Dentro de la familia de los ésteres y aldehídos, el butanoato de etilo y el benzaldehído, respectivamente, fueron los mayoritarios. La comparación de las áreas de los compuestos entre los quesos con Lh 209 en las dos formas de preparación reveló que en presencia de fermentos de suero se favoreció la producción ($p<0,05$) de propanona, diacetilo, 2-hexanona, 2-metil butanal, 3-metil butanal, hexanal, 1-pentanol, 2-heptanol, ácido acético y ácido 3-metil butanoico. Por el contrario, en quesos MRS_{Lh209} se detectaron mayores niveles ($p<0,05$) de 2-heptanona, 2-nonanona, ésteres etílicos, benzaldehído, 2-propanol, etanol, 1-propanol, 2-metil 1-propanol, 2-pentanol, 3-metil 1-butanol, ácido butírico y ácido hexanoico. Es de destacar que los mayores niveles de ésteres etílicos encontrados en estos quesos fueron coincidentes con los mayores valores de etanol y de los distintos ácidos, sustratos involucrados en la síntesis de estos compuestos.

En los quesos $MRS_{Lh209+ Lp 90}$, la presencia del adjunto produjo cambios en la fracción volátil de los quesos. Los ácidos continuaron siendo el grupo mayoritario pero los porcentajes calculados fueron superiores (70%) a los obtenidos en los quesos elaborados sólo con Lh209 (MRS_{Lh209}). Dentro de este grupo, los más abundantes fueron los ácidos butírico, hexanoico y acético. Resultados similares se encontraron cuando se analizaron los quesos $SF_{Lh209+ Lp 90}$. El segundo grupo en abundancia fueron las cetonas, con proporciones en torno al 20%; la acetoína, diacetilo y 2-heptanona resultaron mayoritarias. Los porcentajes de alcoholes, aldehídos y ésteres alcanzaron valores del 7%, 3% y 1,5%, respectivamente; se destacaron el etanol y el 1-pentanol; hexanal, heptanal y nonanal representaron porcentajes en torno al 80% del total de aldehídos. La comparación de los compuestos individuales entre los quesos preparados con y sin adición de Lp 90, mostró que la presencia del adjunto produjo incrementos ($p<0,05$) en los niveles de propanona, butanona, diacetilo, 2-hexanona, acetoína, 2-metil butanal, 3-metil butanal, 1-pentanol, 2-heptanol y ácido acético.

Los resultados obtenidos muestran la influencia de la forma de preparación de los fermentos en el perfil de compuestos volátiles, lo que sugiere un impacto del medio de crecimiento en las actividades enzimáticas implicadas en su formación (Jensen y Ardö 2009, Pedersen et al. 2013). Además, la incorporación de Lp90 produjo incrementos en algunos compuestos aromáticos de interés para este tipo de queso.

CONCLUSIONES

La incorporación de *L. paracasei* 90 como fermento adjunto en quesos duros de pasta cocida modificó el perfil de compuestos volátiles, impactando de manera positiva en varios de los compuestos característicos de esta variedad. Asimismo,

la metodología de preparación de los fermentos: cepas incubadas en suero y en MRS, también tuvo un efecto en estos perfiles que fue más notorio en los quesos sin fermento adjunto. Por otro lado, la adición de Lp 90 incrementó la proteólisis secundaria, en especial en los quesos cuyos fermentos se prepararon en suero. Es de destacar que la adición del adjunto y la forma de preparación de los fermentos no influyeron en el proceso de elaboración normal del queso Reggianito y que los productos obtenidos tuvieron características composicionales similares.

BIBLIOGRAFÍA

Beresford T, Fitzsimons N, Brennan N, Cogan T. 2001. Recent advances in cheese microbiology. International Dairy Journal, 11: 259-274.

Bergamini C, Hynes E, Palma SB, Sabbag N, Zalazar CA (2009). Proteolytic activity of three probiotic strains in semi-hard cheese as single and mixed cultures: *L. acidophilus*, *L. paracasei* and *B. lactis*. International Dairy Journal, 19: 467-475.

Bottazzi V, Battistotti B, Rebecchi A. 1999. Ambiente e microflora del latte: una relazione che cambia. Latte 24, 84-88.

Bradley R, Arnold E, Barbano D, Semerad R, Smith D, Vines B. 1993. Chemical and physical methods. En: Standard methods for the examination of dairy product. Cap. 15. Ed. Marshall, R. American Public Health Association (APHA), Washington, Estados Unidos. p 433-531.

Buffa M, Guamis B, Saldo J, Trujillo A. 2004. Changes in organic acids during ripening ofcheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. LWT-Food Science and Technology, 37: 247-253.

Candioti M, Hynes E, Quiberoni A, Palma S, Sabbag N, Zalazar C. 2002. Reggianito Argentino cheese: Influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. International Dairy Journal, 12: 923–931.

Califano A., Bevilacqua A. 2000. Multivariate Analysis of the Organic Acids Content of Gouda type Cheese during Ripening. Journal of food Compisition and Analysis,13: 949:960.

Crow V, Curry B, Hayes M. 2001. The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. International Dairy Journal, 11: 275-283.

De Angelis M, Calasso M, Di Cagno R, Siragusa S, Minervini F, Gobbetti M. 2010. NADP-glutamate dehydrogenase activity in nonstarter lactic acid bacteria: effects of temperature, pH and NaCl on enzyme activity and expression. Journal of Applied Microbiology, 109: 1763-1774.

Farkye N. 2000. Encyclopedia of Food Microbiology; Microbiology of cheese-making and maturation. Eds.: Robinson RK, Batt CA y Patel PD). Academic Press, Londres, Reino Unido, pág. 381–387.

Fox P, Singh T, McSweeney P. 1995. Biogenesis of flavour compounds in cheese. In: Chemistry of Structure/Function relationship in Cheese, pp 59-98. Malin EL and Tunick MH Eds. New York.

Gripon J, Desmazeaud M, Le Bars D, Bergère J. 1975. Etude du rôledes micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. –Influence de la présure commerciale. Le Lait, 55: 502-516.

ISO 5534:2004. Cheese and processed cheese - Determination of the total solids content.

ISO: 3433:2008. Cheese - Determination of fat content - Van Gulik method.

ISO 8968-1:2001 (IDF 20-1: 2001). Milk - Determination of nitrogen content - Part 1: Kjeldahl method.

Izco J, Tormo M, Jiménez-Flores R. 2002. Development of a CE method to analyze organic acids in dairy products: Application to study the metabolism of heat-shocked spores. Journal of Agricultural and Food Chemistry,50: 1765-1773.

Jensen M. and Ardö Y. 2009. A comparison of enzymatic activities of ***Lactobacillus helveticus*** and ***Lactobacillus casei*** strains with potential to improve ripening of low fat cheese. Poster session presented at NordForsk Symposium on Health Aspects of Cheese, Drøbak, Norway.

Kieronczyk A, Skeie S, Langsrud T, Le Bars D, Yvon M. 2004. The nature of aroma compounds produced in a cheese model by glutamate dehydrogenase positive *Lactobacillus* INF15D depends on its relative aminotransferase activities towards the different amino acids. International Dairy Journal, 14: 227-235.
Klein N, Maillard M, Thierry A, Lortal S. 2001. Conversion of amino acids into aroma compounds by cell-free extracts of *Lactobacillus helveticus*. Journal of Applied Microbiology, 91: 404-411.
Lues J, Botha W, Smit E. 1998. Ion-exchange HPLC analysis of a broad spectrum of organic acids from matured Cheddar cheese and assessment of extraction methods. Food Research International, 31: 441-447.
Milessi M, Vinderola G, Sabbag N, Meinardi C, Hynes E. 2009. Influence on cheese proteolysis and sensory characteristics of non-starter lactobacilli strains with probiotic potential. Food Research International, 42: 1186-1196.
Pedersen T, Ristagno D, McSweeney P, Vogensen F, Ardö Y. 2013. Potential impact on cheese flavour of heterofermentative bacteria from starter cultures. International Dairy Journal, 33: 112-119.
Smit G, Smit B, Engels W. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. FEMS Microbiology Reviews, 29: 591-610.
Tanous C, Kieronczyk A, Helinck S, Chambellon E, Yvon M. 2002. Glutamate dehydrogenase activity: a major criterion for the selection of flavour-producing lactic acid bacteria strains. Antonie van Leeuwenhoek,82: 271-278.
Velez A. (2012). Influencia de la actividad de las enzimas nativas de la leche: lipoproteína lipasa y plasmina en la lipólisis y la proteólisis de quesos duros de pasta cocida, Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral.

Validación de un cultivo iniciador para vinificaciones en tinto constituido por levaduras y bacterias lácticas patagónicas

Curilén YL (1,2), Maturano RC (1), Bravo SME (1,2), Carreño VA (2), Camacho E (2), Pereira D (2), Rivas GA (3), Delfederico L (3), Bravo Ferrada B (3), Semorile LC (3), Caballero AC (1,2)

(1) PROBIEN, CONICET-UNComahue
(2) Facultad de Ciencias y Tecnología de los Alimentos, UNComahue
(3) Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes. Argentina.
Dirección de e-mail: yolanda.curilen@facta.uncoma.edu.ar

RESUMEN

En las vinificaciones en tinto patagónicas la fermentación maloláctica (FML) es llevada a cabo espontáneamente por la biota indígena de bacterias lácticas (BAL) presentes en el mosto/vino. Con el fin de resolver paradas de esta fermentación observadas a escala industrial y ocasionadas por interacciones antagónicas entre las levaduras-BAL participantes del proceso, se pretende desarrollar un cultivo mixto constituido por cepas indígenas de Saccharomycescerevisiae (ScF8) y *Oenococcusoeni* (UNQOe31), de probada compatibilidad y aptitud enológica a escala de laboratorio. Con el objetivo de validar este cultivo, mostos industriales de las variedades Pinotnoir y Malbec se vinificarona escala piloto a través de fermentaciones alcohólicas guiadas por las cepas indígena ScF8 o comercial *S. cerevisiae* F15 de Laffort (control) seguidas de FML espontáneas (control) o guiadas por la BAL indígena UNQOe31. Todas las vinificaciones rindieron vinos fisicoquímicamente normales aunque los elaborados con el par Sc F8-Oe31 resultaron sensorialmente diferentes de sus controles (ANOVA y prueba de Duncan $p<0,05$), aromáticamente superiores ($p<0.05$) y preferentemente elegidos por los consumidores (prueba de Bonferroni $p<0.05$), evidenciando el potencial del par Sc F8-Oe31 para formular un cultivo mixto regional destinado a la elaboración de vinos tintos de calidad *Premium* (controlada y diferencial).

Palabras clave: cultivos mixtos, *Saccharomycescerevisiae*, *Oenococcusoeni*, vino, aroma

ABSTRACT

In Patagonian winegrowing region malolactic fermentations (MLF) are carried out spontaneously by the indigenous biota of lactic acid bacteria (LAB) present in the must/wine. In order to prevent stuck MLF caused at industrial scale by antagonistic interactions between yeastand BAL, a mixed culture consisting of indigenous Saccharomyces cerevisae F8 (ScF8) and Oenococcusoeni (UNQOe31) strains, with proven compatibility at laboratory scale, was developed. With the aim to validate this mixed culture, Pinot Noir and Malbec musts (200L) were winemaking at pilot scale through alcoholic fermentations guided by the indigenous ScF8 or commercial S. cerevisiae F15 (control) strains followed by MLF carried out spontaneously (control) or UNQOe3guided. All vinifications rendered physichochemicalnormal winesbut the ones elaborated with the F8-Oe31 Sc pair were sensorial different from their controls (ANOVA and Duncan test $p<0.05$), aromatically higher than these ones ($p<0.05$) and mostly chosen by consumers in preference tests (Bonferroni test $p<0.05$). These results evidence the potentialof theSc F8-Oe31 pair to develop an indigenous mixed starter culture for the production of premium quality red wines (controlled and differential).

Keywords: mixed starters, *Saccharomyces cerevisiae*, *Oenococcusoeni*, wine, aroma

INTRODUCCIÓN

En la Argentina la producción vitivinícola ocupa un lugar de relevancia dentro de las agroindustrias. El país es actualmente el quinto productor, el séptimo consumidor y el noveno exportador mundial en volumen de vinos (Quini 2014). En el mercado vitivinícola existen dos vías para imponer la calidad de un vino: resaltando la calidad varietal de sus uvas o aludiendo a la región (terruño) en donde éstas fueron vendimiadas y vinificadas. Si bien las exportaciones de vinos argentinos se realizan atendiendo a la variedad, existen en el país regiones y subregiones vitivinícolas que poseen las características necesarias para lograr certificaciones de calidad del tipo de denominaciones geográficas o de origen (Catania y Avagnina 2010), entre ellas la región del Comahue.Ubicada en la patagonia noroccidental, entre los 37º y 40º de LS, la región del Comahue cuenta con suelos y clima aptos para el desarrollo de una vitivinicultura de calidad (Le Guillou 2000, Lorente y Cazzasa 2005) y su producción está mayoritariamente orientada a la elaboración de vinos tintos jóvenes y secos(80%) de variedades de *Vitisvinifera* aromáticamente neutras, algunas de las cuales, como Pinotnoir, han encontrado en la región las condiciones agroecológicas óptimas para expresar todo su potencial enológico (Weizman 2009). La calidad sensorial de los vinos jóvenes de variedades de *Vitis vinífera* L. neutras está fuertemente influenciada por la biota de microorganismo responsable de llevar adelante el proceso de vinificación (Fleet 2003). En este contexto, el adecuado control microbiológico de la fermentación alcohólica (FA) y de la fermentación maloláctica (FML), los dos bio-procesos involucrados en la fermentación, resulta clave para la elaboración de vinos de calidad superior.

La fermentación maloláctica (FML), transformación del ácido L(-) málico en ácido L(+) láctico llevada a cabo por las bacterias del ácido láctico (BAL) e históricamente considerada una fermentación secundaria, constituye actualmente una práctica enológica de rutina en todas las vinificaciones en tinto del mundo con el fin de obtener vinos más equilibrados y armónicos y microbiológicamente estables (Lermet al. 2010). Mientras las FMLs naturales como las que se realizan en la elaboración de vinos patagónicos son de difícil gestión, desde comienzos de los años ´90 se dispone en el mercado de cultivos puros de cepas de BAL (Oenococcusoeni) las que se comercializan bajo distintas formas de presentación; no obstante, los resultados de su uso no siempre son los esperados, observándose un elevado índice de fracaso para desarrollar el proceso. Interacciones antagónicas levaduras-BAL se han reportado entre las causas responsables de este suceso (Alexander y col 2004). Por otro lado, estudios previos realizados en el Comahue, han puesto en evidencia un alto índice de fracasos en el desarrollo de FML espontáneas asociadas a vinificaciones conducidas por levaduras comerciales (foráneas). En este contexto y en consonancia con las tendencias actuales de la vitivinicultura mundial de utilizar cultivos iniciadores indígenas de la propia región vitivinícola con el fin de diferenciar la calidad de los vinos respetando la biodiversidad y tipicidad del terroir(Capozzi et al. 2010, Lerm et al. 2011; Tufariello et al. 2014, Alves et al. 2015), el objetivo de este trabajo es realizar la primer pruebas de concepto destinada avalidar un cultivo iniciador mixto constituido por cepas patagónicas de levaduras-BAL de probada aptitud enológica y compatibilidad demostrada a escala de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Levaduras:Saccharomycescerevisiae F8 (ScF8), cepa caracterizada como indígena de la Patagonia por métodos moleculares (Caballero et al. 2008) y *S. cerevisiae* F15 de Laffort (ScF15), cepa comercial mayoritariamente usada en vinificaciones tintas patagónicas.BAL: *Oenococcusoeni*UNQOe 31, cepa indígena de la región del Comahue (Bravo-Ferrada *et al.* 2011a).

Vinificaciones

Se realizaron a escala piloto (200L) durante la vendimia 2015.Mostos industrialesPinotnoir y Malbec se inocularon con cultivos puros de la cepa indígena ScF8 o de la comercial ScF15 (densidades iniciales $\cong 10^7$cél/mL en los tanques de fermentación). Las fermentaciones alcohólicas (FA) se desarrollaron

25±2°C hasta sequedad de los mostos (azúcares reductores totales ≅2 g L^{-1}). A este tiempo, los vinos se trasegaron y se transfirieron a tanques de acero inoxidable de 50L donde las fermentaciones malolácticas (FML) se desarrollaron espontáneamente o por inoculación del vino joven con un cultivo puro de la cepa UNQOe 31(densidades iniciales celulares≅ 10^6-10^7cél/mL en los tanques) previamente aclimatado (Lerm*et al.* 2011). Al final de este proceso los vinos se estabilizaron, se ajustó su concentración de SO_2 y se embotellaron. La evolución de las FA y FML se realizó por determinación de losºBmé y del contenido de ácido L(-) málico (método enzimático) respectivamente. Con el fin de realizar análisis microbiológicos y fisicoquímicos se tomaron muestras de mostos en los estadios iniciales, medios y finales de las FA y FML.

Análisis microbiológicos

El crecimiento de levaduras y BAL se evaluó por aislamiento y recuento de células viables cultivables (UFC/mL) en placas de GPY agar suplementadas con 100 ppm de ampicilina y en placas de MRS agar suplementadas con 100 ppm de cicloheximida, respectivamente. Los cultivos se incubaron tres días en aerobiosis (levaduras) o 10 días en anaerobiosis (BAL) a 25±2ºC. Por cada muestra de mosto/vino se picaron veinte colonias aisladas de levaduras o BAL, las que se re-aislaron en sus respectivos medios. Los cultivos puros de estos aislados se conservaron a -80ºC en caldos GPY (levaduras) o RMS (BAL) conteniendo 20% v/v de glicerol. La identificación de levaduras a nivel de especie se realizó por ITS1-5.8S ARNr-ITS2 PCR-RFLP (Esteve-Zarzoso *et al.* 1999) utilizando los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.* 1990) y las endonucleasas de restricción *Cfo*I, *Hae*III y*Hinf*I (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Los amplificados y los fragmentos de restricción se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (w/v) and 3% (w/v) respectivamente, utilizando solución reguladora TAE al 1% y pH 8.0 y una escalera de 100-bp como marcador de tamaño molecular (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Los geles se tiñieron con bromuro de etidio (5 μg/1) y se visualizaron bajo luz UV. La cepa *S. cerevisiae* NCYC 738 se usó como referencia. Las bacterias Gram (+) y catalasa (-) clasificadas presuntivamente como BAL se identificaron a nivel de especie por rpoB PCR-RFLP utilizando los cebadores rpoB1 (5′-ATTGACCACTTGGGTAACCGTCG3′), rpoB1o (5′ATCGATCACTTAGGCAATCGTCG3′) y rpoB2 (5′-ACGATCACGGGTCAAACCACC-3′) y las endonucleasas*Aci*I and *Hinf*I(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) (Claisse*et al.* 2007). Los amplificados y sus fragmentos de restricción se resolvieron y visualizaron como se describió anteriormente para las levaduras pero usando una escalera de 50 pbcomo marcador de tamaño molecular (Gibco BRL, Gaithersburg,MD). *Lactobacilluscasei*ATCC 393 and *Oenococcusoeni* ATCC 27310 fueron usados como referencias. Finalmente el análisis de la dinámica de las poblaciones de S. cerevisiae y *O. oeni* asociadas a los procesos de vinificación se caracterizó por análisis de los perfiles de restricción obtenidosa partir delmitDNA con *Hinf*I (Lopes et al. 2006) y por los perfiles RAPD amplificados por PCR utilizando el iniciador Coc (5´-AGCAGCGTGG-3´) (Cocconcelli et al., 1997).

Análisis de los vinos

La evaluación fisicoquímica de los vinos se realizó utilizando la metodología oficial del INV mientras que las concentraciones del ácido L (-) málico se determinaron enzimáticamente (Boehringer). El análisis sensorial se realizó mediante cata y análisis cualitativo y a través de pruebas de preferencia de los consumidores. La cata y el análisis cualitativo fueron realizados por un panel de nueve jueces pertenecientes al INTI Villa Regina conforme a las normativas IRAM 20005, 20006 (1996) y 20012 (1997). Para evaluar la significación de las diferencias observadas en el análisis cualitativo y en las pruebas de preferencia de los consumidores se utilizaron las pruebas de Tukey y Bonferroni, respectivamente,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos previos realizados durante las vendimias 2012 al 2014 a escala piloto permitieron validar la aptitud enológica de la cepa patagónica ScF8 y proponer el desarrollo de un cultivo iniciador local constituido por la misma (del Mónaco *et*

*al.*2014). Los resultados obtenidos en la Vendimia 2015 y presentados en las **Figuras 1** y **2** confirman la capacidad de la cepa indígena de doblegar a la biota indígena, implantarse en el mosto y conducir la FAde manera similar (malbec) o más eficiente (Pinotnoir) que la comercial ScF15.

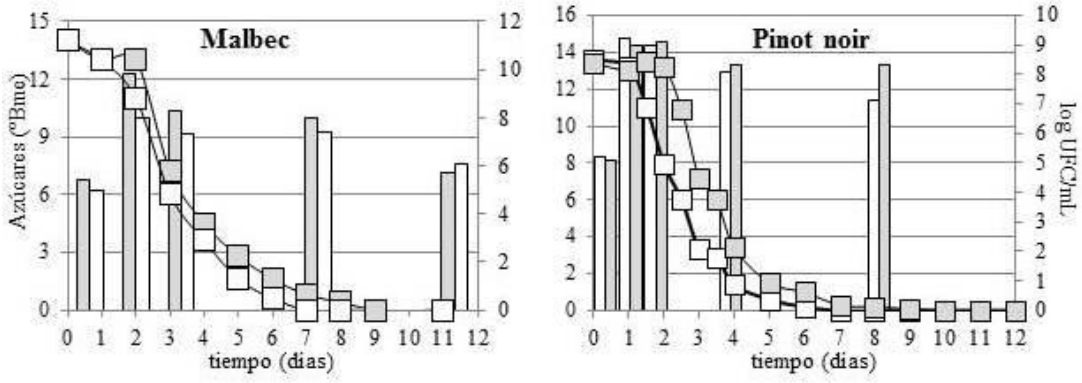


Figura 1: Fermentaciones alcohólicas asociadas a las vinificaciones conducidas por ScF8 (símbolos blancos) y ScF15 (símbolos grises) durante la vendimia 2015. Cuadrados: cinéticas del proceso fermentativo (ºBmé); barras: crecimiento microbiano (levaduras).

Por otra parte, en esas pruebas de concepto las fermentaciones malolácticas ocurrieron espontáneamente observándose en algunos casos dificultad para su inicio y/o desarrollo, en particular en vinificaciones Pinotnoir. Aunque los vinos obtenidos con la levadura indígena ScF8 resultaron normales, sin defectos graves y de mayor aceptabilidad por parte de las consumidores que los elaborados con la cepa comercial (del Mónaco *et al.* 2014), sus contenidos en ácido L(-) málico, aunque siempre menores que el de sus controles (ScF15), mostraron valores que en algunos casos comprometen la estabilidad microbiológica del vino (del Mónaco et al. 2014) obligando a pensar en el desarrollo de un cultivo iniciador para las FML desarrollado a partir de cepas de *O. oeni* indígenas de la región metabólica/fisiológicamente compatible con la cepa indígena de levadura. Experimentos realizados a escala de laboratorio permitieron seleccionar al par ScF8-UNQOe31 como el más adecuado (Curilén*et al.* 2015).

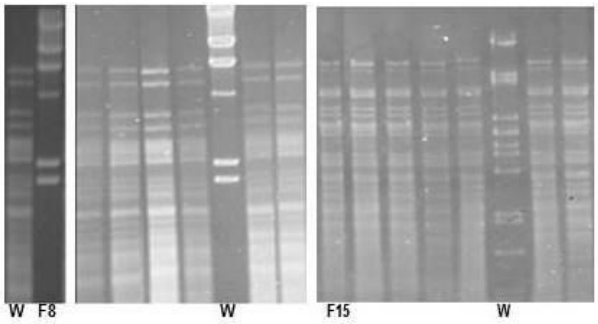


Figura 2: Perfiles de restricción del mitADNcon *Hinf* I obtenidos de cepas de *S. cerevisiae* procedentes de cultivos puros de las cepas indígena (F8) y comercial (F15) y de aislados de mostos finales de fermentaciones alcohólicas conducidas por ScF8 (izquierda) y ScF15 (derecha). W:marcador de peso molecular.

En la **Figura 3** se presentan los resultados de las cinéticas del proceso y el crecimiento microbiano de las FML experimentales y sus controles (espontáneas), evidenciando una menor capacidad de crecimiento de la BAL indígena, así como de la biota BAL natural, en el sustrato Pinotnoir y una mayor actividad maloláctica

en las poblaciones de BAL asociadas a las vinificaciones de este sustrato conducidas por la cepa comercial que en las conducidas por la cepa indígena.

El análisis molecular discriminante a nivel de individuos evidenció una menor implantación de la BAL indígena en la vinificaciones conducidas por ScF8 que en las conducidas por la cepa comercial (40% vs. 90%) (datos no mostrados) así como también una mayor proporción de bacilos Gram (+) catalasa (-) (presuntivamente *Lactobacillusplantarum*) en el primer caso. Estos resultados son consistentes con otros resultados obtenidos a partir de estudios ecológicos de BAL realizados en FML espontáneas asociadas a vinificaciones naturales industriales y parecen indicar que las poblaciones de *O. oeni* requeridas para un desarrollo eficiente de la FML deben estar en el orden de por lo menos 10^4 células de *O. oeni*viables cultivables/mL vino.En las FML de las vinificaciones Malbec la implantación de la cepa indígena fue mayor al 80% tanto en las vinificaciones conducidas por la cepa indígena (**Figura 4**) como en la control. No se encontraron aislados con patrones RAPD similares a los presentados por UNQOe31 en las FML espontáneas (**Figura 4**) evidenciando la ausencia de contaminaciones cruzadas.

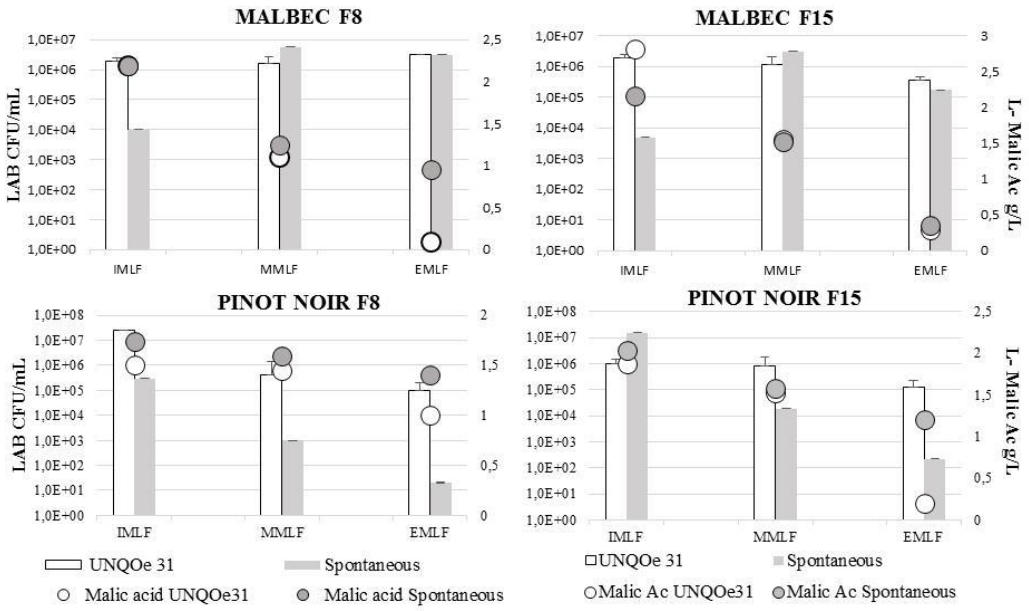


Figura 3: Evolución de las poblaciones de *Oenococcusoeni* y del contenido de ácido L(-) málicoen FML espontáneas (control) y conducidas por la cepa BAL indígena. IMLF, MMLF and EMLF: estados iniciales, medios y finales de las FML.

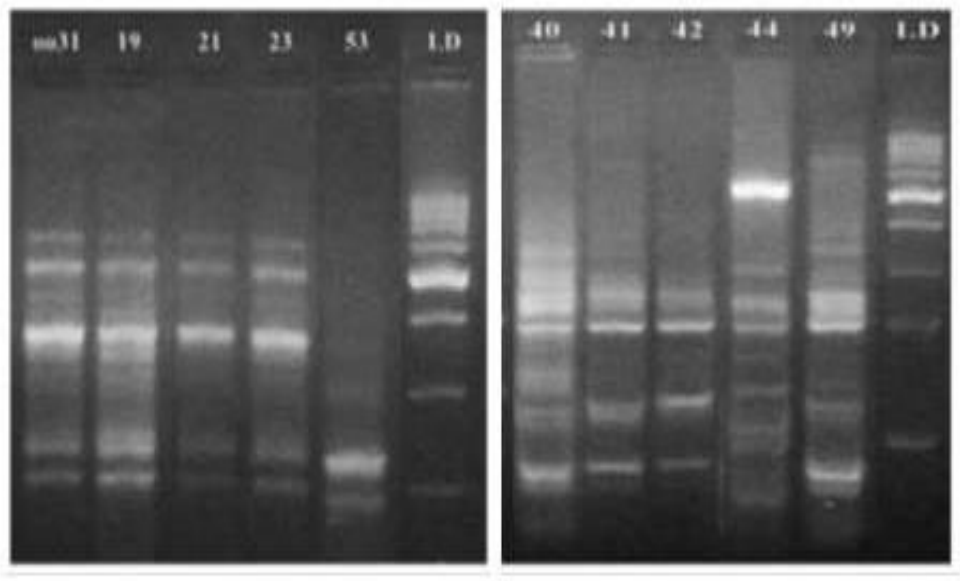


Figura4: Perfiles moleculares obtenidos para individuos de *O. eoni* mediante la técnica RAPD. Izquierda: aisladosprocedentes de FML de vinos Malbecconducidas por laBalindígena. Derecha: aislados procedentes de FML de vinos Malbec conducidas espontáneamente. LD: marcador de peso molecular. La flecha señala el perfil obtenido para aislados de la cepa UNQOe31 procedentes de un cultivo puro.

En la **Tabla 1** se presentan los parámetros fisicoquímicos de los vinos obtenidos, resultando todos ellos vinos normales y secos. El menor índice de color de los vinos obtenidos por FML conducidas por la cepa indígena UNQOe31 puede atribuirse a que la misma es portadora de actividad β-glicosidasa (Bravo-Ferrada *et al.* 2011b).

Tabla1: Calidad fisicoquímica de vinos elaborados a escala piloto

Parámetro	VINOS PINOT NOIR				VINOS MALBEC			
	ScF8 UNQOe31	ScF8 Sp	ScF15 UNQOe31	ScF15 Sp	ScF8 UNQOe31	ScF8 Sp	ScF15 UNQOe31	ScF15 Sp
ART (g/L)	<1	1.9	1.3	2.0	1.0	1.80	1.3	2.00
Etanol (%v/v)	14.7	14.8	14.8	14.8	15.00	15.00	15.00	15.10
pH	3.91	3.89	3.99	3.88	3.90	3.7	3.91	3.93
AT*	4.59	4.61	4.55	4.93	4.42	4.61	4.82	4.77
AV#	0.72	0.67	0.70	0.69	0.75	0.77	0.80	0.75
Ac. L-Malic (g/L)	1.00	1.40	0.22	1.21	0.09	0.95	0.35	0.29
Indice de color	715	744	562	644	1747	1917	1235	1638

IPT	36.45	39.60	32.45	38.1	48.75	44.10	53.65	43.35

*acidez titulable, expresada como ácido tartárico(g/L); #acidez volátil, expresada como ácido acético (g/L). ART: azúcares reductores totales

Finalmente el análisis de la calidad sensorial de los vinos parece indicar que el desarrollo o no de la FML parece no incidir en la aceptabilidad de los vinos Pinotnoir por parte de los consumidores (**Tabla 2**), aunque este no es el caso para la variedad Malbec, cuyos vinos elaborados con el par indígena ScF8-UNQOe31 resultaron ser los preferidos de los consumidores (**Tabla3**). En el análisis sensorial estos vinos obtuvieron el mayor puntaje global por cata (**Tabla 3**) y presentaron un aroma significativamente más complejo y especiado (p<0,05 Anova y Test de Tukey n=27).

Tabla2: Prueba de preferencia de los consumidores para vinos PINOT NOIR

Medias ajustadas y errores estándares para TRAT y DGC (Alfa=0.10)
Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni

TRAT	Medias	E.E.	
F15	2,63	0,26	A
F15_31	1,85	0,26	B
F8	1,73	0,30	B
F8_31	1,61	0,29	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p < 0,10)

Tabla 3: Prueba de preferencia de los consumidores para vinos MALBEC

Medias ajustadas y errores estándares para TRAT
DGC (Alfa=0.10)
Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni

TRAT	Medias	E.E.		Valoración Global Cata
F15	2,20	0,18	A	7,22
F15_31	2,15	0,19	A	7,20
F8	2,10	0,20	A	7,22
F8_31	1,56	0,21	B	7,45

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p <0,10)

CONCLUSIONES

Todas las vinificaciones rindieron vinos jóvenes, secos y normales desde el punto de vista fisicoquímico.Interacciones negativas entre las cepas indígenas ScF8 y UNQOe31 influenciadas por la calidad del sustrato impidieron una buena implantación de la BAL indígena en estos vinos influenciando negativamente sobre el desarrollo de la FML.

El cultivo mixto indígena *S. cerevisiae*F8 - *O. oeni*31 fue exitoso con la variedad Malbecrindiendo vinos de alta calidad sensorial, con aromas más complejos y especiados y que resultaron preferidos por los consumidores.

Aunque deben realizarse pruebas de concepto adicionales, los resultados obtenidos con el cultivo mixto indígena Sc F8-Oe31 y la variedad Malbec evidencian el potencial del par para formular un cultivo mixto regional destinado a la elaboración de vinos tintos Malbec, la variedad emblemática de la Argentina, de calidad premium (controlada y diferencial).

BIBLIOGRAFÍA

Barata A, Malfeito-Ferreira M and Loureiro V.2012. The microbial ecology of wine grape berries.International Journal of Food Microbiology 153:243–259.

Bravo-Ferrada BM, Delfederico L, Hollmann A, Valdés La Hens D, Curilén Y, Caballero A, Semorile L. 2011a. Oenococcusoeni from patagonian red wines: isolation, characterization and technological properties. International Journalof Microbiology Research 3 (1): 48-52.

Bravo-Ferrada BM, Hall G, Hollmann A, Delfederico L, Valdés La Hens D, Curilén YL, Caballero AC, Semorile LC. 2011b. Caracterización y propiedades tecnológicas de aislamientos de *Lactobacillusplantarum* y *Oenococcusoeni*: selección de bacterias malolácticas autóctonas de la Patagonia Argentina".En:

Actualizaciones en Investigación Vitivinícola, XI Congreso Nacional de Investigación Enológica, Jerez de la Frontera: Martínez Encuadernaciones SL pp 137-140.
Caballero AC, Sangorrín MP, Lopes CA, Rodríguez ME, Zajonskovsky IE, Barbagelata RJ, Lavalle TL. 2008. Informe Técnico Final PFIP 2004, Resolución SCTIP N°215/04. Convenio 028/2005, COFECyT-MINCYT República Argentina.
Capozzi V, Russo P, Beneduce L, Weidmann S, Grieco F, Guzzo J, Spano G (2010) Technological properties of Oenococcusoeni strains isolated from typical southern Italian wines. LettApplMicrobiol 50:327-334
Catania C, Avagnina S.2010. El terruñoargentino.Mendoza, INTA y EditoraAndina Sur.p. 111-121.
Claisse O, Renouf V, Lonvaud-Funel A. 2007. Differentiation of wine lactic acid bacteria species based on RFLP analysis of a partial sequence of rpoB gene. Journal of Microbiology Methods 69: 387–390
Curilén YL, Gross ELA, Semorile LC, Caballero AC. 2015.Selección de un para levadura-bacteria láctica para el formulado de un cultivo iniciador mixto destinado a Enología" XV CYTAL. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. ID 455.
del Mónaco SM, Bravo SME, Curilén YL, Carreño VA, Caballero AC. 2014. A regional starter for high quality wines: an Argentinean Patagonia experience. Bulletin de l'OIV 87 (998-999-1000): 217-224
Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F and Querol A. 1999.Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. International Journal of Systematic Bacteriology 49:329–337.
Fleet GH. 2003. Yeast interactions and wine flavour. International Journal of Food Microbiology86:11–22.
Hernandez-Orte P, Cersosimo M, Loscos N, Cacho J, Garcia-Moruno E, Ferreira V. 2009. Aroma development from non-floral grape precursors by wine lactic acid bacteria. Food Research International42:454-460
Le Guillou B. 2000. Río Negro. De la vignedans des oasis de la Patagonieargentine.La Vigne116:112-113.
Lerm E, Engelbrecht L, du Toit M (2010) Malolactic fermentation: the ABC´s of MLF. S Afr J EnolVitic 31:186-192
Lerm E, Engelbrecht L, du Toit M (2011) Selection and characterisation of Oenococcusoeni and Lactobacillus plantarum South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. S Afr J EnolVitic 32:280-295
Llorente, A. y Casazza, M. (2005) La región vitivinícola sur de la Argentina. El vino y su industria 40: 7-13.Pinto C, Pinho D, Cardoso R, Custódio V, Fernandes J, Sousa S, Pinheiro M, Egas C, Gomes AC.2015. Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations. Frontiers in Microbiology 6(905):1-13.
Pretorius IS. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking.Yeast 16:675-729.
Romano P, Fiore C, Paraggio M, Caruso M, Capece A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. International Journal of Food Microbiology 86:169-180.
Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA, Pretorius IS. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Australian Journal of Grape and Wine Research 11:139–173.
Weizman D.2009. El mapa argentino de los sentidos. Rumbos 326:18-24.
White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990.PCR protocols.A guide to methods and applications. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and Withe TJ Eds. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. San Diego: Academic Press. pp. 315–322.

Caracterización de cultivos mixtos con levaduras nativas de la región del Comahue para desarrollar vinos patagónicos de calidad mejorada.

del Mónaco S.M.[1], Maturano R.C.[1], Bravo S.M.E.[1,2], Simes A.B.[2], Curilén Y.L.[1,2], Caballero A.C.[1,2].

[1]Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos, Biotecnología y Energías Alternativas. CONICET-UNComahue (8300) Neuquén. Neuquén. [2]Facultad de Ciencias y Tecnología de los Alimentos UNComahue (8336) Villa Regina. Río Negro.
Dirección de e-mail: silmdm@yahoo.com

RESUMEN

La región de la Patagonia Norte presenta condiciones agroecológicas favorables para el desarrollo de una vitivinicultura de alta calidad y levaduras nativas de esta región, bien adaptadas a dichas condiciones, podrían utilizarse como cultivos iniciadores. Cepas indígenas *Saccharomycescerevisiae* (F8) y *Pichiakudriavzevii* (Pk I15) fueron inoculadas en cultivos mixtos a escala piloto (200L)en mostos Pinotnoir y Malbec, utilizando una estrategia de co-inoculacióndurante las vendimias 2014-2016. Todas las vinificaciones presentaron cinéticas fermentativas normales y el comportamiento microbiológico de los procesos, seguido por métodos clásicos y moleculares, evidenció una buena capacidad de implantación de las cepas indígenas. La calidad fisicoquímica detodos los vinos obtenidos, analizados según métodos del INV, se correspondió con lade vinos secos normales.No obstante, la evaluación sensorialmostró diferencias favorables para los vinos elaborados con el CoC y la variedad Malbec, emblemática de Argentina, quienes obtuvieron los mayores puntajes en la valoración global por cata, presentaron un aroma significativamente más especiado y fueron los preferidos por los consumidores. La utilización de cultivos iniciadores indígenas en la elaboración de vinos regionales marca una tendencia en expansión en la vitivinicultura actual, con la finalidad de obtener productos diferenciados, preservando la biodiversidad de la región.

Palabras clave: cultivos iniciadores mixtos, *Saccharomycescerevisiae*, levaduras non-*Saccharomyces*, aroma, color.

ABSTRACT

The North Patagonian region presents favourable agro-ecological conditions for the development ofhigh quality vitiviniculture and yeasts isolated from this region could be used as starter cultures due to their adaptability to those conditions. Indigenous strains *Saccharomyces cerevisiae* (F8) and *Pichia kudriavzevii* (Pk15) were evaluated as a mixed culture at laboratory and pilot scale (200L) during 2014-2016 vintages, vinifying local must varieties.Grape musts from Pinot noir y Malbec varieties were inoculated using a co-inoculation strategy (CoC). All processes showed kinetics of regular fermentations andtheir microbiological analysis, using classic and molecular methods, evidenced avery good implantation capabilityof both indigenous strains.Physicochemical analysis using INV methods evidence that, in all cases,the qualities of wines were consistent with those of normal dry ones. However sensory analysis showed significant differences in favour to wines produced by the CoCand the variety Malbec, the Argentine emblematic grape variety, which obtained the highest scores in the tasting, showing the highest spicy aroma and being preferred by the consumers. The use of indigenous starter cultures in elaboration of regional wines with distinctive characteristics defines an expanding tendencyin current wine industry, toobtain differentiated productspreserving the natural biodiversity of the region.

Keywords: mixed starter cultures, *Saccharomyces cerevisiae*, non-*Saccharomyces*yeasts, aroma, color.

INTRODUCCIÓN

La fermentación de mostos de uva puede ocurrir espontáneamente a través de la actividad de diversos microorganismos que conforman la biota natural presente en la fruta, identificándose más de 40 especies asociadas al sustrato (Jolly*et al.* 2014). Las levaduras responsables de la fermentación alcohólica del zumo de uva en vino son básicamente diferenciadas en dos grupos principales: especies no-*Saccharomyces*, dominantes durante las primeras etapas de la fermentación, Saccharomyces*cerevisiae*, cuyas cepas prevalecen en las etapas medias y finales caracterizadas por elevadas concentraciones de etanol. Diferentes cepas de *S.cerevisiae*son comercializadas en el mercado en forma de levadura seca activa (LSA) y se adicionan a los mostos con el fin de conducir y controlar el proceso, asegurando un rápido inicio de la fermentación y reduciendo los riesgos de paradas/retrasos de la misma y/o contaminación de los vinos (Pretorius 2000, Fleet 2008). Estudios ecológicos sobre levaduras vínicas realizados combinando métodos clásicos y moleculares en diferentes regiones vitivinícolas del mundo sugieren la existencia de una biota indígena de levaduras (ecotípica) asociada a cada terruño particular (Querol y Ramón 1992, Lopes et al. 2006, Schuller et al. 2014; del Mónaco et al. 2015). Estas levaduras indígenas, mejor adaptadas a las condiciones agroecológicas de su propia región, además de preservar la biodiversidad natural del ecosistema (Fleet 2008) respetan la tipicidad del terruño permitiendo expresar en los vinos notas sensoriales particulares y diferenciales del mismo (Martini et al. 2003, Callejón et al. 2010, Tufariello et al. 2014, Alves et al. 2015). En este contexto, la sustitución de cultivos iniciadores foráneos por cultivos iniciadores indígenas de cada área productiva es actualmente una tendencia en expansión en la vitivinicultura mundial con el objetivo de agregar valor a los productos del sector a través del control y la diferenciación de su calidad (Fleet 2008, Carrau et al. 2015).

La región del Comahue, ubicada en la Patagonia norte a los 40º de latitud sur, es la región vitivinícola más austral de la Argentina y una de las más australes del mundo. Esta zona presenta condiciones agroecológicas favorables para la viticultura de alta calidad (LeGuillou 2000, Llorente y Casazza 2005) y la producción se orienta principalmente a la elaboración de vinos jóvenes y secos de variedades tintas de *Vitis vinífera* comoMalbec, Merlot y PinotNoir, entre otras (Catania y Avagnina 2010). En estas variedades, la calidad sensorial de los vinos jóvenes está significativamente influenciada por la biota de levaduras conductora de la fermentación alcohólica (Fleet 2003), proceso que en la región se lleva a cabo mayoritariamente por inoculación de los mostos de uva con cultivos iniciadores comerciales disponibles en el mercado, ninguno de los cuales está constituido por cepas de *S. cerevisiae* indígenas de alguna de las regiones vitivinícolas de Argentina. Estudios ecológicos de las vinificaciones en tinto patagónicas iniciados en la Universidad Nacional del Comahue en la década del '90 permitieron caracterizar la biota indígena asociada a uvas, mostos y bodegas de esta región (del Mónaco et al. 2016) y constituir una importante colección de cepas locales de levaduras *Saccharomyces*y *non-Saccharomyces*, algunasde las cuales como *S. cerevisiae* F8 y *Pichiakudriavzevii* I15, mostraron propiedades adecuadas y relevantes para su uso en enología (del Mónaco et al. 2014 a y b). En este contextoy con el fin de desarrollar cultivos iniciadores locales para la elaboración de vinos tintos de calidad superior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de un cultivo mixto de dichas cepas nativas para vinificar mostos locales de variedades Pinotnoir y Malbec a escala de laboratorio y a escala piloto, y determinar su influencia sobre la calidad del producto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Las levaduras estudiadas fueron *S. cerevisiae* ÑIF8 (Sc F8) y *P. kudriavzevii* ÑNI15 (Pk I15), cepas de la región del Comahue, Patagonia Norte, caracterizadas como indígenas por métodos moleculares (Caballero et al. 2008, del Mónaco et al. 2015), y el cultivo iniciador comercial *S. cerevisiae* F15 (Laffort, Sc F15), mayoritariamente utilizado para conducir las vinificaciones a escala industrial en vinos tintos patagónicos.

Vinificaciones

Mostos industriales de las variedades PinotNoir y Malbec se vinificaron a escala piloto (200L) durante las vendimias 2014 a 2016 realizando fermentaciones alcohólicas (FA) guiadas porun cultivo mixto de Pk I15 y Sc F8. Los mostos se inocularon con pie de cubas de Pk I15 y Sc F8 en una estrategia de co-inoculación (CoC), en una relación de sus concentraciones celulares iníciales de $10^5/10^7$ UFC/mL. Vinificaciones conducidas por cultivos puros de Sc F8 y Sc F15 se realizaron como control. Todas las vinificaciones se realizaron a 25±2ºC y las fermentaciones malolácticas fueron siempre espontáneas. Finalmente, los vinos se filtraron, se estabilizaron, se ajustó su contenido de SO_2 y se embotellaron. La cinética de la fermentación alcohólica se siguió por evolución de los ºBmé o por determinación de azúcares reductores totales (ART, método de Fehling-Causse-Bonnans), la evolución de la FML por cuantificación del ácido L-málico (método enzimático) y el crecimiento microbiano por recuento de viables en placas de GPY.

Aislamiento e identificación de levaduras

El aislamiento y recuento de levaduras viables (UFC/mL) se realizó en GPY agar (2% glucosa, 0,5% peptona y 0,5% extracto de levaduras y 2% de agar, pH 5,0) suplementado con 100 ppm de ampicilina (Sigma, Steinheim, Alemania) (recuento de levaduras totales) en tres estadios de la FA: inicial (antes de la inoculación), medio (≈6ºBmé) y final (< $2gl^{-1}$ de glucosa). Las levaduras, aisladas de cada etapa de la fermentación de acuerdo a las características macroscópicas de sus colonias y de sus frecuencias de aparición, se re-aislaron en GPY-ampicilina y los cultivos puros se mantuvieron a -80ºC en GPY-glicerol (20% v/v). La identificación de las especies de levaduras se realizó por ITS1-5.8S DNAr - ITS2 PCR-RFLP usando las endonucleasas*Cfo*I, *Hae*III y *Hinf*I (Esteve-Zarzoso et al. 1999) y la discriminación de cepas de *S. cerevisiae*a través del análisis de los perfiles de restricciónde lADN mitocondrial utilizando la endonucleasa*Hinf* I. (Lopeset al. 2006).

Análisis fisicoquímico y sensorial de los vinos

El análisis fisicoquímico de los vinos se realizó de acuerdo a los métodos propuestos por el INV y el L (-) ácido málico se determinó enzimáticamente usando kits comerciales (Megazyme, Irlanda Internacional Ltd.).

La evaluación sensorial de los vinos obtenidos fue realizadapor un panel entrenado del INTI (Instituto Nacional de Tecnología Industrial) a 20°C±2°C por cata (valoración global) y/o análisis cualitativo (microvinificaciones y vinos 2015) según método propuesto por Meilgaard et al. 2006. Adicionalmente los vinos obtenidos a escala piloto (2015) se sometieron a una prueba de preferencia por los consumidores, cuya significación se determinó a través del test de Bonferroni.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de cultivos mixtos constituidos por cepas seleccionadas de *S.cerevisiae* y de levaduras *non-Saccharomyces*, combinan la alta capacidad fermentativa de las primeras y los aportes metabólicos distintivos de las segundas, siendo una estrategia enológica actualmente en evaluación con el fin de obtener vinos con propiedades sensoriales diferenciales, más equilibrados y armónicos (Ciani et al. 2010; Rodríguez et al. 2010, Suarez–Lepe y Morata 2012). No obstante, variantes en los protocolos de inoculación de las cepas constituyentes del cultivo mixto afectan la evolución del proceso y como consecuencia, la calidad fisicoquímica y sensorial del producto, motivo por el cual deben ser particularmente evaluados (Cianiet al. 2010, Muñoz-Gonzalezet al. 2011).

En estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio, vinificaciones de mostos Pinotnoir realizadas a escala de laboratorio utilizando diferentes estrategias de inoculación con las cepas indígenas ensayadas de Pk I15 y Sc F8 permitieron seleccionar al CoC como la estrategia de inoculación más adecuada del cultivo mixto para ser ensayada a escala piloto (del Mónaco et al., 2011). Los criterios de selección oportunamente utilizados fueron: 1) una mayor eficiencia fermentativa de los azúcares del mosto, propiedad de fundamental importancia para la producción de vinos secos (ART<2g/L); 2) una mayor capacidad de consumo de ácido málico, facilitando la deacidificación y estabilización microbiológica de los vinos tintos regionales, donde este ácido es el constituyente mayoritario de la acidez titulable (Caballero et al. 2005); 3) una buena capacidad de implantación de la cepa de levadura non-*Saccharomyces*, con capacidad de permanecer viable hasta el final del proceso fermentativo; 4) una producción de vinos fisicoquímicamente normalesy sensorialmente mejorados en su color y aroma. En particular, vinificaciones de mostos Pinotnoir realizadas a escala de laboratorio y conducidas por CoC rindieron vinos con mayores intensidades de color y aroma que sus controles, exaltando significativamente el aroma primario del varietal e incrementando su aroma frutal y la nota a vainilla.

Con el objetivo de validar estos cultivos iniciadores locales se realizaron las pruebas de concepto, vinificaciones a escala piloto conducidas por el cultivo mixto y por el cultivo puro nativo Sc F8, y vinificaciones guiadas por la cepa comercial Sc F15 desarrolladas como control. Como se desprende de la **Figura 1**, todas las vinificaciones conducidas con cultivos puros de la cepa indígenaSc F8 presentaron perfiles cinéticos correspondientes a FAs normales evidenciando, bajo las condiciones ensayadas, una mayor eficiencia que la comercial para el secado del mosto (etapa final de la FA) (**Figura 1**).

Resultados similares se obtuvieron para las vinificaciones conducidas por el cultivo mixtoPk I15 y Sc *F8* (**Figura 2**), cuyos procesos presentaron cinéticas de fermentaciones normales, aunque fueron más lentos que los conducidos por el cultivo puro tomado como control; en este caso el retraso se observó en las etapas iniciales del proceso y fue más marcado en la variedad Pinotnoir (**Figura 2**).

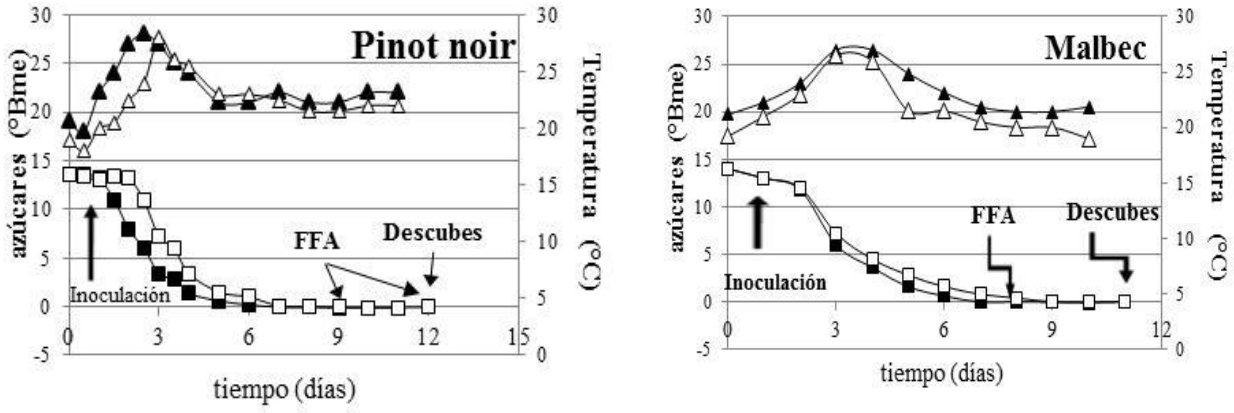


Figura 1: Evolución de las vinificaciones realizadas durante la vendimia 2015 conducidas por ScF8 (símbolos negros) y F15 (símbolos blancos). Cinéticas del proceso fermentativo según °Bme(cuadrados) y evolución de la temperatura (triángulos). **FFA**: finalización de la fermentación alcohólica.

La identificación de los aislados de levaduras asociadas a las vinificaciones por ITS PCR/RFLP confirmó la buena capacidad de la cepa indígenaPkI15 de implantarse y sobrevivir hasta estadios medios y finales de las vinificaciones guiadas por el CoC, donde representó en promedio el 45% y el 10% de los recuentos, respectivamente (**Figura 3A** y **B**).

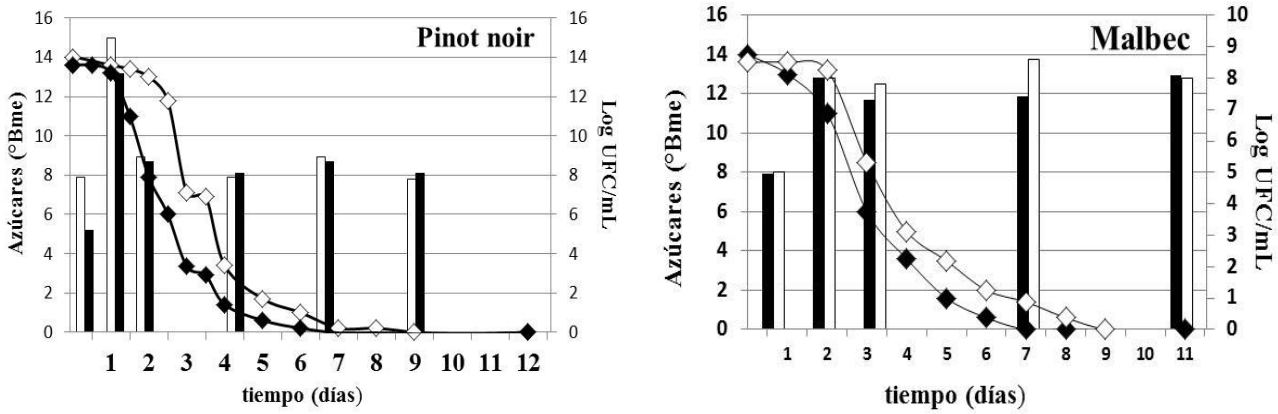


Figura 2: Crecimiento microbiano (barras) y evolución de los azúcares reductores totals (rombos) durante la vinificación de mostos Pinot y Malbec (Vendimia 2015) guiadas por el cultivo iniciador mixto Pk I15 y Sc F8 (símbolos blancos) y sus vinificaciones controles (símbolos negros) conducidas por Sc F8.

Es de interés señalar que no se observaron individuos de esta especie en ninguno de los estadios de las vinificaciones guiadas por los cultivos puros Sc F8 y Sc F15. Este resultado y la discriminación a nivel de individuo (ADNmit RFLP) de las poblaciones de *S. cerevisiae*asociadas a los procesos (**Figura 3**, insertosa, b y c) permitieron confirmar la ausencia de contaminaciones cruzadas entre vinificaciones y la excelente capacidad de implantación de la cepa indígena Sc F8 tanto cuando fue inoculada en la forma de cultivo puro (**Figura 3C** e inserto b) comomixto (**Figura 3B** e inserto a), no mostrando diferencias significativas en su capacidad de implantación (superiores al 90%) respecto de la levadura comercial Sc F15 (**Figura 3C** inserto c). En este contexto, las diferencias cinéticas observadas entre las vinificaciones guiadas por los cultivos puros Sc F8 y F15 (**Figura 1**), consistentes con las ya reportadas en vinificaciones similares realizadas durante el 2012 y 2013en Pinotnoir, Malbec y también Merlot (del Mónaco et al. 2014b), podrían atribuirse a una mejor capacidad de la levadura indígena de adaptarse a las condiciones de estrés que le imponen los mostos regionales e iniciar más rápidamente la fermentación alcohólica que la levadura foránea.Todos los vinos elaborados presentaron características fisicoquímicas de vinos secos normales (ART ≤ 2 gL^{-1}) (**Tabla 1**). Con excepción de este parámetro, cuyo contenido presenta una tendencia menor en los vinos obtenidos por fermentaciones guiadas con el cultivo de Sc F8 (resultado consistente con la mayor capacidad fermentativa observada para la cepa indígena desde los estudios cinéticos), las características fisicoquímicasrelacionadas con la estructura delvino fueron similares para los vinos elaborados con la cepa indígena (ScF8) y la cepa comercial Sc F15 (**Tabla1**). Sin embargo, los parámetros relacionados con el color mostraron diferencias significativas, evidenciando que la cepa indígena es capaz de desarrollar un mayor color en los vinos, y en el contenido de polifenoles, aunque este parámetro sólo fue diferente en la variedad Pinotnoir (**Tabla1**).También la calidad sensorial de estos vinos fue significativamente diferente. Encuestas de preferencia realizadas a los consumidores evidenciaron una mayor aceptabilidad por los vinos Pinot noir elaborados con la cepa de *S. cerevisiae* indígena (**Tabla 1**). Adicionalmente, enlas catas realizada por expertos, los vinos elaborados con la *S. cerevisiae* indígena obtuvieron siempre mayores puntajes globales que sus controles (ScF15) (**Tabla 1**).

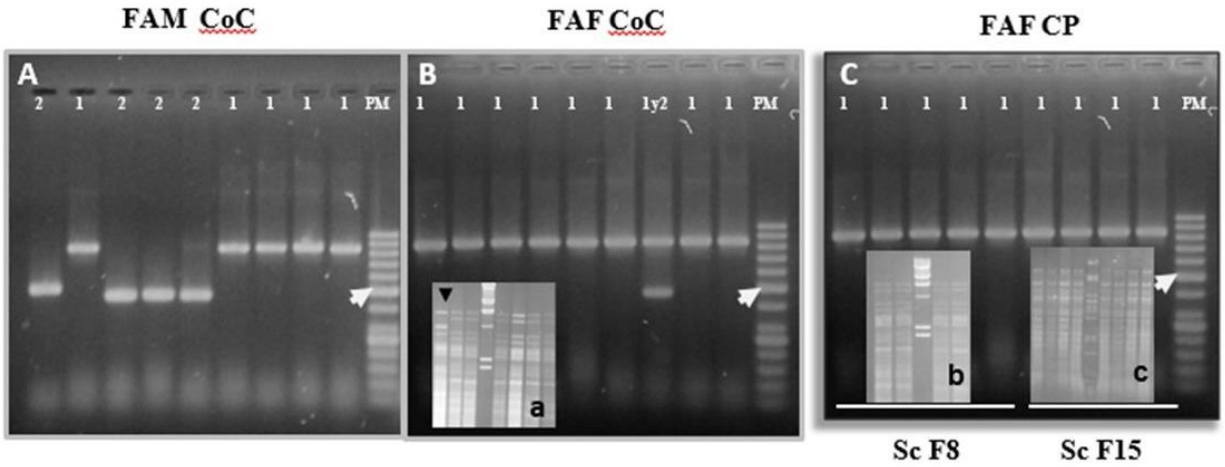


Figura 3: Diversidad específica e intraespecífica de levaduras asociadas a vinificaciones tintas Pinotnoir. ITS1 5.8S ADNr ITS2 PCR de levaduras asociadas a estadios medios (FAM) y finales (FAF) de fermentaciones alcohólicas conducidas por el cultivo mixto (CoC) (**A** y **B**, respectivamente) y los cultivos iniciadores puros (CP) (**C**). 1: *S. cerevisiae*(850 pb);2: *P. kudriavzevii*(525pb). PM: marcador de peso molecular. La flecha indica la banda correspondiente a 500pb. **Insertos a, b y c.** ADNmit RFLP/*Hinf*I de individuos de *S. cerevisiae* asociados a las vinificaciones guiadas con el cultivo mixto (Sc F8) y los cultivos puros (Sc F8 y F15). La flecha negra indica un individuo indígena de *S. cerevisiae* diferente de la cepa ScF8.

Respecto de los vinos elaborados con el cultivo mixto (CoC), los mismospresentaron concentraciones menores de alcohol que sus controles, aunque la diferencia no fue significativa para el número de muestras ensayadas, y una concentración significativamente menor en el contenido de ácido málico al finalizar la FA. Este resultado es compatible con la capacidad de la cepa *P. kudriavzevii*I15 de consumir ácido L (-) málico (del Mónaco *et al.* 2014 a). Adicionalmente, el CoC intensificó significativamente el color en los vinos de la variedad Pinotnoir (**Tabla 1**); esta capacidad también demostrada para el cultivo puro indígena es relevante ya que el Pinotnoires una variedad cuyos vinos generalmente presentan problemas de color en todas las regiones vitivinícolas del mundo.El menor color de los vinos Pinotnoirrespecto de otras variedades queda en evidencia cuando se comparan los índices de color de estos vinos respecto de los del varietal Malbecreportados en la **Tabla 1**.

Finalmente, la valoración global por cata realizada por un panel de expertos no arrojó diferencias significativas entre los vinos elaborados con el CoC y el cultivo puro de ScF8 (**Tabla 1**) para ninguna de las dos variedades. No obstante, en el análisis cualitativo, los vinos obtenidos para la variedad Pinotnoir y el CoC mostraron un color muy intenso con matiz vivaz, casi atípico para la variedad, y un aroma mineral, muy complejo, aunque estas diferencias no se tradujeron en una mayor aceptabilidad por parte de los consumidores en las pruebas de preferencia (**Tabla 1**). En cambio, los vinos de la variedad Malbecelaborados con el CoC presentaron un aroma especiado significativamente diferente de su control en el análisis cualitativo ($p<0,05$) y resultaron serlos preferidos por los consumidores (**Tabla 1**).

Tabla 1: Evaluaciones fisicoquímica y sensorial de los vinos obtenidos a partir de fermentaciones de mostos tintos patagónicos conducidas con el cultivo mixto S. *cerevisiae* F8 y *P. kudriavzevii* I15 (CoC) y con los cultivos puros de *S. cerevisiae*F8 indígena (Sc F8) y F15 comercial (Sc F15)

EVALUACIÓN	Malbec			Pinotnoir			p
FISICOQUÍMICA	Sc F15	Sc F8	CoC	Sc F15	Sc F8	CoC	
ART (g/L)	2,00±0,38	1,80±=0,51	1,85±0,78	2,08±0,04	1,93±0,26	2,18±0,25	ns
Etanol (% v/v)	15,1±0,1	15,0±0,8	14,5±0,2	14,8±0,4	14,8±0,3	14,3±0,4	ns
pH	3,93±0,04	3,90±0,02	3,87±0,18	3,88±0,17	3,89±0,09	3,84±0,08	ns
AT*	4,77±1,07	4,61±0,14	4,86±0,21	4,93±0,66	4,61±0,66	4,61±0,03	ns
AV#	0,75±0,03	0,77±0,05	0,73±0	0,69±0,13	0,67±0,11	0,69±0,18	ns
Ác. L-málico (g/L)(1)	2,30±0,14	2,19±0,00	1,35±0,35	1,95±0,12[a]	1,57±0,10[b]	1,36±0,01[a]	0,05
Ác. L-málico (g/L)(2)	0,26±0,23[b]	0,23±0,11[b]	0,50±0,06[a]	1,40±0,14[b]	1,24±0,16[b]	1,94±0,01[a]	0,01
Índice de Color	1243±32,53[b]	1917±311[a]	1192±19,09[b]	644±31[c]	744±37[b]	891±71[a]	0,01
IPT§	43,35±1,01[a]	44,10±0,64[a]	36,80±2,83[b]	38,1±0,28[a]	39,60±0,28[b]	40,30±0,12[b]	0,05
SENSORIAL							
Valoración global por Cata¥	6,70 (B) (n=9)	7,11 (MB) (n=9)	7,44 (MB) (n=9)	5,2 (C) (n=7)	6,8 (B) (n=7)	6,5 (B) (n=7)	
Test de Preferencia	4(n=27)[b]	8(n=27)[b]	15(n=27)[a]	2(15)[b]	8(15)[a]	6(15)[a]	<0,05

*Acidez titulable, expresada, como ácido tartárico (g/L); # Acidez volátil, expresada en ácido acético (g/L); § Índice de polifenoles, expresada como ácido gálico (g/L); ¥ C: correcto, B:bueno y MB: muy bueno; (1) Contenido de ácido málico al finalizar la fermentación alcohólica; (2) Contenido de ácido málico al momento del embotellado; superíndices diferentes indican diferencias significativas entre vinos de la misma variedad (ANOVA y test de Tukey con n=2 para los resultados fisicoquímicos y test de Bonferroni para la prueba de preferencia); ns: no significativo dentro de cada lote.

CONCLUSIONES

La regularidad en la calidad fisicoquímica y la superioridad sensorial demostrada por los vinos elaborados con el cultivo mixto indígena *S. cerevisiae*F8-*P. kudriavzevii* I15 y la variedad Malbec, emblemática de la Argentina, así como su capacidad para intensificar significativamente el color de los vinos Pinotnoir, la variedad de uva emblemática de la norpatagonia argentina, constituyen un fuerte respaldo experimental respecto de la aptitud de esta dupla para ser usada en enología y proponer su producción industrial en la forma de levadura seca activa destinada a la elaboración de vinos tintos jóvenes y secos como los que mayoritariamente se producen en la Patagonia.

BIBLIOGRAFÍA

Alves Z, Melo A, Figueiredo AR, Coimbra MA, Gomes AC, Rocha SM. 2015.Exploring the*Saccharomyces cerevisiae*VolatileMetabolome: Indigenous versus CommercialStrains. PLoS ONE 10(11): e0143641. doi:10.1371/journal.pone.0143641.

Caballero AC, Sangorrín MP, Lopes CA, Rodríguez ME, Zajonskovsky IE, Barbagelata RJ, Lavalle TL.2008. Informe Técnico Final PFIP 2004, Resolución SCTIP N°215/04. Convenio 028/2005, COFECyT-MINCYT República Argentina.

Caballero AC, Crisóstomo B,Barbagelata RJ. 2005. Actas del X Congreso Latinoamericano de Vitivinicultura y Enología, Eds. Crivellaro Guerra, C.y de Souza Sebben, S. ISSN 1516–8107.

Caballero A. «Informe Final Proyecto Federal de Innovación Productiva (PFIP)Expediente SECTIP N º 0248/04. Anexo Nº I. Resolución SCTIP Nº 215/04 - Agencia UNComahue.» Neuquén, 2008.

Callejon RM, Clavijo A, Ortigueira P, Troncoso a M, Paneque P, Morales ML. Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. 2010. AnalyticaChimica Acta, 660: 68–75.
Catania C, Avagnina S. 2010. La interpretación sensorial del vino. Mendoza: Caviar Bleu. Págs. 316.
Carrau F, Gaggero C, Aguilar P.S. Yeast diversity and native vigor for flavor phenotypes. 2015. Trends in Biotechnology, 33(3): 149-154.
Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, Domizio P. 2010.Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces*yeasts in winemaking.FEMSYeastResearch, 10:123–133.
del Mónaco S., Rubio C., Barda N., Caballero A. 2011. Influencia de *Issatchenkiaorientalis* sobre la calidad fisicoquímica y sensorial de vinos Pinotnoir patagónicos. XIII CongresoArgentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CYTAL). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. 19-21/10/2011.
del Mónaco SM, Barda NB, Rubio NC, Caballero AC. 2014a. Selection and characterization of a Patagonian *Pichia kudriavzevii* for wine deacidification. Journal of Applied Microbiology, 117: 451-464.
del Mónaco S.M., Bravo S.M.E., Curilén Y.L., Carreño V.A., Caballero A.C. 2014b**.***Bulletin de l'OIV* 87 (998-999-1000): 217-224
del Mónaco SM, Rodríquez ME, Lopes CA. 2015. *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of North Patagonian winemaking terroir. International Journal of Food Microbiology,230:31-9
del Mónaco SM, Curilen Y, Maturano RC, Bravo SME, Simes AB and Caballero AC. 2016. The use of indigenous yeasts to develop high-quality Patagonian Wines. En: Morata A and Loira I Eds. Grape and Wine Biotechnology. Rijeka: InTech. pp. 325-344
Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. 1999.Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.85 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. International Journal of Systematic Bacteriology, 49: 329-337
Fleet G. 2008. Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Research, 8:979–995.
Fleet GH. Yeast interactions and wine flavour. 2003. International Journal of Food Microbiology, 86: 11–22.
Jolly NP, Varela C, Pretorius IS 2014. Not your ordinary yeast: non- *Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. FEMS Yeast Research, 14:215–37.
Le Guillou B. 2000. Río Negro. De la vignedans des oasis de la Patagonieargentine.LaVigne116:112-113.
Llorente A, Casazza M. 2005. El vino y su industria 40: 7-13
Meilgaard MC, Carr BT, Civille GV. 2006.Sensory Evaluation Techniques, Fourth Edition. Boca Ratón. CRC Press. Pags. 464
Muñoz-González C, Rodríguez-Bencomo JJ, Moreno-Arribas MV, Pozo-Bayón MA. 2011. Beyond the characterization of wine aroma compounds: looking for analytical approaches in trying to understand aroma perception during wine consumption. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 401(5): 1497–1512.
Pretorius IS. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast, 16(8):675–729.
Querol A, Ramón D. 1996.The application of molecular techniques in wine microbiology. Trends in Food Science & Technology, 7: 73–78.
Rodríguez ME, Lopes CA, Barbagelata RJ, Barda NB, Caballero AC. 2010.Influence of Candida pulcherrima Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. International Journal of Food Microbiology. 138(1-2):19-25.
Schuller D, Cardoso F, Sousa S, Gomes P, Gomes AC, Santos MAS, Casal M. Genetic Diversity and Population Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Different Grape Varieties and Winemaking Regions. 2012.PLoSOne 7: e32507. doi: 10.1371/journal.pone.0032507.

Suárez-Lepe JA, Morata A. 2012. New Trends in YeastSelection for Winemaking. Trends in Food Science and Technology, 23: 39-50.
Tufariello M, Chiriatti MA, Grieco F, Perrotta C, Capone S, Rampino P,Tristezza M, Mita G, Grieco F. 2014. Influence of autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains on volatile profile of Negroamarowines.LWT - Food Science and Technology, 58: 35–48.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se financió con subsidios otorgados por la Universidad Nacional del Comahue (PROIN 04/L003) y por el MINCyT (PICT SU 2012-2804).

Selección de factores de crecimiento para medio de cultivo a base de lactosuero permeado para producción de cepas probióticas de *Kluyveromyces marxianus*

Díaz Vergara, L. (1), Aminahuel, C. (1), Montenegro, M. (1), Pereyra, C. (2), Cavaglieri, L. (2)

(1) Centro de Investigaciones y Transferencia Villa María (CIT VM-CONICET), Av. Arturo Jauretche 1555, Villa María, Córdoba, Argentina.
(2) Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Fco-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.
Dirección de e-mail: lcavaglieri@exa.unrc.edu.ar

RESUMEN

El lactosuero es el principal subproducto de la industria quesera. La composición del suero de leche es variable, retiene hasta un 55% de los nutrientes de la leche. Los probióticos son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas generan un efecto positivo sobre la salud del huésped. La producción industrial de probióticos debe cuidar que las tecnologías de procesamiento empleadas garanticen su estabilidad. El diseño factorial Plackett-Burman permite la búsqueda de factores que tengan influencia sobre la respuesta a estudiar. En el presente trabajo fueron empleadas 3 cepas de levaduras probióticas *Kluyveromyces marxianus* VM003, VM004 y VM005 aisladas de lactosuero. El diseño de Plackett-Burman fue utilizado para evaluar el efecto de las variables independientes sobre la producción de biomasa para cada cepa, con ocho factores con dos niveles cada uno: permeado de lactosuero, extracto de levadura, NH_4SO_4, $MgSO_4$, KH_2PO_4, temperatura, agitación e inóculo. El diseño estadístico se realizó y analizó con el programa Design-Expert Version 7.0.0. Los factores que mostraron una influencia significativa sobre la producción de biomasa fueron: permeado de lactosuero, extracto de levadura, NH_4SO_4 e inóculo. Estos factores serán seleccionados para la optimización de la producción de biomasa de levadura probiótica, destinada a la formulación de alimentos funcionales.

Palabras Clave: Probióticos, *Kluyvermyces marxianus*, Lactosuero, Optimización

ABSTRACT

Whey is the main byproduct of the cheese industry. The composition of whey is variable, but could retain up to 55% of the nutrients in milk. Probiotics are defined as “live microorganisms which, when administered in adequate amounts, exert a beneficial effect on the health of the consumer”. The industrial production of probiotics must ensure that processing technologies used secure the stability of the microorganism. The factorial design Plackett-Burman allows the identification of influence factors on the response studied. In the present work three whey-native *Kluyveromyces marxianus* strains, VM003, VM004 and VM005 were used. The Plackett-Burman design was used to evaluate the influence of eight variables with two levels each: whey permeate, yeast extract, ammonium sulfate, magnesium sulfate, monopotassium phosphate, temperature, agitation and inoculum. The statistic design was performed and analyzed with Design-Expert Version 7.0.0. Factors that showed significant influence on biomass production were: whey permeate, yeast extract, ammonium sulfate and inoculum. These factors are going to be used for the probiotic biomass optimization for the formulation of functional food.

Key Words: Probiotics, *Kluyvermyces marxianus*, Whey, Optimization

INTRODUCCIÓN

La provincia de Córdoba ocupa un lugar importante del cinturón lechero argentino participando con un 37% de la producción nacional (Sanchez et al. 2012). Existen unas 350 plantas de industrialización que pueden procesar unos 5.500.000 litros/día; con una gran producción quesera que ocupa el primer lugar en el ámbito nacional. Se estima que de la producción de leche cruda en la provincia, un 60% se destina a la elaboración de quesos (40% de pasta blanda, 37% semidura y 17% de pasta dura), un 30% a leches preparadas, un 5% a leches fluidas y el 5% restante a otros productos (Garzón y Torre, 2010).

Dentro de las tres cuencas lecheras cordobesas, la de mayor importancia es la de Villa María con un 50% de la producción provincial. La cuenca lechera de Villa María obtiene la leche en un área territorial de 1581000 hectáreas, enclavada en el sector centro-sudeste del territorio provincial, dentro del departamento General San Martín en el cual la actividad agropecuaria es el principal motor económico (Sanchez et al., 2012).

El principal subproducto de la industria láctea es el lactosuero. Se estima que en la Argentina se producen anualmente 450 mil toneladas de suero líquido, de los cuales aproximadamente el 33% se destina a la obtención de lactosa y derivados proteicos y el 4-5% es transformado en suero en polvo. El 60% restante, se desecha como efluente o es aprovechado, con bajo nivel tecnológico, en la alimentación de cerdos y bovinos. Su descarte genera importantes problemas de contaminación ambiental, ya que presenta un índice de demanda biológica y química de oxígeno muy elevado. Si bien su composición es variable, retiene hasta un 55% de los nutrientes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales (Panesar et al 2007), siendo el lactosuero una fuente de microorganismos y potencial sustrato de bajo costo para la producción de biomasa celular.

Los probióticos son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas generan un efecto positivo sobre la salud del huésped (FAO/WHO, 2002). Se han descripto diferentes mecanismos de acción por la cual ejercen su efecto benéfico sobre el huésped, ya sea por una mejora en la digestión y absorción de nutrientes, estimulando tanto el sistema inmune innato como el adquirido, regulando la homeostasis microbiana, interfiriendo en la colonización de la mucosa por parte de patógenos, manteniendo o estabilizando la función de la barrera gastrointestinal, entre otras (Boirivant y Strober 2007; Oelschlaeger 2010).

La producción industrial de *Kluyveromyces marxianus* como probiótico debe cuidar que las tecnologías de procesamiento empleadas garanticen su estabilidad, tanto en términos de viabilidad (capacidad de reproducirse) como de actividad durante la vida útil (Carvalho et al., 2004; Maccaferri et al., 2012). Tres cepas fueron de *K. marxianus* fueron aisladas y caracterizadas por su potencial probiótico (Díaz-Vergara et al., 2017). Las levaduras presentan en general, mayor resistencia a cambios ambientales bruscos (gradientes de pH, cambios osmóticos, etc.) que las bacterias lácticas, así como menores requerimientos nutricionales que redundan en la reducción de costos en los procesos de producción. Además, la mayor ácido-tolerancia de los hongos respecto de las bacterias resulta una ventaja importante, tanto en las fermentaciones (ya que disminuye el riesgo de contaminación bacteriana) como en la calidad probiótica del producto obtenido. Todos estos factores resultarían beneficiosos durante la etapa de producción, así como durante el almacenamiento y consumo (de Llanos et al., 2006; Pedersen et al., 2012; Zivkovic et al., 2015).

Para llevar a cabo la producción de biomasa a gran escala, es necesaria la búsqueda de un sustrato económico como así también de las condiciones óptimas de producción. Los diseños estadísticos son una herramienta muy útil a la hora del diseño de medios de cultivos y condiciones operativas, con los modelos estadísticos se facilita el estudio de los diferentes factores y sus interacciones sobre la influencia del producto deseado, ya sea biomasa o un metabolito especifico (Xiong et al. 2007). Los diseños factoriales son utilizado para la selección de factores, con esto diseños estadísticos se pueden analizar las variables con diferentes niveles para la selección de las mismas, sin embargo no es posible determinar el grado de influencia que tienen sobre la respuesta deseada, solo se puede determinar una tendencia de la misma. Algunos

de los diseños factoriales utilizados son: factoriales, factoriales generales, D-optimal, Plackett-Burman, Taguchi.

El diseño factorial Plackett-Burman permite el análisis de numerosas variables en la búsqueda de los factores que tengan influencia sobre la variable-respuesta a estudiar, este modelo es utilizado como un estudio preliminar que permite la fijación o eliminación de las variables para poder ser optimizadas en diseños posteriores. Este diseño es utilizado principalmente cuando se tiene más de cinco factores a analizar ya que reduce el número de experiencias a realizar comparado con un diseño factorial completo, por ejemplo si se tienen 7 factores a analizar con un diseño Plackett-Burman se deben realizar 12 experiencias, mientras que con un diseño factorial completo se deben realizar 128 experiencias.

Los diseños de respuesta de superficie (RSM) son utilizados para la optimización de variables, con estos diseños se pueden determinar los puntos máximos o mínimos, o áreas donde la respuesta es estable en un rango de factores. Algunos de los diseños RSM son: Box-Behnken, RSM D-optimal, diseño de puntos centrales (conocido como CCD por sus siglas en inglés "Central Composite Design).

MATERIALES Y MÉTODOS

Levaduras utilizadas

En el presente trabajo fueron empleadas 3 cepas de levaduras *Kluyveromyces marxianus* VM003, VM004 y VM005 aisladas de lactosuero obtenido de diferentes etapas del proceso de producción de queso.

Muestreo

Las muestras de lactosuero fueron obtenidas de la Cooperativa "Las Cuatro Esquinas" ubicada a 8,59 Km al norte de la ciudad de Villa María, es una de las pequeñas y medianas empresas (PyMES) lácteas de mayor trayectoria en la zona, con más de 65 años de historia. La producción láctea de la cooperativa está destinada a la fabricación de diferentes quesos(port salut, sardo, barra, cremoso y holanda). Las muestras fueron recolectadas de diferentes etapas del proceso de la producción quesera y transportadas en forma refrigerada en cajas de telgopor conteniendo gel refrigerante hasta el laboratorio para su inmediato análisis.

Obtención del Permeado de Lactosa

Pretratamiento de la muestra de lactosuero

Las muestras de lactosuero se centrifugaron a 3500 rpm, durante 10 min a temperatura ambiente, luego con espátula se quitó el sobrenadante de materia grasa (MG) y por último se filtró con gasa utilizando un con embudo Büchner. Este procedimiento se realizó para evitar el daño de las membranas del equipo de ultrafiltración.

Ultrafiltración

La ultrafiltración se realizó utilizando el equipo VivaFlow 50R (Sartorius) utilizando membranas de 50 KDa, 30 KDa y 10 KDa. En primer lugar, se circuló agua bidestilada por las membrana para la remoción de la solución de mantenimiento y para que la misma no interfiera en el producto final deseado. Luego se colocó la muestra en el recipiente, se conectaron las mangueras a la membrana de 50 KDa como se encuentra indicado en la **figura 1** y se encendió la bomba peristáltica, aumentando la potencia hasta llegar a 2,5 Bar de presión. Se dejó recircular el lactosuero por la membrana durante cuatro horas. Se utilizaron dos litros de lactosuero y cada filtrado obtenido de la ultrafiltración fue filtrado nuevamente por la membrana de 30 KDa y 10 KDa.

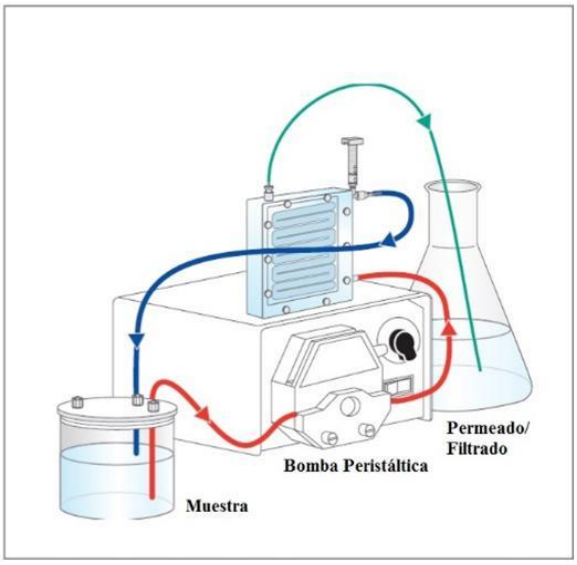


Figura 1. Esquema de equipo de Ultrafiltración

Selección de factores de crecimiento para la preparación del medio de cultivo

Se utilizó el diseño de selección de Plackett-Burman para evaluar el efecto de las variables independientes sobre la producción de biomasa por parte de las cepas estudiadas (Plackett y Burman 1946). Se realizó un diseño para cada cepa de *K. marxianus* utilizando al lactosuero o al permeado de lactosa como medio base para evaluar el efecto de ocho factores con dos niveles, como se muestra en la **tabla 1**.

Tabla 1. Factores y niveles del diseño Plackett-Burman.

Factor	**Nivel**	
	-1	**+1**
Permeado de lactosa/Lactosuero (%)	50	100
Extracto de levadura (g/L)	0	3
Sulfato de Amonio (g/L)	0	3
Sulfato de Magnesio	0	1,5
Fosfato di ácido de Potasio (g/L)	0	3
Temperatura (ºC)	25	45
Agitación (rpm)	100	300
Inóculo (Log_{10})	6	8

Las ocho variables fueron evaluadas con corridas con tres puntos centrales. Para los diseños con lactosuero se utilizó el logaritmo en base diez de las UFC/mL y para los con permeado de lactosa se utilizó el peso seco (g/L). Los diseños fueron realizados y analizados por el programa Design-Expert Version 7.0.0. Las condiciones de cultivo se encuentran presentadas en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Diseño de Plackett-Burman para la producción de biomasa.

	Permeado (%)	Ext. de lev. (g/L)	$SO_4(NH_4)_2$ (g/L)	SO_4Mg (g/L)	KH_2PO_4 (g/L)	Temp. (ºC)	Agitación (rpm)	Inóculo (Log_{10})
1	50	1,5	3	1,5	0	25	100	6
2	50	0	0	1,5	0	45	300	8
3	50	0	3	0	3	45	100	8
4	100	1,5	0	1,5	3	45	100	6
5	75	0,75	1,5	0,75	1,5	35	200	7
6	50	0	0	0	0	25	100	6
7	50	1,5	0	1,5	3	25	300	8
8	100	0	3	1,5	0	45	300	6
9	75	0,75	1,5	0,75	1,5	35	200	7
10	75	0,75	1,5	0,75	1,5	35	200	7
11	50	1,5	3	0	3	45	300	6
12	100	1,5	3	0	0	25	300	8
13	100	0	0	0	3	25	300	6
14	100	0	3	1,5	3	25	100	8
15	100	1,5	0	0	0	45	100	8

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diseño de selección de factores Plackett-Burman

En la **Tabla 4** se pueden observar los resultados de peso seco obtenidos para las tres cepas de *K. marxianus*

Tabla 3. Diseño de Plackett-Burman para *K. marxianus* VM003

	Peso seco (g/L) VM003	Peso seco (g/L) VM004	Peso seco (g/L) VM005
1	6,17	6,1	5,83
2	11,1	9,53	9,7
3	3,67	4,3	4
4	4,03	5,4	3,33
5	7,87	8,53	8,03
6	3,23	2,53	1,15
7	11,23	8,33	10,3
8	9,5	7,5	6,83
9	8,2	7,73	10,93
10	8,67	8,3	7,03
11	5,67	8,27	8,97
12	15,47	14,17	12,4
13	4,47	4,9	3,5
14	13,1	10,7	9,53

15	3,6	4,13	3,9

El análisis del diseño de selección de factores de Plackett-Burman para la cepa *K. marxianus* VM003 mostró que el modelo estudiado se ajusta, con un $p< 0,05$, también el coeficiente de regresión linear R^2 fue 0,9984 y el coeficiente de determinación ajustado fue 0,9887, indicando que el modelo de Plackett-Burman es adecuado para estos resultados del diseño experimental. En la **Tabla 5** se encuentran los resultados del ANOVA realizado para el diseño de Plackett-Burman, con estos resultados se pudo determinar que los factores permeado de lactosa, extracto de levadura, sulfato de amonio e inóculo inicial son influyentes sobre la producción de biomasa de la cepa *K. marxianus* VM003 ya que estos tuvieron un valor de *p* menor a 0,05. En las **figuras 2**, **3** y **4** se pueden observar una representación gráfica de la influencia de los factores seleccionados con el diseño de Plackett-Burman sobre la biomasa de la levadura *K. marxianus* VM003.

Tabla 4. ANOVA del diseño de Plackett-Burman de *K. marxianus* VM003

	Suma de cuadrados	Df	Promedio de Cuadrados	Valor de F	Valor de *p*
Modelo	201,07037	12	16,7558644	103,6659	0.0096
A-Permeado	6,9008333	1	6,90083333	42,69437	**0.0226**
B-Extracto de levadura	3,267	1	3,267	20,212415	**0.0461**
C-$SO_4(NH_4)_2$	27,355339	1	27,3553389	169,24318	**0.0059**
D-SO_4Mg	0,2676681	1	0,26766806	1,6560201	0.3270
E-KH_2PO_4	0,4817551	1	0,48175513	2,9805432	0.2264
F-Temperatura	0,7307337	1	0,73073373	4,5209346	0.1674
G-Agitación	0,1741227	1	0,17412273	1,0772699	0.4083
H-Inóculo	20,3136	1	20,3136	125,67705	**0.0079**
AB	0,7255515	1	0,72555152	4,4888731	0.1683
AC	3,5980015	1	3,59800152	22,260269	**0.0421**
AE	2,6360015	1	2,63600152	16,308527	0.0562
ABC	0,9933067	1	0,99330667	6,145432	0.1314
Error Puso	0,3232667	2	0,16163333		
Cor Total	201,39364	14			

Ecuación del modelo para *K. marxianus* VM003

$$Pesoseco = 8{,}82 + 0{,}76A + 2{,}48B + 1{,}85C - 0{,}73D - 0{,}51E + 2{,}26F + 1{,}84H - 1{,}73AB + 3{,}85AC + 3{,}30AE + 1{,}93ABC$$

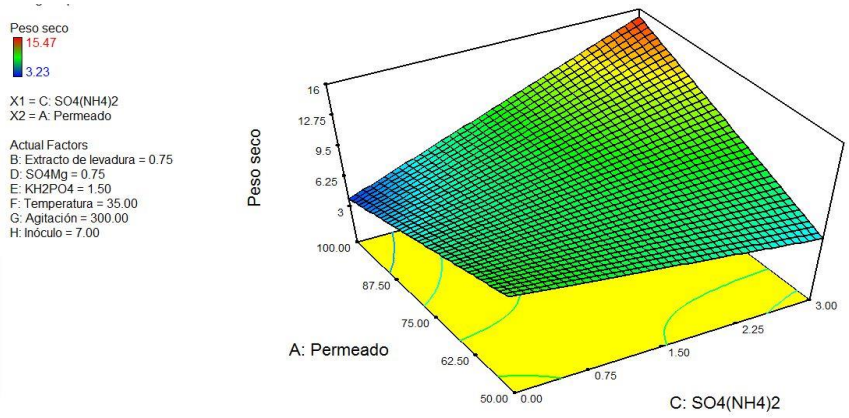


Figura 2. Influencia del permeado de lactosa (%) y sulfato de amonio (g/L) sobre el peso seco (g/L) de *K. marxianus* VM003

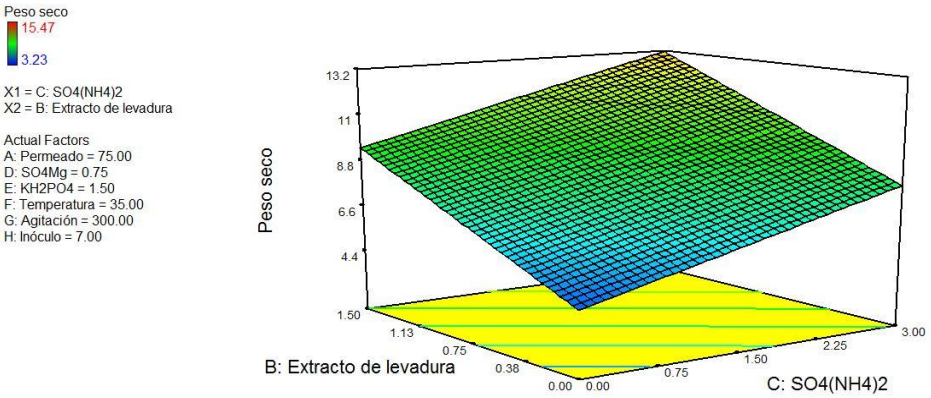


Figura 3. Influencia del extracto de levadura (g/L) y sulfato de amonio (g/L) sobre el peso seco (g/L) de *K. marxianus* VM003

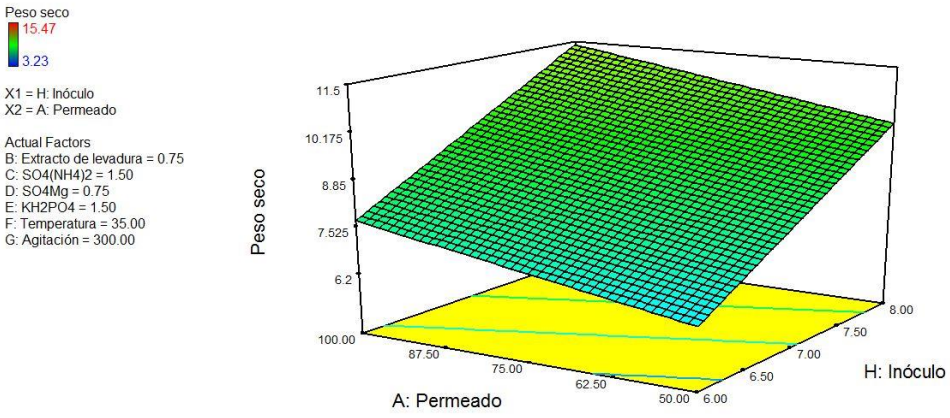


Figura 4. Influencia del permeado de lactosa (%) e inóculo (Log_{10}) sobre el peso seco (g/L) de *K. marxianus* VM003

El análisis del diseño de selección de factores de Plackett-Burman para la cepa *K. marxianus* VM004 mostró que el modelo estudiado se ajusta con un *p* menor al 0,05. El coeficiente de regresión linear R^2 fue 0,9972 y el coeficiente de determinación ajustado fue 0,9804, indicando que el modelo de Plackett-Burman es adecuado para estos resultados del diseño experimental. Los factores permeado de lactosa, extracto de levadura, sulfato de amonio e inóculo mostraron una influencia estadísticamente significativa sobre la producción de biomasa de la cepa *K. marxianus* VM004 (**Tabla 6**). En las **figuras 15**, **16** y **17** se pueden observar una representación gráfica de la influencia de los factores seleccionados con el diseño de Plackett-Burman sobre la biomasa de la levadura *K. marxianus* VM004.

Tabla 5. ANOVA del diseño de Placket-Burman de *K. marxianus* VM004

	Suma de cuadrados	Df	Promedio de Cuadrados	Valor de F	Valor de *p*
Model	120,68551	12	10,0571256	59,287437	0.0167
A-Permeado	4,9923	1	4,9923	29,429947	**0.0323**
B-Extracto de levadura	7,929307	1	7,92930704	46,743803	**0.0207**
C-$SO_4(NH_4)_2$	35,729422	1	35,7294222	210,62737	**0.0047**
D-SO_4Mg	2,9808681	1	2,98086806	17,572419	0.0525
E-KH_2PO_4	0,7153962	1	0,71539615	4,2173088	0.1764
F-Temperatura	3,0800778	1	3,08007778	18,157267	0.0509
G-Agitación	0,0196909	1	0,01969091	0,1160792	0.7658
H-Inóculo	13,290817	1	13,2908167	78,350265	**0.0125**
AB	2,0423045	1	2,04230455	12,039524	0.0740
AC	5,2305515	1	5,23055152	30,834456	**0.0309**
AE	6,5236742	1	6,52367424	38,457502	**0.0250**
ABC	2,5544067	1	2,55440667	15,0584	0.0604
Pure Error	0,3392667	2	0,16963333		
Cor Total	121,02477	14			

R^2 = 0,9972 R^2 Ajustado = 0,9804

Ecuación del modelo para *K. marxianus* VM004

$$Pesoseco = 8{,}00 + 0{,}65A + 3{,}86B + 2{,}11C - 2{,}44D - 0{,}62E + 4{,}64F - 0{,}19G + 1{,}49H - 2{,}90AB + 4{,}65AC + 5{,}19AE + 3{,}10ABC$$

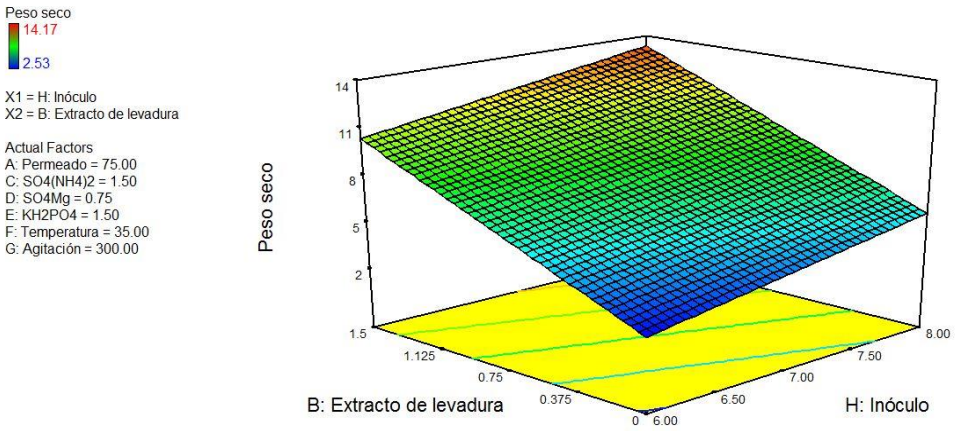


Figura 5. Influencia del extracto de levadura (g/L) e inóculo (Log_{10}) sobre el peso seco (g/L) de *K. marxianus* VM004

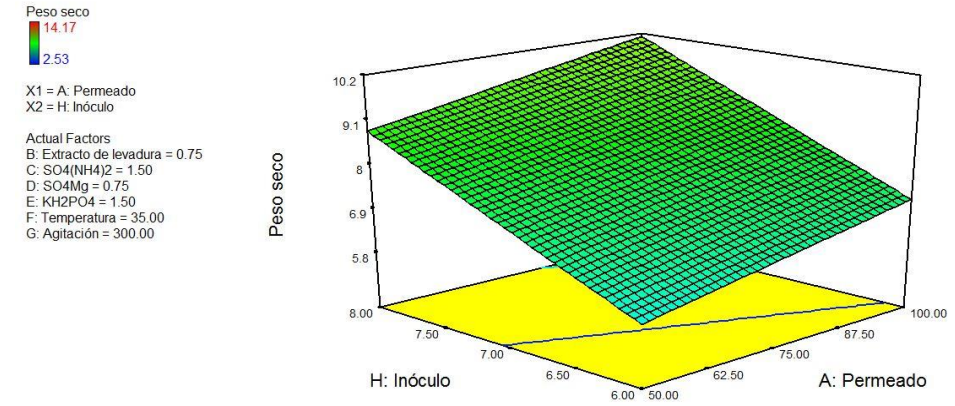


Figura 6. Influencia del permeado de lactosa (%) e inóculo (Log_{10}) sobre el peso seco (g/L) de *K. marxianus* VM004

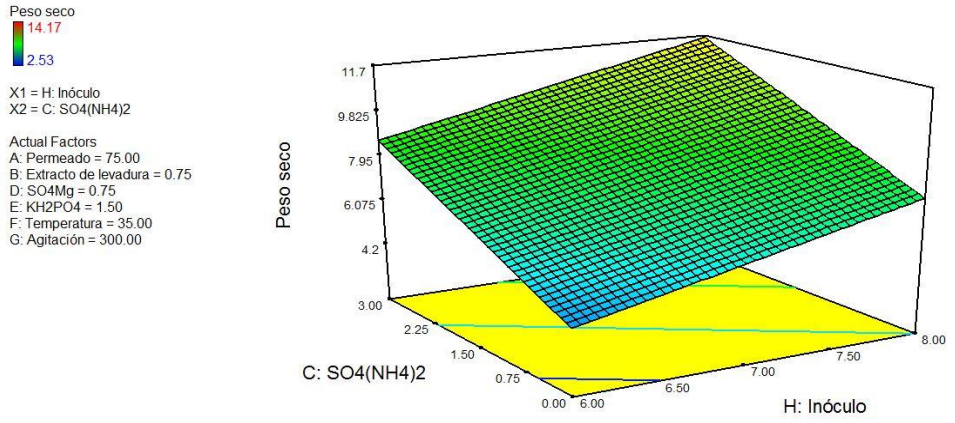


Figura 7. Influencia del inóculo (Log10) y sulfato de amonio (g/L) sobre el peso seco (g/L) de *K. marxianus* VM003

Para la cepa *K. marxianus* VM005 el modelo no se ajustó, obteniéndose un *p* mayor a 0,05, el coeficiente de regresión linear R^2 fue 0,9467 y el coeficiente de determinación ajustado fue 0,627. Ninguno de los factores evaluados tuvo un efecto significativo sobre la producción de biomasa de la cepa. Se debe repetir el experimento para confirmar o rechazar estos resultados.

Tabla 6. ANOVA del diseño de Placket-Burman de *K. marxianus* VM005

	Suma de cuadrados	df	Promedio de Cuadrados	Valor de F	Valor de *p*
Model	145,85871	12	12,15489222	2,9621996	0.2799
A-Permeado	0,0176333	1	0,017633333	0,0042973	0.9537
B-Extracto de levadura	19,44075	1	19,44075	4,7377945	0.1614
C-$SO_4(NH_4)_2$	22,400356	1	22,40035556	5,4590631	0.1445
D-SO_4Mg	9,9383681	1	9,938368056	2,4220231	0.2599
E-KH_2PO_4	5,6808013	1	5,680801282	1,3844357	0.3604
F-Temperatura	11,60574	1	11,60573968	2,8283687	0.2346
G-Agitación	2,7613636	1	2,761363636	0,6729562	0.4982
H-Inóculo	23,2854	1	23,2854	5,6747522	0.1401
AB	11,201456	1	11,20145606	2,7298431	0.2403
AC	14,410691	1	14,41069091	3,5119474	0.2018
AE	15,120123	1	15,12012273	3,684839	0.1949
ABC	10,020507	1	10,02050667	2,4420406	0.2585
Pure Error	8,2066667	2	4,103333333		
Cor Total	154,06537	14			

R^2 = 0,9467 R^2 Ajustado = 0,6272

Ecuación del modelo para *K. marxianus* VM005

$$Peso\ seco = 6{,}41 - 0{,}04A + 6{,}04B + 1{,}67C - 4{,}46D - 1{,}75E + 9{,}01F - 2{,}25G + 1{,}97H - 6{,}80AB + 7{,}71AC + 7{,}90AE + 6{,}13ABC$$

Al realizar el diseño de selección Plackett-Burman con permeado de lactosa como medio base, se observó que éste se adaptaba para el análisis de las cepas *K. marxianus* VM003 y VM004, mientras que es necesario repetir la fase experimental para la cepa *K. marxianus* VM005. En todos los casos la concentración de permeado de lactosa, el extracto de levadura, el sulfato de amonio, la concentración de inóculo fueron factores influyentes sobre la producción de biomasa, los cuales deben ser utilizados en el futuro diseño de optimización para la búsqueda de las mejores condiciones de cultivo y así determinar las óptimas condiciones de producción de biomasa celular.

CONCLUSIONES

Los factores que mostraron una influencia significativa sobre la producción de biomasa fueron: permeado de lactosuero, extracto de levadura, sulfato de amonio e inóculo. Estos factores serán seleccionados para la optimización del medio de cultivo a base de lactosuero permeado para la producción de biomasa de levadura probiótica, destinada a la formulación de alimentos funcionales.

BIBLIOGRAFÍA

Boirivant, M., & Strober, W. (2007). The mechanism of action of probiotics. Current Opinion in Gastroenterology, 23(6), 679–692. http://doi.org/10.1097/MOG.0b013e3282f0cffc

Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., & Gibbs, P. (2004). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. International Dairy Journal, 14(10), 835–847. http://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.02.001

de Llanos, R., Querol, A., Pemán, J., Gobernado, M., & Fernández-Espinar, M. T. (2006). Food and probiotic strains from the Saccharomyces cerevisiae species as a possible origin of human systemic infections. International Journal of Food Microbiology, 110(3), 286–290. http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.023

Díaz-Vergara, L., Pereyra, C. M., Montenegro, M., Pena, G. A., Aminahuel, C. A., & Cavaglieri, L. R. (2017). Encapsulated whey–native yeast Kluyveromyces marxianus as a feed additive for animal production. Food Additives & Contaminants: Part A, 0(0), 1–10. http://doi.org/10.1080/19440049.2017.1290830

FAO/WHO. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. World Health Organization, 1–11.

Garzón, J. M., & Torre, N. (2010). La Cadena Láctea en la Provincia de Córdoba y en Argentina, 1–100.

Maccaferri, S., Klinder, A., Brigidi, P., Cavina, P., & Costabile, A. (2012). Potential probiotic Kluyveromyces marxianus B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. Applied and Environmental Microbiology, 78(4), 956–964. http://doi.org/10.1128/AEM.06385-11

Oelschlaeger, T. a. (2010). Mechanisms of probiotic actions - A review. International Journal of Medical Microbiology, 300(1), 57–62. http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2009.08.005

Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. Food Chemistry, 105(1), 1–14. http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035

Pedersen, L. L., Owusu-Kwarteng, J., Thorsen, L., & Jespersen, L. (2012). Biodiversity and probiotic potential of yeasts isolated from Fura, a West African spontaneously fermented cereal. International Journal of Food Microbiology, 159(2), 144–151. http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.016

Plackett, R. L., & Burman, J. . (1946). The desing of optimum multifactorial experiments. Biometrika Trust, 33(4), 305–325. http://doi.org/10.1093/biomet/81.3.425

Sanchez, C., Castignani, H., Marino, M., & Suero, M. (2012). Asociación Argentina de Economía Agraria, La lechería argentina: Estado actual y su evolución.

Xiong, C., Jinhua, W., & Dongsheng, L. (2007). Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. Biochemical Engineering Journal, 34(2), 179–184. http://doi.org/10.1016/j.bej.2006.12.012

Zivkovic, M., Cadez, N., Uroic, K., Miljkovic, M., Tolinacki, M., Dousova, P., … Golic, N. (2015). Evaluation of probiotic potential of yeasts isolated from traditional cheeses manufactured in Serbia and Croatia. Journal of Intercultural Ethnopharmacology, 4(1), 12. http://doi.org/10.5455/jice.20141128051842

Estabilidad coloidal de microcápsulas de aceite de lino frente a condiciones gastrointestinales simuladas in vitro

Fioramonti S.A. (1), Visentini F.F. (1), Santiago L.G. (1)

(1) Instituto de Tecnología de Alimentos – Facultad de Ingeniería Química – Universidad Nacional del Litoral, 1° de Mayo 3250, Santa Fe, Argentina.
Dirección de e-mail: sfioramonti@fiq.unl.edu.ar

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la estabilidad coloidal de microcápsulas de aceite de lino en polvo en condiciones gastrointestinales simuladas in vitro. Las microcápsulas se obtuvieron formulando emulsiones doble-capa que luego fueron secadas por aspersión. Como material encapsulante se utilizaron proteínas lácteas (WPC), alginato de sodio (AS) y maltodextrina. Las microcápsulas fueron incubadas en un fluido gástrico simulado a pH 3 (37°C, 2h). Los productos recuperados de este medio se incubaron luego en un fluido intestinal simulado a pH 7 (37°C, 2h). Luego de cada digestión se tomaron alícuotas para caracterizarlas mediante microscopía óptica, determinación de tamaño de gota y potencial zeta. A pH 3 se observaron gotas floculadas con una carga superficial cercana a la neutralidad y tamaños superiores a 10 μm. A pH 7, las gotas volvieron a redispersarse individualmente exhibiendo tamaños similares a los observados en las emulsiones no digeridas (control). En condiciones gástricas, el aceite permanecería protegido dentro de la estructura floculada. Sin embargo, a pH 7, se desestabilizaría la doble capa interfacial por repulsión electrostática entre el WPC y el AS, quedando más expuesta la proteína alrededor de las gotas para el ataque de las proteasas intestinales y la liberación del compuesto bioactivo.

Palabras Clave: Aceite de lino – Microcápsulas – Proteínas lácteas – Alginato de sodio - Digestión gastrointestinal

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate colloidal stability of powdered flaxseed oil microcapsules under in vitro simulated gastro-intestinal conditions. Microcapsules were obtained by formulating double-layer emulsions which were then spray-dried. Milk whey proteins (WPC), sodium alginate (SA) and maltodextrin (MD) were used as encapsulating materials. Microcapsules were incubated in a simulated gastric fluid at pH 3 (37°C, 2h). Samples collected from gastric phase were then incubated in a simulated intestinal fluid at pH 7 (37°C, 2h). After each digestion step, aliquots of samples were taken to characterize them by optical microscopy, droplet size and zeta potential measurements. At pH 3 emulsion droplets were completely flocculated, showing a net surface charge close to neutrality and droplet sizes higher than 10 μm. At pH 7, emulsion droplets were redispersed again as individual droplets showing sizes similar to that obtained for non-digested emulsions (control). In gastric conditions, flaxseed oil would remain protected within the flocculated structure. However, at pH 7 the double interfacial layer surrounding the droplets would be disassembled because of electrostatic repulsion between WPC and AS, thus remaining a protein monolayer around the droplets which would be more exposed to intestinal proteases so as to release the bioactive compound.

Keywords: Flaxseed oil – Microcapsules – Milk proteins – Sodium alginate – Gastrointestinal digestion.

INTRODUCCIÓN

El mercado de alimentos funcionales con ingredientes bioactivos que aporten efectos beneficiosos a la salud se encuentra en expansión tanto en Argentina como a nivel mundial, lo que ha llevado a la industria alimentaria a centrar su investigación en este tipo de productos (Carneiro *et al*. 2013). Dentro de los nutracéuticos, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) ω-3 han sido relacionados con diversos mecanismos cardioprotectores (Endo y Arita 2015, Petrova et al. 2011). Según Simopoulos (2008) el desbalance ω-3/ω-6 que existe hoy en día en la dieta occidental moderna – por un exceso en el consumo de ω-6 - podría estar relacionado con el incremento de enfermedades y/o desórdenes en el organismo, entre ellos, los que contribuyen a la formación de placas de ateroma, a la proliferación de células cancerosas y al desarrollo de enfermedades autoinmunes. Es por ello que resulta importante enriquecer alimentos con PUFAs ω-3 para contrarrestar este desbalance en la dieta. Uno de los compuestos más comunes de la familia de los PUFAs ω-3 es alfa-linolénico (ALA) que puede encontrarse en aceites vegetales tales como el lino, donde representa el 57% de los ácidos grasos totales. Como los PUFAs son susceptibles al deterioro oxidativo,la microencapsulación de estos compuestos constituye una excelente alternativa para mejorar su estabilidad (Garg et al. 2006). No obstante, para proponer la incorporación de las microcápsulas de aceite a una matriz alimentaria, hay que tener en cuenta no sólo la estabilidad del compuesto bioactivo durante la vida útil del producto sino también el comportamiento de liberación durante el tracto gastrointestinal una vez ingerido el alimento (Calvo et al. 2012). El recubrimiento puede ser lo suficientemente efectivo para proteger el compuesto frente a la oxidación durante el almacenamiento pero si la estructura de la microcápsula no logra desensamblarse durante el tracto gastrointestinal, entonces no va a ser un buen sistema de liberación.Por eso es importante evaluar la digestibilidad de las microcápsulas frente a condiciones gastrointestinales (Klinkesorn y McClements 2009).

En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la estabilidad coloidal de microcápsulas de aceite de lino en polvo durante un proceso de digestión en fluidos gástricos e intestinales simulados in vitro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El aceite de lino fue gentilmente provisto por la empresa CIDA (Nogoyá, Entre Ríos). Se utilizó además un concentrado de proteínas de suero lácteo (WPC) donado por Arla Foods (Córdoba, Argentina), siendo su composición en base seca (%p/p): 80.85% proteína, 7.45% grasas, 8.62% lactosa y 3.08% cenizas. La muestra de alginato de sodio (AS) de baja densidad fue suministrada por Cargill (Buenos Aires, Argentina) y la maltodextrina (MD) DE 15 fue donada por Productos de Maíz SA (Buenos Aires, Argentina). Para evaluar la estabilidad coloidal de las microcápsulas frente a la digestión gastrointestinal simulada in vitro se utilizó pepsina porcina (Sigma Aldrich) y pancreatina porcina (8 X USP), ambas provistas por Sigma Aldrich. Los demás reactivos de alta pureza también fueron adquiridos en Sigma y fueron de grado analítico.

Preparación de microcápsulas de aceite en polvo

Se prepararon emulsiones multicapa mezclando 10% de aceite de lino y 90% de una solución acuosa de WPC y AS, mediante agitación en un Waring blender. Para disminuir el tamaño de gota, estas pre-emulsiones fueron luego procesadas en un homogeneizador de válvula de alta presión (SIMES, Argentina) a 10 MPa. A la formulación también se le agregó una solución de MD para aumentar el contenido de sólidos de los sistemas y se ajustó el pH a 5 mediante el agregado de HCl para promover la formación de la bicapa interfacial WPC-AS (Fioramonti et al. 2015a) de manera de obtener emulsiones secundarias. Estas últimas fueron deshidratadas en un secadero spray (Yamato ADL311S, China).

Digestión gastrointestinal in vitro

La digestión de las microcápsulas se simuló en dos etapas siguiendo un protocolo internacional estandarizado (Minekus et al. 2014). En primer lugar, las microcápsulas fueron rehidratadas para reconstituir las emulsiones secundarias a pH 5. Estas emulsiones se mezclaron en una relación 1:1 con un fluido gástrico simulado (FGS), que consistió en una mezcla de electrolitos (KCl 6.9 mM, KH_2PO_4 0.9 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, NaCl 47.2 mM, $MgCl_2$ 0.1 mM, $(NH_4)_2CO_3$ 0.5 mM, $CaCl_2$ 0.075 mM) y pepsina a pH 3, y se llevó a incubación durante 2 hs a 37°C en agitación continua. Luego, los productos recuperados de este medio se volvieron a mezclar en una relación 1:1 con un fluido intestinal simulado (FIS) que consistió en una mezcla de electrolitos (KCl 6.8 mM, KH_2PO_4 0.8 mM, $NaHCO_3$ 85 mM, NaCl 38.4 mM, $MgCl_2$ 0.33 mM, $CaCl_2$ 0.3 mM) y pancreatina porcina a pH 7, y se llevó a incubación durante 2 hs a 37°C en agitación.

Para analizar la influencia del pH, de la presencia de electrolitos y de las enzimas digestivas sobre la estabilidad coloidal de las microcápsulas durante el proceso de digestión simulado in vitro, se realizó un estudio en 3 etapas, que comprendió la incubación de las microcápsulas en FGS y FIS durante 2 h a 37°C (i) sin el agregado de electrolitos ni enzimas, es decir, sólo ajustando el pH del medio a 3 y 7, (ii) agregando electrolitos pero sin enzimas, y (iii) conteniendo electrolitos y enzimas, es decir, el proceso de digestión completo. Al final de cada uno de los procesos de digestión gástrica e intestinal se tomaron alícuotas para analizar la evolución del sistema mediante las técnicas que se describen a continuación.

Microscopía óptica

Las muestras se agitaron adecuadamente antes de realizar la microscopía para garantizar su homogeneidad. Luego se colocó una gota de muestra fresca entre un porta y un cubreobjetos y se observó en un microscopio óptico convencional en un aumento 40X (Leica Microsystems, Alemania). Durante la observación de los sistemas, se seleccionaron varios campos y se tomaron fotografías de los más representativos.

Distribución de tamaños de gota

Se realizaron determinaciones de distribución de tamaños de gota por dispersión de luz dinámica (DLS) en un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra) provisto con una fuente de luz láser He-Ne (632,8 nm). Las mediciones fueron realizadas a un ángulo fijo de 90°. El rango de medición del equipo varió entre 0,6- 6000 nm. Para realizar las correspondientes diluciones de los sistemas a analizar, se empleó agua destilada filtrada libre de partículas, utilizando membranas de nitrocelulosa Merck Millpore (Cork, Irlanda) de 0,45 μm. Los índices de refracción usados para la fase dispersa y continua fueron 0.93 y 1.33, respectivamente (Fioramonti et al. 2015a).

Determinación de potencial zeta

Para determinar la carga neta superficial de las microcápsulas digeridas, se realizaron mediciones de potencial zeta (ζ) a un ángulo fijo de 90°. Para ello, se empleó el mismo equipo Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Inglaterra). Los sistemas fueron previamente diluidos con agua destilada filtrada libre de partículas (con filtros de 0.45 μm) y luego se inyectaron en una celda capilar provista de dos electrodos a cada lado para la medición del potencial zeta (Fioramonti et al. 2015a).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, las microcápsulas de aceite de lino en polvo fueron rehidratadas para obtener las emulsiones correspondientes a pH 5 antes de ser sometidas al proceso de digestión. La **Fig. 1A** muestra la microestructura de las emulsiones reconstituidas, donde se pueden observar gotas individuales de tamaños alrededor de 1-3 μm con la presencia de algunos agregados de gotas que no lograron redispersarse completamente, de tamaños alrededor de 10-15 μm.

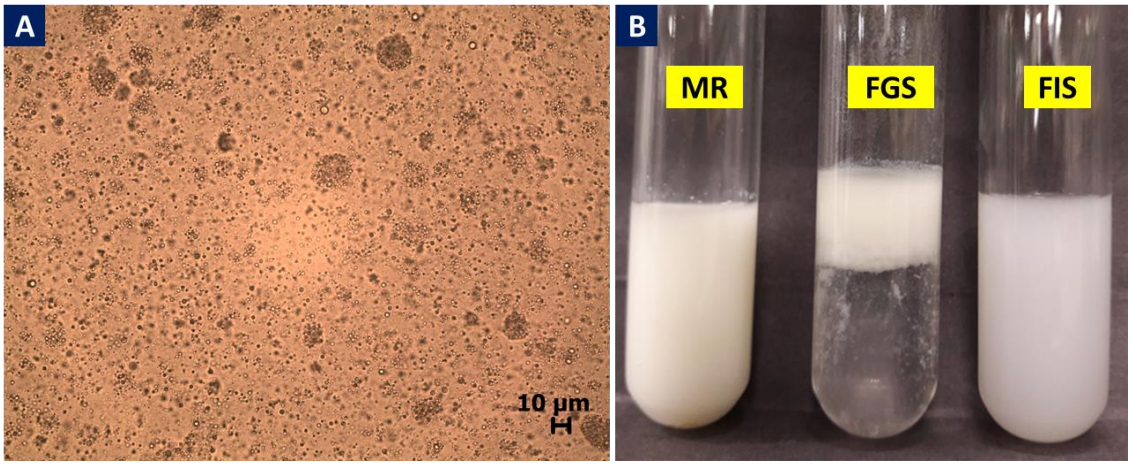


Figura 1. (A) Micrografía de microcápsulas rehidratadas. (B) Vista macroscópica de las microcáspulas rehidratadas (MR) y sometidas a digestión gástrica (FGS) e intestinal (FIS).

Por otro lado, la **Fig. 1B** muestra la apariencia macroscópica tanto de las microcápsulas rehidratadas (MR) como de los sistemas sometidos al proceso de digestión gástrica (FGS) e intestinal (FIS). La emulsión reconstituida a partir de las microcápsulas presentó una única fase de composición homogénea a lo largo de todo el tubo (**Fig. 1B**). Sin embargo, cuando los sistemas se incubaron en un FGS, al final de la digestión presentaron una separación de fases macroscópica, con una fase crema en la parte superior del tubo y otrafase suero bastante límpida en la parte inferior. Cuando se completó el proceso de digestión en un FIS, los sistemas volvieron a presentar una sola fase de apariencia homogénea.

En la **Fig. 2** se presentan las micrografías de las microcápsulas sometidas a los diferentes procesos de digestión en FGS y en FIS, conteniendo sólo electrolitos o electrolitos y enzimas digestivas. En los sistemas sometidos únicamente a la digestión gástrica a pH 3 (**Fig. 2A** y **2C**), puede observarse la presencia de gotas completamente floculadas que formaron agregados. En el caso de la digestión en un FGS conteniendo sólo electrolitos (**Fig. 2A**), el tamaño de los flóculos fue superior a los 20 µm, mientras que el agregado de pepsina al medio promovió la reducción del tamaño de estos agregados (**Fig. 2C**). Esto último pudo haberse debido a la acción parcial de la proteasa sobre la interfase proteica expuesta de algunas gotas de emulsión. Según la ley de Stokes (McClements 1999), los flóculos formados cremarían mucho más rápido que las gotas de emulsión individuales, debido a su mayor tamaño y esto sería consistente con separación de fases macroscópica observada en la **Fig. 1B**.

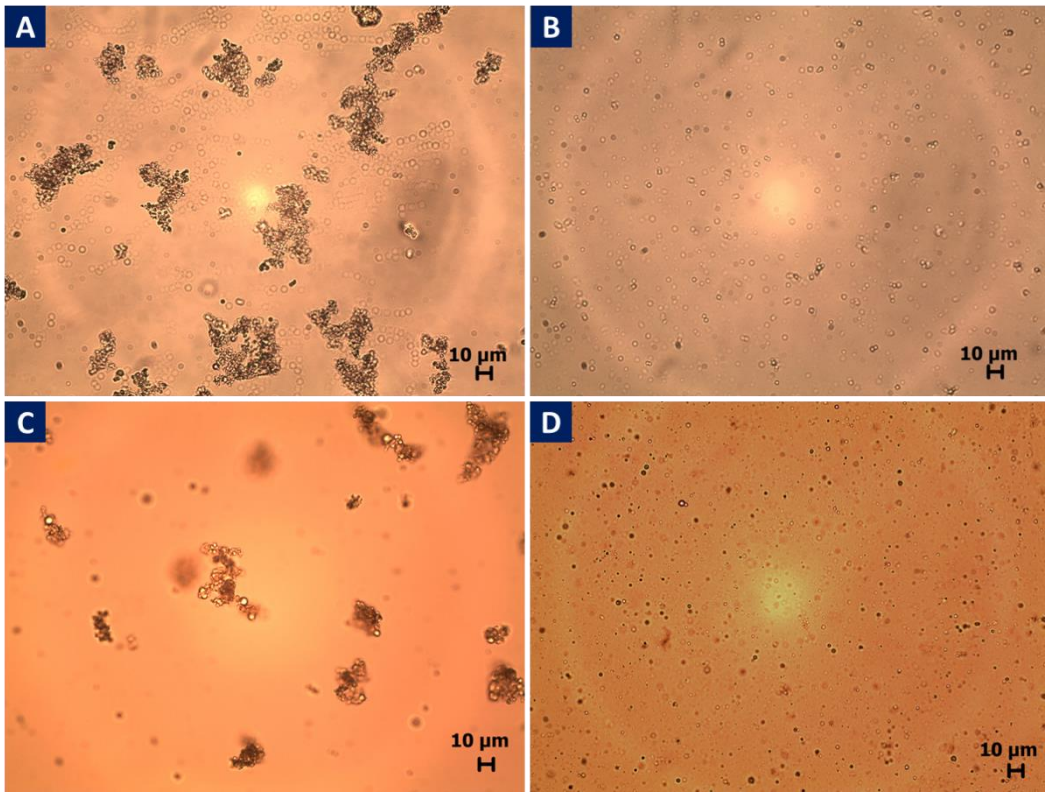


Figura 2. Micrografías de microcápsulas digeridas en FGS (A y B) y en FIS (B y D), en medios con electrolitos sin enzimas (A y B) y con enzimas (C y D).

Por otro lado, cuando las microcápsulas fueron sometidas a la digestión intestinal a pH 7 (**Fig. 2B** y **2D**), las gotas de emulsión volvieron a redispersarse individualmente y no se detectó la presencia de agregados y/o flóculos. Además, no se observaron diferencias entre las micrografías de los sistemas digeridos en un FGS conteniendo sólo electrolitos (**Fig. 2B**) y conteniendo electrolitos y pancreatina (**Fig. 2D**). Cabe aclarar que las micrografías de los sistemas sometidos a digestión en FGS y FIS a pH 3 y pH 7 respectivamente, sin electrolitos ni enzimas, no se mostraron dado que fueron similares a las observadas en las **Fig. 2A** y **2B**.

Luego se procedió a medir la distribución de tamaños de gota sólo de los sistemas sometidos a la digestión completa (FIS), dado que los incubados en FGS mostraron flóculos de tamaños superiores al límite que permite detectar el equipo de DLS (<6µm). Estos resultados se muestran en la **Fig. 3**. En primer lugar, se puede observar que las microcápsulas rehidratadas a pH 5 presentaron una distribución de tamaños de gota monomodal entre 0.6-3µm. Cuando estos sistemas fueron sometidos a una digestión gastrointestinal completa y se incubaron en medios sin electrolitos ni enzimas (es decir, sólo ajustando el valor de pH al que correspondiere), al final del proceso se observaron dos poblaciones de gotas (i) una mayoritaria entre 0.4-3µm y (ii) otra población de gotas de menores tamaños entre 0.1-0.4µm. En este caso, a pH 7, tanto el WPC como el AS presentarían ambos una densidad de carga neta negativa por lo que, en estas condiciones, la doble capa WPC-AS en la interfase de las gotas de emulsión se desensamblaría por fuerzas de repulsión electrostática entre los biopolímeros, quedando solo una monocapa proteica (Fioramonti et al. 2015a). Esta puede ser una de las razones por la cual el pico mayoritario en los sistemas digeridos sin electrolitos ni enzimas se encuentra levemente desplazado hacia la izquierda (hacia menores tamaños de gota) y es de menor intensidad que el observado para las emulsiones no digeridas a pH 5. Además, es posible que al disminuir la proporción de gotas

grandes en los sistemas digeridos a pH 7, se haya podido evidenciar una segunda población de gotas más pequeñas. Esto es inherente al sistema de medición realizado por DLS, dado que las gotas más grandes observadas en las microcápsulas redispersadas a pH 5 sin digerir podrían estar ocultando a las poblaciones de gotas más pequeñas, ya que las partículas más grandes dispersan una mayor intensidad de luz que las partículas de menor tamaño (Arzeni et al. 2015).

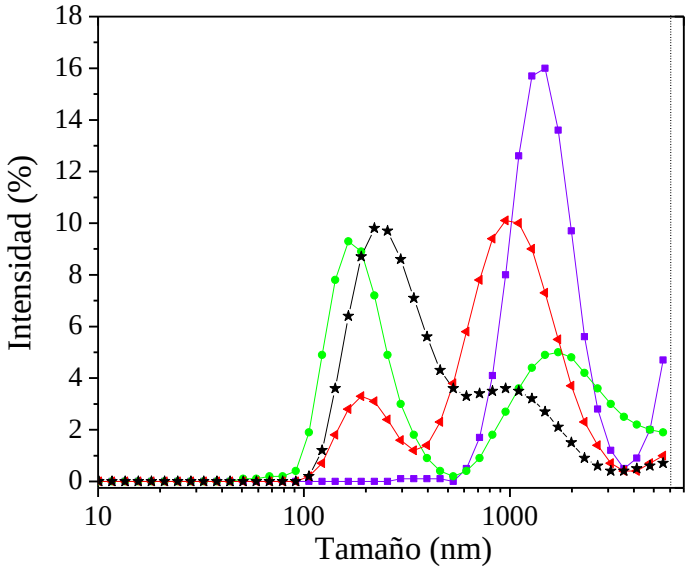


Figura 3. Distribución de tamaños de gota de microcápsulas rehidratadas a pH 5 (■) sometidas a digestión intestinal simulada in vitro a pH 7: sin electrolitos ni enzimas (▲), sólo con electrolitos (●) y con electrolitos y enzimas (★).

Por otro lado, cuando se agregaron electrolitos al medio de digestión (sin enzimas), la población de gotas de mayor tamaño (0.5-2 μm) disminuyó aún más y a su vez, se incrementó la proporción de la población de gotas más pequeñas (0.1-0.5μm). En este sentido, la presencia de sales en el medio de digestión podría haber promovido una mayor redispersión de las gotas de aceite encapsulado, lo que favorecería el incremento del área interfacial disponible para la posterior acción enzimática en el tracto intestinal.

Finalmente, cuando se adicionaron las enzimas al proceso de digestión, también se obtuvieron 2 poblaciones principales de gotas: una mayoritaria en el rango de 0.1-0.5 μm y otro pico hacia tamaños de gota más grandes, entre 0.5-6 μm. Este último presentó una mayor polidispersidad de tamaños (mayor ancho de pico), que podría estar relacionada con el ataque de las proteasas al WPC estructurado en la interfase de las gotas. Esto podría promover la liberación del aceite encapsulado y/o fenómenos de coalescencia entre las gotas, con el consecuente aumento del tamaño de las mismas.

Para completar los estudios de estabilidad coloidal de las microcápsulas, se realizaron determinaciones del potencial zeta (ζ) de los sistemas durante los distintos procesos de digestión.

En la **Fig. 4** se puede observar que las microcápsulas rehidratadas a pH 5 (sin digerir) presentaron una carga neta superficial negativa de alrededor de -50 mV, lo que contribuiría a su estabilidad coloidal dado que existiría la suficiente repulsión electrostática entre las gotas de emulsión (Fioramonti et al. 2015b). Sin embargo, cuando estos sistemas fueron incubados en un FGS a pH 3, el valor absoluto del potencial zeta |ζ| fue inferior a 10 mV. En estas condiciones de pH, podría promoverse una mayor neutralización de las cargas entre el WPC y el AS estructurados en la interfase, dado que las proteínas del suero se encontrarían por debajo de su punto isoeléctrico y por lo tanto, expondrían en su superficie una mayor proporción de cargas positivas para interaccionar con las cargas negativas del AS (Pongsawatmanit et al. 2006).

Estos resultados son consistentes con los flóculos observados en las micrografías de la **Fig. 2** (**A** y **C**), dado que en estas condiciones no existiría la suficiente repulsión electrostática entre las gotas y se promovería la formación de agregados (Guzey y McClements 2004).
También puede observarse que los sistemas digeridos en FGS sin electrolitos ni enzimas presentaron una leve carga positiva (6.1 mV), mientras que el agregado de electrolitos al medio promovió una inversión de la densidad de carga neta en la superficie de las gotas de emulsión (-7.7 mV). Esto último podría estar relacionado con un efecto de apantallamiento de las cargas en la interfase promovido por la presencia de sales en el medio (Tangsrianugul et al. 2015). Sin embargo, cuando se agregaron enzimas (pepsina en este caso) al FGS, el potencial zeta de los sistemas volvió a modificarse, alcanzando un valor de 2.5 mV, lo que indicaría que las proteasas pudieron haber ejercido algunos cambios en la estructura de los biopolímeros ubicados en la interfase a través de la hidrólisis parcial de las proteínas del suero.

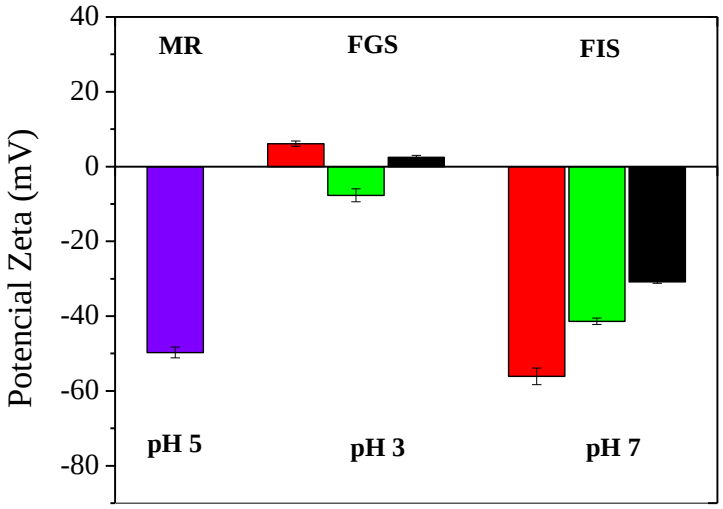


Figura 4. Potencial zeta de microcápsulas rehidratadas (MR) a pH 5 (■), sometidas a digestión gástrica (FGS) e intestinal (FIS) simuladas *in vitro*: sin electrolitos ni enzimas (■), sólo con electrolitos (■) y con electrolitos y enzimas (■).

Por otro lado, todos los sistemas incubados en un FIS a pH 7 presentaron una densidad de carga neta negativa superior a -30 mV, lo que se relacionaría con la estabilidad coloidal observada en las **Fig. 1B**, **2B** y **2D**. En este caso, la carga neta negativa de los sistemas incubados en FIS sin electrolitos ni enzimas, podría ser atribuida exclusivamente al WPC estructurado en la interfase de las gotas, ya que como se mencionó anteriormente, a este valor de pH la doble capa interfacial WPC-AS podría haberse desensamblado debido a fuerzas de repulsión electrostática entre los biopolímeros (Fioramonti et al. 2015a). Por su parte, el agregado de electrolitos al medio también parece haber ejercido un efecto de apantallamiento de las cargas dado que se observó una reducción del valor del potencial zeta desde -56 a -41 mV (**Fig. 4**). Por último, el agregado de pancreatina al medio de digestión también produjo una reducción del potencial zeta del sistema hasta -30 mV. Esta reducción en la carga negativa, podría estar relacionada con la hidrólisis enzimática de la proteína estructurada en la interfase realizada por las proteasas presentes en la pancreatina (tripsina, quimotripsina). Esto último promovería la liberación gradual del compuesto bioactivo encapsulado.

CONCLUSIONES

Mediante el proceso de digestión gastrointestinal simulado in vitro se pudo observar la influencia del pH, de la presencia de electrolitos y de enzimas digestivas sobre la estabilidad coloidal de microcápsulas de aceite de lino. En condiciones gástricas simuladas a pH 3 se observaron gotas completamente floculadas con una carga superficial cercana a la neutralidad y tamaños superiores a 10 μm. Por otro lado, en condiciones intestinales, las gotas volvieron a redispersarse individualmente exhibiendo tamaños similares a los observados en las emulsiones no digeridas (control). En este sentido, en condiciones gástricas, el aceite podría permanecer protegido dentro de la estructura floculada debido a que aún se conservaría la doble capa interfacial WPC-AS. Sin embargo, en condiciones intestinales, esta doble capa se desestabilizaría por fuerzas de repulsión electrostática entre el WPC y el AS, quedando más expuesta la proteína alrededor de las gotas para el ataque de las proteasas intestinales y la liberación del compuesto bioactivo.

BIBLIOGRAFÍA

Arzeni C, Pérez OE, Pilosof AMR. 2015. Power ultrasound assisted design of egg albumin nanoparticles. Food biophysics, 10 (4): 439-446.

Calvo P, Lozano M, Espinosa-Mansilla A, González-Gómez D. 2012. In-vitro evaluation of the availability of ω-3 and ω-6 fatty acids and tocopherols form microencapsulated walnut oil. Food Research International, 48: 316-321.

Carneiro HCF, Tonon RV, Grosso CRF, Hubinger MD. 2013. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. Journal of Food Engineering, 115: 443-451.

Endo J, Arita M. 2015. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. Journal of Cardiology, 67 (1): 22-27.

Fioramonti SA, Martínez MJ, Pilosof AMR, Rubiolo AC, Santiago LG. 2015a. Multilayer emulsions as a strategy for linseed oil microencapsulation: Effect of pH and alginate concentration. Food Hydrocolloids, 43: 8-17.

Fioramonti SA, Arzeni C, Pilosof AMR, Rubiolo AC, Santiago LG. 2015b. Influence of freezing temperature and maltodextrin concentration on stability of linseed oil-in-water multilayer emulsions. Journal of Food Engineering 156: 31-38.

Garg ML,Wood LG, Singh H, Moughan PJ. 2006. Means of delivering recommended levels of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. Journal of Food Science, 71 (5): 66-71.

Klinkesorn U, McClements DJ. 2009. Influence of chitosan on stability and lipase digestibility of lecithin-stabilized tuna oil-in-water emulsions. Food Chemistry, 114: 1308-1315.

McClements DJ. 1999. Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques. CRC Press. Boca Ratón, Florida, Estados Unidos.

Minekus M, Alminger M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, Carriére F y otros. 2014. A standarised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. Food & Function, 5: 1113-1124.

Petrova S, Dimitrov P, Willett WC, Campos H. 2011. The global availability of n-3 fatty acids. Public Health Nutrition, 31:1-8.

Pongsawatmanit R, Harnsilawat T, McClements DJ. 2006. Influence of alginate, pH and ultrasound treatment on palm oil-in-water emulsions stabilized by β-lactoglobulin. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 287: 59-67.

Simopoulos AP. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. Experimental Biology and Medicine, 233: 674-688.

Tangsrianugul N, Suphantharika M, McClements DJ. 2015. Simulated gastrointestinal fate of lipids encapsulated in starch hydrogels: Impact of normal and high amylose corn starch. Food Research International, 78: 79-87.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el soporte económico del proyecto PICT 2015 "Estudio de las propiedades estructurales y biológicas de nanocomplejos formados por albuminas y compuestos bioactivos lipofílicos" (Ministerio de Ciencia y Tecnología de la República Argentina).

Antimicrobial activity of jatobá (*Hymenaea stilbocarpa*) huks extract against Staphylococcus aureus for cheese application

Galli B.D. (1), Martin J.G.P.2, Riquelme T.A. (1), Oliveira J. (1), Bizetto G.A. (1), Silva T.M.V. (1)

(1)Hygiene and Dairy Laboratory, Luiz de Queiroz College of Agriculture (ESALQ), Piracicaba, São Paulo, Brazil.
(2)Department of Microbiology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
galli.bd@gmail.com

RESUMEN

La aplicación de conservantes en los alimentos es necesaria para prolongar su vida útil y evitar los riesgos de enfermedades que ellos transmiten. Este estudio evaluó el potencial antimicrobiano del extracto de cáscara de jatobá (*Hymenaea stilbocarpa*) contra *Staphylococcus aureus* en quesos. El extracto (1g de cáscaras/30 mL de solución de etanol 50:50) se mantuvo bajo agitación (49,5ºC/50'), se centrifugó a 2057g/15' y se filtró. La actividad antimicrobiana se evaluó frente a *S. aureus* ATCC25923. El teste preliminar se realizó por difusión en agar. Para la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), el método de dilución se realizó en microplacas de 96 pocillos (25% y 0,012% del extracto). Tratamientos: T1 (queso más inóculo no incubado); T2 (queso más inóculo incubado); T3 (queso más inóculo más 7,8 mL de extracto); T4 (queso sin extracto e inoculo - control). Los quesos (25 g) se incubaron a 35°C/48 horas. El recuento de *S. aureus* se realizó en Agar Baird-Parker a 35°C/48 horas. La población inicial fue de $5{,}5x10^6$ UFC/g de queso. El queso inoculado mostró un recuento de $3{,}07x10^8$ UFC/g después de 48 horas. Los quesos con extracto presentaron $9{,}52x10^7$ UFC/g, con una reducción significativa en la contaminación. El extracto fue capaz de inhibir ligeramente a *S. aureus* en una matriz alimentaria compleja sometida a condiciones abusivas de temperatura (25°C).

Palabras claves: Antimicrobiano, Jatobá, *Hymenaea stilbocarpa*, Queso, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The application of preservatives in food is necessary to extend its shelf-life and to avoid risks of foodborne diseases. This study aimed evaluate the antimicrobial potential of jatobá husks extract (*Hymenaea stilbocarpa*) against *Staphylococcus aureus* in cheeses. The extract (1g of husks/30 mL of ethanol solution 50:50) was kept under agitation (49.5°C/50'), centrifuged at 2057g/15' and filtered. The antimicrobial activity was evaluated against *S. aureus* ATCC25923. Antimicrobial screening was performed by agar diffusion. For the Minimal Inhibitory Concentration (MIC), the dilution method was performed in 96-well microplate using concentrations ranging from 25% to 0.012%. Treatments: T1 (cheese plus inoculum not incubated); T2 (cheese plus inoculum incubated); T3 (cheese plus inoculum plus 7.8 mL of jatobá extract); T4 (cheese without extract and inoculum – control). The cheese samples (25 g) were incubated at 35°C/48 hours. Thus, the counting of the *S. aureus* was performed by pour plate in Baird-Parker Agar after incubation at 35°C/48 hours. The initial population was $5.5x10^6$ CFU/g of cheese. The cheese inoculated showed counting around $3{,}07x10^8$ CFU/g cheese after 48 hours. The cheeses with extract presented $9{,}52x10^7$ CFU/g, with a significant reduction in the contamination level. Although this slight reduction, the extract was capable to inhibit *S. aureus* in a complex food matrix submitted to a condition of abuse (25°C).

Keywords: Antimicrobial, Jatobá, *Hymenaea stilbocarpa*,Cheese, *Staphylococcus aureus.*

INTRODUCTION

A major concern of the food industry is the microbiological quality of its products, in order to reduce losses due deterioration process and risks to consumer health (Davidson and Branen 2005). In this context, vegetal materials, such as leaves, tubers, skin, and seeds are often used as a source of new compounds (Aidi Wannes, 2010).The antimicrobial spectrum of natural products is wide. Its mechanism of action could be related to changes in different bacterial structures, causing disruption of the outer membrane, enzymatic inactivation, interaction with genetic material and changing the structure and function of the cytoplasmic membrane, disrupting systems of active transport (Burt 2004, Cowan 1999, Sikkema et al. 1995).

Recent studies, however, have demonstrated the presence of these compounds not only on fresh plant material, but also in different vegetal wastes, representing a potential application for the industry (Corrêa et al, 2014; Martin et al, 2012).Besides provide a source of material for research of new compounds, the reuse of these wastes could help minimize the risks of environmental damage resulted from its disposal in the environment. Moreover, the Brazil government established in 2010 the National Solid Waste Policy, which recognizes the reusable and recyclable solid waste as an important source of economic and social development (Brasil 2010).

Minas frescal cheese is characterized by high water-activity (>0.98), low salt content (1.4 to 1.6%) and pH around 5.0-5.3, which makes it susceptible to microbial spoilage and growth of pathogenic microorganisms (Poças and Pintado 2009). Due to these parameters and the intensive manipulation during the cheesemaking, Minas frescal cheese consists in a favorable environment to the growth of foodborne pathogens (Câmara et al. 2002).The temperature used in Minas frescal cheese manufacturing is around 35-40°C, which can favor the multiplication of bacterial contaminants. The situation may become even more unfavorable due its exposition to temperatures of abuse during the storage and transportation, such breaks during the cold chain. Other factors can affect the microbiological quality of the cheese, as poor quality of raw milk and flaws in the cheesemaking.

Foodborne pathogens have been found in Brazilian milk and dairy products commonly stored at inappropriate temperatures and consumed without any heat treatment (Filho and Filho 2002). Fresh cheeses are often involved in cases and outbreaks of food poisoning and the main etiological agent identified are staphylococci bacteria (Brasil 2009).Thus, the search for new compounds to control micro-organisms in the food industry is necessary. The potential application of agro-industrial wastes with biological activity is considerable since Brazil has a strong economy based on agribusiness, which can produce benefits to the industry, by the reuse of wastes, and for consumers and society in general, according as it contributes to the discovery of new antibacterial agents from sustainable natural resources.

MATERIALS AND METHODS

Extraction procedure

A portion of 1 g of husks grounded in mechanical mill was immersed in 30 mL of ethanol solution (50:50) and kept under agitation at 49.5°C/50 minutes. The extract was centrifuged at 2057g/15 minutes and filtered. The ethanol present in the filtrates was removed under low pressure at 45°C and the resulting aqueous phase was stored under refrigeration.

Antimicrobial activity

The antimicrobial activity was evaluated against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, a Gram-positive bacterium frequently associated to cases and outbreaks of foodborne diseases. The microorganism is from the strains collection of the Hygiene and Dairy Laboratory – "Luiz de Queiroz" College of Agriculture (ESALQ/USP).

Agar diffusion method

The screening of the antimicrobial activity of the jatobá extract was performed by agar diffusion technique according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009a) and Duarte et al. (2003), with modifications. 200 µl of

standardized inoculum ($1.0x10^8$ CFU/mL) of the *S. aureus* culture were transferred to 200 mL of Tryptic Soy Broth (TSB) containing 0.7% of bacteriological agar at 45°C (final bacterial population of $1.5x10^5$ CFU/mL). Using a sterile graduated beaker, 70 mL of the inoculated agar were transferred to Petri dishes (150 mm). Thus, wells (8 mm) were produced using a vacuum pump. Forty microliters of jatobá extract (25,0%) were transferred into the wells. As negative control, 40 µL of TSB were used, and as positive control, 40 µL of chlorhexidine solution 0.12% (v/v). Triplicates were made for each extract tested.

Minimum Inhibitory Concentrations (MIC)

For MIC determination, the macrobroth dilution method in 96-well microplate was used, according to CLSI (2009b). The final concentrations of the extracts were obtained by 2-fold serial dilution, resulting in concentrations ranging from 25.0% to 0.012% after the addition of inoculated TSB ($1-2x10^5$ CFU/mL). The final volume for each well was 200 µL. Controls: positive (200 µL of TSB added of 0.12% chlorhexidine v/v); negative (200 µL of sterile TSB); sterility control (200 µL of sterile TSB). After the incubation (35°C/24 hours), the wells received 30 µL of resazurin (0.01% w/v) to detect through visual reading the bacterial growth, indicated by any color change observed.

Minimum Bactericidal Concentrations (MBC)

For the MBC determination, 10 µl of broth were removed from the wells considered inhibitory and sown in Petri dishes containing tryptic soy agar (TSA), which were incubated at 35°C for 24 hours. The MBC was considered as the lowest concentration at which no growth of colonies on the surface of the culture medium was observed (Cabral, et al., 2009). The experiments were conducted in triplicate for each extract.

Cheesemaking

Minas frescal is a Brazilian fresh cheese, semi-skimmed, with high water activity, not ripened. The cheeses were made from pasteurized cow's milk (65°C/30 minutes). The pasteurized and cooled milk (37°C) was transferred to a tank. The milk was acidified using lactic acid (85% v/v) (0.25 mL of acid per liter of milk). Calcium chloride solution (0.4 mL/L of milk) and rennet enzyme coagulant (0.8 mL/L of milk) were added to the acid milk. In this step, 7.8 mL of jatobá extract were added only for the treatment T3. After 35 minutes of coagulation, the mass was cut using a lire cutting in cubes with edges of 2 cm; thus, the grains were kept to stand during 3 minutes (**Figure 1**). A slight agitation was performed during 15 minutes to stimulate the syneresis process. After, the whey was removed and the mass were salted (1.5% of salt w/w). The mass was shaped in molds without pressing.

Figure 1. Cutting and agitation process of the Minas frescal cheese mass.

Experimental design

The treatments consisted in: T1 (cheese plus inoculum not incubated); T2 (cheese plus inoculum incubated); T3 (cheese plus inoculum plus 7.8 mL of jatobá extract); T4 (cheese without extract and inoculum – control) (**Figure 2**).

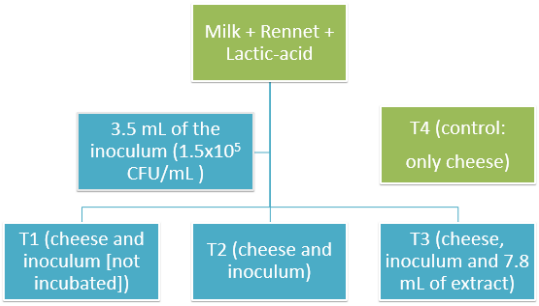


Figure 2. Experimental design of the inoculated cheeses experiment.

After the cheesemaking, the samples (25 g) were incubated at 35°C/48 hours. Thus, the counting of the *S. aureus* in the cheeses was performed by pour plate in Baird-Parker Agar after incubation at 35°C/48 hours considering the typical colonies – black, bright, convex, with a clear halo around colonies, according Lancette & Bennet (2001).

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using the Statistical Analysis System software (SAS 2002). The Tukey's test (0.5% probability) was used to compare means.

RESULTS AND DISCUSSION

The jatobá extract showed an antimicrobial activity against *S. aureus* in the screening step (Figure 3).

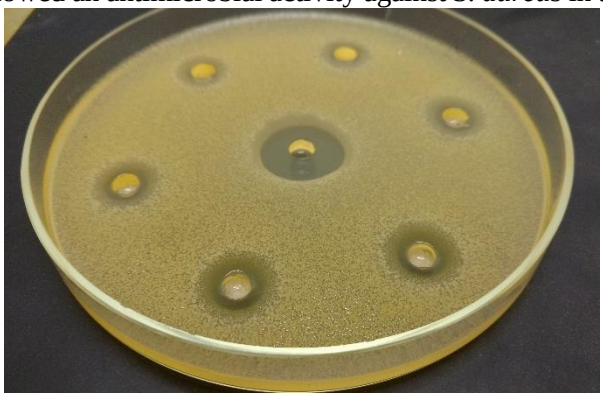


Figure 3. Inhibition zones around the wells containing jatobá extract in the screening step by agar diffusion test.

The MIC and MBC values found for the jatobá extract are presented in **Table 1**.

Table 1: Inhibition Zone (IZ) (mm), Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations (MIC/MBC) (%) of jatobá extracts.

Jatobá extract	*S. aureus*		
	IZ	MIC	MBC
	11.63±0.31	0.78%	6.25%

Several studies have demonstrated the antimicrobial activity of substance isolated from agroindustrial wastes against foodborne pathogens (Martin et al. 2012; Corrêa et al. 2014). However, there are not studies about the antimicrobial potential of jatobá husks. Since its husks correspond to a considerable part of the weight of this fruits, there is an important potential of its use to new researches for bioactive compounds with industrial interesting.

Regarding to the inhibitory activity of the extract on Minas frescal cheeses, the treatment T2 (without extract) showed a *S. aureus* population of $3.07x10^8$ CFU/g of cheese (**Table 2**). Thus, the microorganism demonstrated an increasing around 2 $\log_{10}$ CFU/g of cheese (T1 = $5.5x10^6$ CFU/g). for the treatment T3 (with jatobá extract), the *S. aureus* population after 48 hours at 25°C was $9.52x10^7$ CFU/g of cheese. Therefore, the extract inhibited the bacterial growth in 1 $\log_{10}$ CFU/g, which showed its inhibitory activity in a complex food matrix. We have to reinforce that the temperature of incubation (25°C) is considered as a condition of abuse. Since Minas frescal cheese is storage under refrigeration, the potential of this extract can be further.

Table 2: Enumeration of *S. aureus* (CFU/g of cheese) from samples inoculated to different treatments.

Treatment	**Description**	**CFU/g**
T1	Inoculum	$5.5 \times 10^{6\,a}$
T2	Without extract	$3.07 \times 10^{8\,b}$
T3	With extract	$9.52 \times 10^{7\,c}$
T4	Control	$< 10^{\,d}$

Averages in columns followed by different small letters show statistical difference at 5% (Tukey)

In the control (T4), the counting was <10 CFU/g, confirming the microbiological quality of the cheesemaking process.

CONCLUSIONS

Although this reduction around 1 log, the results demonstrated that the extract inhibited the growth of *S. aureus* in a complex food matrix submitted to a condition of abuse (25°C). Therefore, the jatobá husks extract presented potential to be used as natural preservative in cheeses.

REFERENCES

Aidi Wannes W, Mhamdi B, Sriti J, Bem Jemia M, Ouchikh O, Hamdaoui G, Kchouk ME, Marzouk B. 2010. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. italica L.) leaf, stem and flower. Food and Chemical Toxicology, 48: 1362-1370.

Brasil. Lei n.° 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. Diário Oficial, Brasília, 03 ago 2010. Seção 1, p. 3-6.

Brasil. Análise epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil – 1999 a 2009. Disponível em: http://portal .saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos _dta_brasil_2009.pdf.2009. Acesso em: 10 out 2012.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
Cabral ISR, Oldoni TLC, Prado A, Bezerra RMNB, Alencar SM, Ikegaki M, Rosalen PL. 2009. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. Química Nova, 32: 1523-1527.
Câmara SAV, Amaral GBC, Viana SQ, Muller MT, Silveira KCS, Almeida TN, Medeiro CF. 2002. Microbiological evaluation of fresh handmade Minas cheese commercialized at Municipal Market in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2000. Higiene Alimentar, 16: 32-36.
Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard – 10th ed. CLSI document M2-A10, 2009a.
_____. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard – 8th ed. CLSI document M7-A8, 2009b.
Corrêa CB, Corrêa CB, Martin JGP, Alencar SM, Porto E. 2014. Antilisterial activity of broccoli stems (*Brassica oleracea*) by flow cytometry. International Food Research Journal, 21: 395-399.
Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev, 12: 564-82.
Davidson PM, Branen AL. 2005. Food antimicrobials – an introduction. In: Davidson PM, Sofos JN, Branen AL. editors. Antimicrobials in Food. Boca Ranton: CRC Press, pp. 1–10.
Filho ESDA and Filho AN. 2002. Occurrence of fecal coliforms and *Escherichia coli* in samples of homemade cheese sold in a city of Poços de Caldas, MG. Higiene Alimentar, 16: 71-73.
Lancette GA, Bennet RW. 2001. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: Downes FP and Ito K, editors. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington: APHA. pp. 387–403.
Martin JGP, Porto E, Corrêa CB, Alencar SM, Gloria EM, Cabral ISR, Aquino LM. 2012. Antimicrobial potential and chemical composition of agro-industrial wastes. Journal of Natural Products, 5: 27-36.
Poças MDF, Pintado M. 2009. Packaging and the Shelf Life of Cheese. In: Robertson GL. Editor. Food Packaging and Shelf Life – A Practical Guide. Boca Raton: CRC Press, p. 103-125.
Sikkema J, Bont JA, Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiological Reviews, 59: 201-222.

AKNOWLEDGEMENTS
To CNPq by the scholarships and to Grupo de Estudos e Extensão em Frutas e Hortaliças (ESALQ/USP).

Estudio de la inactivación microbiana en jugo mezcla de zanahoria y naranja con tratamiento combinado de luz ultravioleta y temperatura

García Carrillo M. (1), Ferrario M. (1), Schenk M. (1, 2), Guerrero S. (1, 2)

(1) Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
(2) Miembro del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

RESUMEN

En los jugos turbios la eficiencia del proceso de pasteurización con luz ultravioleta puede ser reducida. El objetivo de este estudio fue evaluar la inactivación de *Escherichia coli* ATCC 35218, *Saccharomyces cerevisiae* KE 162y *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49838 en jugo de zanahoria-naranja procesado por UV-C simple (20°C, 0-11,4 kJ/m^2), o combinado con temperatura moderada (40-50°C). Las curvas de inactivación se caracterizaron según los modelos de Gompertz modificado, Weibull y Geeraerd. Se estimaron las reducciones logarítmicas para cada microorganismo (Log N/No) en función del tiempo de tratamiento (t) y la temperatura (T) mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR). El tratamiento combinado UV-C/T produjo 2,7-6,0 reducciones logarítmicas, exhibiendo *S. cerevisiae* mayor resistencia. Todos los modelos caracterizaron exitosamente la inactivación microbiana (R^2_{ajust}:91,6-99,6). El incremento de temperatura mejoró la inactivación por UV-C, observándose efectos sinérgicos para algunas condiciones en *E. coli* y *P. fluorescens*. Las distribuciones de frecuencia weibullianas mostraron que los tratamientos UV-C simple y combinado (40°C), exhibieron moda con altos valores de media y varianza; mientras que a mayor temperatura (45 y 50°C) estuvieron más sesgadas a la derecha y carecieron de moda. El análisis por MSR, determinó que t fue el parámetro más significativo en la estimación de Log N/No.

Palabras clave: Luz ultravioleta, Temperatura moderada, Microbiología predictiva, Jugos.

ABSTRACT

The efficiency of pasteurization by ultraviolet light is reduced due to the presence of colored compounds and suspended particles. The purpose of this study was to analyze the response of *Escherichia coli* ATCC 35218, *Saccharomyces cerevisiae* KE 162 and *Pseudomonas fluorescens* ATCC 49838 in carrot-orange juice as affected by UV-C alone (20°C, 0-11.4 kJ/m^2) or combined with mild temperatures (40, 45, 50°C). Inactivation curves were characterized by Weibull, Gompertz and Geeraerd models. Surface response methodology (RSM) was used to study the relationship between temperature (T) and treatment time (t) with reductions (Log N/N$_o$) achieved after UV-C exposure. All treatments provoked moderate to high inactivation (2.6-6.0 log reductions), observing synergistic effects on *E. coli* and *P. fluorescens* in some conditions. All models accurately represented survival curves (R^2_{adj}: 91.6-99.6 %). Frequency distributions corresponding to single UV-C and combined treatment at 40ºC exhibited mode and high mean and variance values; while for 45 and 50 °C, distributions were more skewed to the right and lacked of mode. According to RSM, predicted Log N/N$_o$ achieved by UV-C increased exponentially with *t* and *T*, being *t* the most influencing factor.

Keywords: Ultraviolet light, Mild temperature, Predictive microbiology, Juices.

INTRODUCCIÓN

La pasteurización térmica es el proceso más comúnmente aplicado para el procesamiento de los jugos dado que brinda un producto seguro y de alta estabilidad. Sin embargo, estos procesamientos térmicos alteran sus propiedades organolépticas, nutricionales y físico-químicas (Elmnasser et al., 2008). Es por ello, que en las últimas décadas se ha investigado exhaustivamente cómo reemplazar parcial o totalmente los tratamientos térmicos tradicionales, en la inactivación microbiana, mediante tecnologías emergentes de preservación. La luz UV-C es una de las tecnologías emergentes más prometedoras para la descontaminación de jugos naturales exprimidos debido a que es letal para la mayoría de los microorganismos, no genera residuos químicos y es de bajo costo (Baysal et al., 2013). A pesar de que la luz UV-C se ha aplicado de manera exitosa para la pasteurización de jugos de naranja (Tran y Farid, 2004; Keyser et al., 2008), manzana (Keyser et al., 2008, Franz et al., 2009; Caminiti et al., 2012), y ananá (Mansor et al., 2014) entre otros, su aplicación se encuentra aún limitada en los jugos de alta turbidez debido al alto número de compuestos que absorben en el rango UV y de partículas en suspensión, los cuales reducen la transmitancia de la luz UV, disminuyendo la eficiencia del proceso de descontaminación (Gayán et al., 2013). Es por ello que se buscan combinaciones de procesos, aplicados en menor intensidad pero que provoquen igual o mayor estabilidad y seguridad. Bajo esta perspectiva, la aplicación de temperaturas moderadas en combinación con la luz ultravioleta (UV-C) representa una alternativa para la pasteurización de jugos de alta turbidez.

El objetivo del presente trabajo consistió en investigar el efecto de la combinación entre luz UV-C y temperaturas moderadas en la inactivación de algunos microorganismos de relevancia de jugo mezcla de zanahoria-naranja. Se aplicó la metodología de superficie de respuesta para optimizar las mínimas variables de procesamiento. Adicionalmente, se analizó la idoneidad de los modelos de Weibull, Gompertz y Geeraerd en la caracterización de la inactivación por UV-C en un rango de temperaturas y microorganismos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de inóculos

Para este trabajo, se emplearon las cepas *E. coli* ATCC 35218, *P. fluorescens* ATCC 49838 y *S. cerevisiae* KE 162. Se preparó el inóculo inicial transfiriendo dos ansadas de un cultivo fresco en estría a un erlenmeyer conteniendo 20 mL de caldo Tripteína Soya (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) para *E. coli*, caldo nutritivo para *P. fluorescen*s (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia), o caldo Sabouraud (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) para la levadura. Los caldos se incubaron a 37°C durante 18 horas para *E. coli* o 27ºC durante 24 horas para *S. cerevisiae* y *P. fluorescens*. Los inóculos se centrifugaron 5 minutos a 5000 rpm y fueron resuspendidos en agua peptonada al 0,1%.

Elaboración del jugo mezcla

Para la obtención de jugo de zanahoria, zanahorias adquiridas en un mercado local fueron sanitizadas mediante lavados con hipoclorito de sodio 5% y agua estéril, con el fin de reducir la carga microbiana superficial. El jugo se obtuvo en condiciones asépticas usando una juguera hogareña, sanitizada con etanol al 70% e irradiada durante 10 minutos bajo una lámpara UV-C. El mismo se filtró usando una muselina doble, estéril. Por otra parte, el jugo de naranja se obtuvo usando una exprimidora hogareña, sanitizada siguiendo el procedimiento anterior descripto. El mismo fue centrifugado con el propósito de reducir la cantidad de pulpa (1000 rpm, 10 minutos) (Rolco, AMC 3550, Buenos Aires, Argentina). Ambos jugos se mezclaron en una proporción 50:50 (v/v %) y el pH final se ajustó con ácido cítrico a 3,8. El jugo mezcla de zanahoria y naranja (JZN, $\mathcal{E}_{absortividad\text{-}254nm}$: 0,5 cm^{-1}; 9,9 ºBrix; turbidez: 6400 NTU; tamaños de partícula= D [3,2]: 4,6 µm, D [4,3]: 29,3 µm) fue pasteurizado durante 13 minutos a 70 ± 1°C, y guardado a -80°C en un ultrafreezer previo a su uso.

Equipo de irradiación UV-C y procedimiento

El equipo de irradiación UV-C para el procesamiento de líquidos existente en el laboratorio consistía de dos lámparas UV-C (TUV-100 W, 253,7 nm, Philips, Holanda), ubicadas cada una dentro de un tubo de vidrio de 0,87 m de largo, dejando un espacio anular (diámetro externo= 0,031 m; diámetro interno= 0,024 m, volumen= 0,22 L) que funcionó como cámara de irradiación. La entrada y salida del jugo a la cámara de irradiación se efectuó mediante una bomba peristáltica (Cole-Palmer, Masterflex, L/S 24, Illinois, EE.UU.) con mangueras que descargaban a un vaso doble camisa de 800 mL de capacidad. El vaso estaba conectado a un baño termostático (HAAKE, Mess-Technik, Karlsruhe, Alemania) de modo de alcanzar una temperatura constante durante la experiencia (40, 45 ó 50±1°C). Las lámparas UV-C se mantuvieron encendidas durante 15 minutos y luego se recircularon 745 mL de jugo (1,6 L/min) con la luz apagada y se añadieron 5 mL del inóculo, los cuales se recircularon durante 2 minutos, con el propósito de lograr el mezclado del sistema y posteriormente se encendió la lámpara. Se colectaron muestras entre los 0 y 15 minutos (0-11,4 kJ/m^2). Las experiencias se llevaron a cabo por duplicado para cada condición. Las dosis aplicadas se determinaron mediante un radiómetro (Melles Griot, modelo 13 PEM 001, Colorado, EE.UU.).

Determinación de microorganismos sobrevivientes

Las muestras irradiadas, tomadas a distintos intervalos de tiempo, fueron apropiadamente diluidas y sembradas por duplicado con un plaqueador orbital (Autoplate 4000, Spiral Biotech, EE.UU), en agar Tripteína Soya, o agar Sabouraud (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) e incubadas a 37°C ó 27°C para *E. coli*, y para *P. fluorescens* y *S. cerevisiae* respectivamente, durante 24 a 48 horas. Las curvas de inactivación se generaron a partir de los datos experimentales, graficando la fracción sobreviviente, Log N/N_o (donde N es el número de UFC/mL a un tiempo dado y N_o el número inicial de UFC/mL) versus el tiempo de tratamiento.

Modelado matemático

Uno de los modelos usados para estudiar la cinética de inactivación de los diferentes microorganismos por UV-C fue el de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull (Peleg y Cole, 1998):

$$S_{(t)} = \log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -b \cdot t^n \qquad (1)$$

donde S representa la fracción de sobrevivientes; *b* y *n*, los parámetros de escala y de forma, respectivamente. Los valores de *b* y *n* fueron usados para generar las distribuciones de frecuencia de resistencias aplicando la siguiente ecuación:

$$\frac{d\phi}{dtc} = bnt_c{}^{n-1} \exp\left(-bt_c{}^n\right) \qquad (2)$$

donde t_c es una medida de la resistencia o sensibilidad del microorganismo al tratamientoaplicado y $\frac{d\phi}{dt_c}$ es la distribución de tipo Weibullcorrespondiente a t_c. Los parámetros del modelo se calcularon usando la regresión no lineal deStatgraphics Plus para Windows 5.1® (Statistical Graphics Corp., Washington, EE.UU.). Asimismo, se calcularon los estadísticos asociados a la distribución weibulliana, moda, media,varianza y coeficiente de sesgo (Peleg y Cole, 1998).

Las curvas de inactivación fueron también ajustadas por el modelo de Gompertz modificado (Linton et al., 1995):

$$\text{Log}\,[N_{(t)}/N_{(0)}] = Ce^{-e(A+Bt)} - Ce^{-e(A)} \qquad (3)$$

donde, los parámetros *A*, *B* y *C* representan las diferentes regiones en la curva de inactivación: (*A*), el hombro inicial [min]; (*B*), la tasa máxima de inactivación [min^{-1}] y (*C*), el cambio global en el número de sobrevivientes [–].

Los modelos de Geeraerd, en sus versiones log-lineal con hombro y/o cola también fueron aplicados (Geeraerd et al., 2000):

$$log(N) = log\left[\left(10^{log(N_0)} - 10^{log(N_{res})}\right).e^{-k_{max}.t.}\left(\frac{e^{k_{max}.SL}}{1+(e^{k_{max}.SL}-1).e^{-k_{max}.t}}\right) + 10^{log(N_{res})}\right] \quad (4)$$

donde, *SL* representa la duración del hombro, definido como el tiempo en que comienza la inactivación; k_{max}, la tasa de inactivación; *RL*, las reducciones logarítmicas, calculadas como el cociente entre el logaritmo del número inicial de microorganismos (N_0) y el logaritmo del número residual de microorganismos finalizado el tratamiento (N_{res}). Las versiones del modelo de Geeraerd con hombro corresponden a la condición de N_{res}=0 de la ecuación 4, mientras que para la versión con cola, corresponde a la condición de *SL*=0

Los parámetros de los modelos y los estadísticos asociados (coeficiente de determinación, R_{aj}^2, raíz cuadrada de los cuadros medios del error (RMSE) y los criterios de Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC) fueron calculados mediante el programa InfoStat 2009 (InfoStat Group, FCA-UNC, Argentina).
Se estimó mediante regresión múltiple la ecuación de segundo orden que relaciona al tiempo de tratamiento (*t*) por UV-C con las reducciones logarítmicas de *E. coli, S. cerevisiae y P. fluorescens* alcanzadas (Log N/No) y la temperatura (*T*) mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR), utilizando el programa Statgraphics Plus para Windows 5.1® (StatisticalGraphics Corp., Washington, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Figura 1** ilustra las curvas de inactivación de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. fluorescens* en JZN procesado mediante luz UV-C a 20°C o en combinación con temperatura moderada (40, 45 y 50°C) junto a los valores predichos por los modelos matemáticos utilizados.
En general, las curvas de inactivación exhibieron un leve hombro y carecieron de cola cuando se aplicó irradiación UV-C simple (20°C); mientras que a temperatura más elevada, no se observó la presencia de hombro aunque sí de cola marcada (**Figura 1a-c**). La presencia de cola podría atribuirse a la existencia de una subpoblación refractaria a la luz UV-C, o a la presencia de sólidos en suspensión, de alta absorbancia en la región UV, que disminuyen la eficacia del proceso de

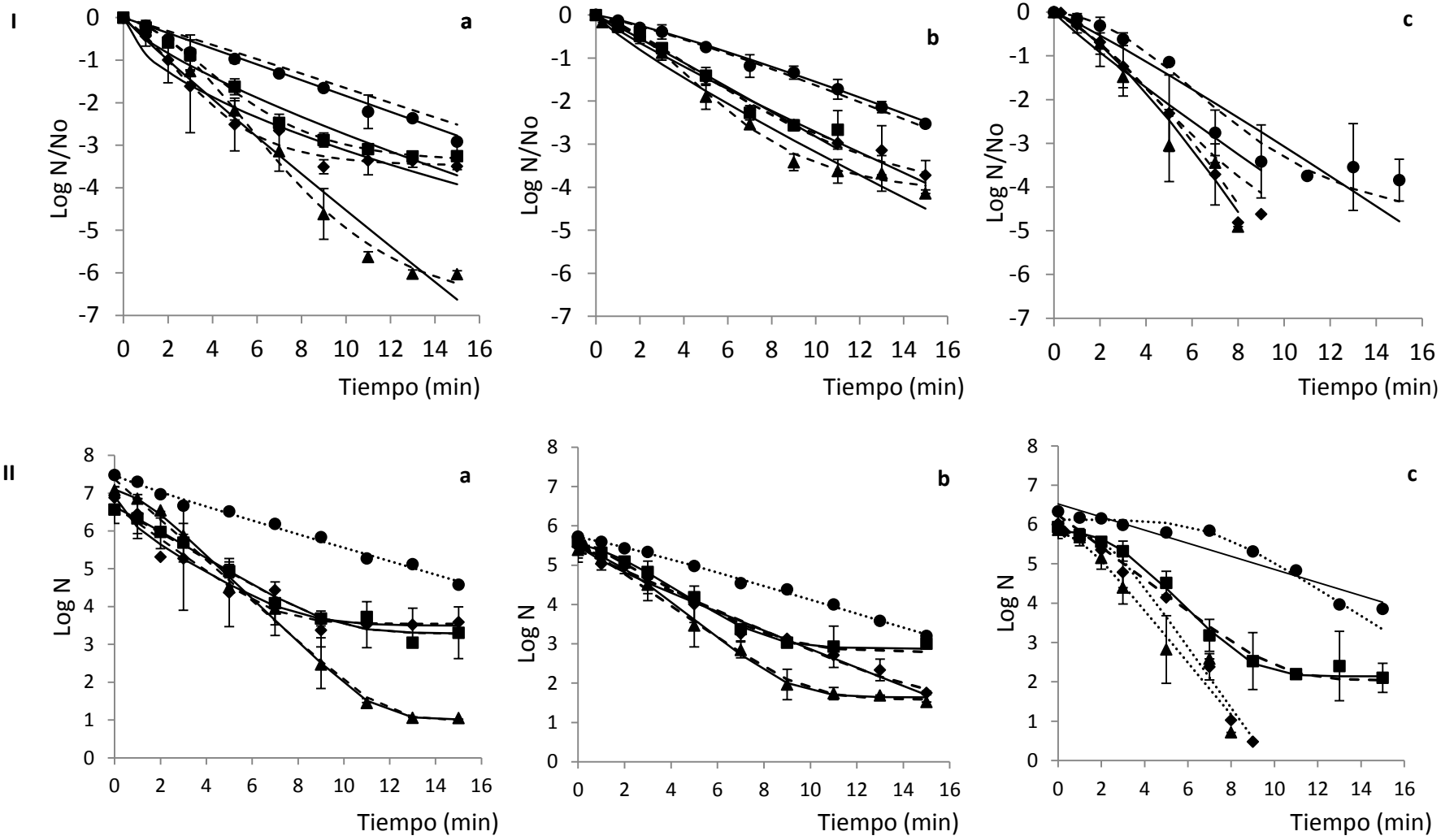


Figura 1. Curvas de inactivación de *E. coli* (a), *S. cerevisiae* (b) y *P. fluorescens* (c) en jugo mezcla de zanahoria-naranja tratado por luz UV-C durante 15 min (dosis máxima 11,4 KJ/m^2) a 20 (●), 40 (■), 45 (♦) ó 50 (▲).Valores experimentales (punto) y predichos según los modelos de Weibull (▬) y Gompertz (---) (I) y, el modelo de Geeraerd en sus versiones con hombro y cola (▬), con hombro y sin cola (…), y con cola y sin hombro (---) (II).

desinfección. El tratamiento combinado UV-T provocó 2,9-6,0; 2,5-4,2 y 2,9-8,0 (no detectable) reducciones log of *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. fluorescens*, respectivamente según la temperatura aplicada.
Nuestros resultados concuerdan con aquellos reportados por Schenk et al. (2008), que observaron curvas de inactivación sin hombro y con cola marcada para *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114D, *Escherichia coli* ATCC 11229, y *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 inoculadas en rodajas de pera y procesadas por luz UV-C (0-87 kJ/m^2). La ausencia de hombro y presencia de una cola marcada también fue observada por Taze et al. (2015) para la inactivación de la flora nativa en jugo de naranja tratado con UV-C (0-1,0842 kJ/m^2).
En la **Figura 2** se muestra el grado de inactivación alcanzado luego de la aplicación del tratamiento de UV-C simple o combinado con temperatura, y las correspondientes diferencias significativas obtenidas mediante el test de Tukey. Las interacciones Tratamiento*temperatura resultaron variables significativas en la predicción de la fracción sobreviviente, Log N/No, con altos valores de F (p-valor< 0,001). El estadístico R^2_{aj} indicó que el modelo explicó la variabilidad observada en un rango del 99,0%. Los tratamientos térmicos simples provocaron hasta 0,6-1,5 reducciones log para todos los microorganismos evaluados, y no se hallaron diferencias al incrementar la temperatura para cada cepa. Mientras que el tratamiento UV-C simple provocó hasta 2,5-2,9 reducciones log, y no se encontraron diferencias significativas entre los microorganismos evaluados.
Se observaron efectos sinérgicos para la inactivación de *P. fluorescens* procesados por UV-C combinado con 45 y 50°C, dado que se alcanzaron 5,3 reducciones log o no se detectaron colonias luego de 8 min de irradiación, respectivamente. Asimismo, se observó también efecto sinérgico en el caso de *E. coli* procesado por UV-C a 50°C, donde se obtuvieron hasta 6,0 reducciones log. Por otra parte, se detectaron efectos aditivos (*P. fluorescens*,UV-C/40 °C) a indiferentes para el resto de las combinaciones UV/T. Gayán et al. (2012) también reportaron un efecto sinérgico en la inactivación de *Escherichia coli* STCC 4201 al aplicar un tratamiento UV-C combinado con temperatura moderada de 50°C en jugo de naranja (23,72 J/mL).
En el caso de *S. cerevisiae*, los tratamientos de UV-C a 45 y 50°C incrementaron la inactivación observada respecto a UV-C simple, obteniéndose hasta 3,4-3,5 reducciones log, respectivamente. En contraste, Gouma et al. (2015) observaron que un tratamiento UV-C combinado con una temperatura de 50°C, apenas afectaba la inactivación UV-C de *S. cerevisiae* STCC 1172 en jugo de manzana. Sin embargo, cuando el tratamiento UV-C fue llevado a cabo a temperaturas mayores (55,0 y 57,5°C), claramente se detectaron efectos sinérgicos.

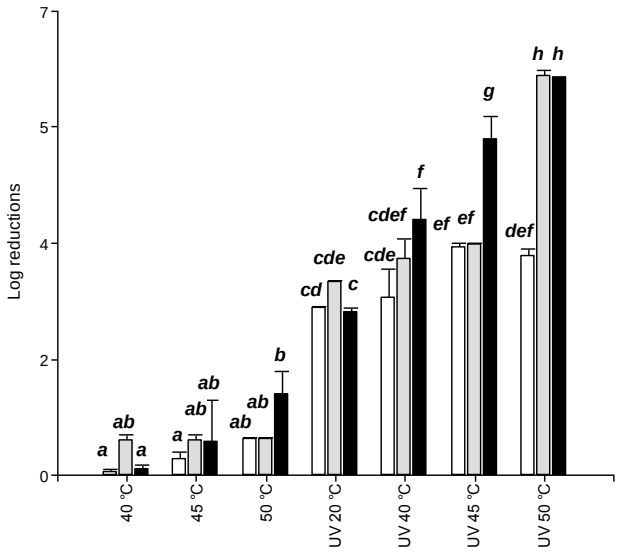


Figura 2. Reducciones logarítmicas y diferencias significativas correspondientes a *E. coli* (■), *P. fluorescens* (■) *y* S. *cerevisiae* (□) en JZN tratado con UV-C simple (20ºC) o combinado (40, 45 ó 50 °C). Diferentes letras en las barras representan diferencias significativas (p< 0,05) entre los distintos tratamientos según el test de Tukey.

El modelo weibulliano ajustó adecuadamente los datos experimentales, con valores del coeficiente de determinación, R_{aj}^2, entre 96,5 y 99,4% y bajos valores de raíz cuadrada del cuadrado medio del error, RMSE (**Tabla 1**). Varios estudios previos han reportado que el modelo de Weibull era capaz de describir cuantitativamente la inactivación microbiana causada por UV-C en matrices tanto líquidas (Baysal et al., 2013; Unluturk et al., 2010) como sólidas (Cheigh et al., 2013).

Los valores de los parámetros *b* y *n* fueron utilizados para obtener las distribuciones de frecuencia de resistencias correspondientes (**Figura 3**). Para los tratamientos UV-C simple (20ºC) o combinado (40°C), las distribuciones de frecuencia de resistencias resultaron aplanadas, con una importante varianza en los tiempos de muerte, cola marcada, presencia de moda y altos valores de media en el caso de UV-C a 20 y 40°C, indicando que una importante proporción de la población sobrevivió luego de estos tratamientos (**Figura 3**).

Excepcionalmente, *E. coli* en jugo mezcla con tratamiento térmico a 40°C careció de moda (**Figura 3**). En cambio, las distribuciones de frecuencias de resistencia correspondientes a tratamiento UV-C combinado con temperatura 45 ó 50°C, resultaron sesgadas a derecha, sin moda, y con menores valores de media y varianza, sugiriendo que la mayoría de la población fue inactivada a tiempos cortos al aumentar la temperatura (**Figura 3**). Estos resultados concuerdan con aquellos observados por Schenk et al. (2008), quienes observaron distribuciones de frecuencias de resistencias sesgadas a la derecha y con gran amplitud en los datos de muerte (valores de varianza grandes), sin cola ni moda. Estos autores atribuyeron esas formas de frecuencia al hecho de que la mayoría de la población fue destruida en corto tiempo tras la exposición a UV-C, mientras una fracción minoritaria sobrevivió tras este tratamiento.

E. coli fue la cepa más sensible a todos los tratamientos ensayados, exhibiendo valores de media en el rango de 2.1-5.5 min, seguido por *P. fluorescens* (2,3-6,6 min) y *S. cerevisiae* (2,8-6,6 min) (**Tabla 2**). En concordancia, Gayán et al. (2016) también reportaron que las bacterias Gram- negativas resultaron más sensibles a la luz UV-C que las levaduras.

El modelo de Gompertz ajustó adecuadamente los datos experimentales de todas las curvas de inactivación con R_{aj}^2 en el rango de 97,8 a 99,7% y bajos valores de RMSE.El parámetro *A*, que representa la duración del hombro inicial (min), fue bajo y varió entre 0,43-1,40; 0,78-1,17 y 1,10-1,48 para *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. fluorescens*, respectivamente (**Tabla 1**). Consecuentemente, *P. fluorescens* exhibió el mayor valor de *A*, indicando que se requiere superar un dado tiempo de exposición UV-C para lograr su inactivación. No se observó una tendencia de cambio del parámetro *A* con la temperatura, probablemente debido a la ausencia de un hombro marcado en las curvas de inactivación. Respecto del parámetro *B* (tasa de inactivación), el mismo se vio más afectado por el tipo de microorganismo (**Tabla 1**). En particular, *E. coli* fue la cepa más sensible al tratamiento exhibiendo mayores valores de *B* (-0.25 a -0.54 min^{-1}) al procesar el jugo mezcla por UV-C a 45 y 50°C. Es importante destacar, que se observó un incremento importante del parámetro C (cambio global en el número de sobrevivientes) al aumentar la temperatura, indicando una mejora en la eficiencia del proceso (**Tabla 1**). En algunos casos, las curvas de inactivación correspondientes a UV-T carecieron de cola, lo cual se tradujo en una sobreestimación del parámetro *C* comparado con los valores experimentales (*E. coli* y *P. fluorescens* en UV-20°C, *P. fluorescens* en UV-55°C) (**Figura 1**, **Tabla 1**). Una sobreestimación del parámetro *C* también fue reportada por Ferrante et al. (2007), quienes aplicaron el modelo de Gompertz modificado para modelar la inactivación de *L. monocytogenes* en jugo de naranja fresco (pH: 3,5) aditivado con vainillina (0; 1000 y 1500 ppm) y sonicado (600 W, 20 kHz, 95,2 micrómetros de amplitud de onda; 45°C). Estos autores describieron una sobreestimación del parámetro *C* para las condiciones más severas de tratamiento (100 y 1500 ppm de vainillina en adición al tratamiento con ultrasonido), dado que la población microbiana fue inactivada rápidamente generando una curva de inactivación sin cola y siguiendo casi una cinética de primer orden.

El modelo de Geeraerd, en sus tres versiones (log lineal con cola u hombro, o log lineal con cola y hombro), ajustó adecuadamente los datos experimentales de todas las curvas de inactivación con valores de R_{aj}^2, en el rango de 96,0 a 99,6%. Se observó un importante incremento del parámetro k_{max}con la temperatura (**Tabla 1**) para todos los microorganismos evaluados. En particular, *E. coli* presentó valores de k_{max}de 0,41 ó 1,02-1,32 min^{-1} cuando la temperatura fue de 20 ó 50°C, respectivamente y según la versión del modelo (**Tabla 1**). Asimismo, para *S. cerevisiae* y *P. fluorescens*, se observó un incremento de k_{max}con la temperatura de 0,41 a 0,93-1,07 min^{-1} y de 0,79 a 1,52

min^{-1}, respectivamente a 20 ó 50°C(**Tabla 1**). De manera concordante a lo comentado previamente respecto del parámetro *A* correspondiente al modelo de Gompertz, no se observó un patrón de cambio para los valores de *SL* al aumentar la temperatura, lo que sugiere que las curvas de inactivación no presentaron un hombro marcado. De hecho, en varios casos, el parámetro *SL* resultó negativo indicando la ausencia de hombro para esas curvas (**Tabla 1**). En adición, una disminución de $1{,}4x10^3$-$1{,}9x10^3$ a 0-10 UFC/mL en el parámetro N_{res} se observó al aumentar la temperatura de tratamiento para *E. coli* y *P. fluorescens* (datos no mostrados). Baysal et al. (2013) investigaron la inactivación de esporas de *Aliyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922 inoculadas en jugo de manzana (pH: 3,8; 11 °Brix y 10 NTU) y de uva blanca (pH: 3,2; 16,6 °Brix y 5,5 NTU) tratados con UV-C (0-5 J/cm^2) y obtuvieron curvas de inactivación con cola pero sin hombro, por lo cual aplicaron el modelo de Geeraerd con cola. Ellos observaron un decrecimiento de los valores de k_{max} en jugo de uva al aumentar las intensidades UV de 0,14 a 1,31 mW/cm^2. Mientras que no observaron cambio alguno en los valores de k_{max}en el jugo de manzana al variar la intensidad UV. En concordancia con los resultados presentados en este trabajo, se observó una disminución en el parámetro N_{res} al aumentar la dosis UV.

En conclusión, el modelo de Gompertz brindó mejor ajuste a los datos experimentales, exhibiendo menores valores de RMSE, AIC y BIC en 7 de 15 casos evaluados (datos no presentados), seguido por el modelo de Geeraerd (5 casos favorables) y de Weibull (3 casos). El modelo de Geeraerd presentó menor valor predictivo respecto al de Gompertz de acuerdo a los criterios de AIC y BIC, los cuales consideran en simultáneo el ajuste y la parsimonia del modelo. Por lo cual, es probable que este modelo presente sobre-parametrización, y que los criterios de AIC y BIC penalicen el número de parámetros presentes en el modelo. Sin embargo, en 5 ocasiones, el modelo de Geeraerd presentó mejor ajuste, para los casos de *S. cerevisiae* en jugo mezclatratado con UV-C 40 y 50°C y *P. fluorescens* en el mismo jugo tratado con UV-C simple y combinado a la más baja temperatura (40°C).

Tabla 1. Parámetros estimados de los modelos de Weibull, Gompertz y Geeraerd para estimar la inactivación de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. fluorescens* en jugo mezcla de zanahoria-naranja tratado por UV-C simple (20ºC) y combinado con temperatura moderada (40, 45 y 50°C) durante 15 min (11,4 KJ/m^2).

Tratamiento/ Microorganismo		Geeraerd										Weibull			Gompertz			
		Log-lineal con cola			log-lineal con hombro			log-lineal con cola y hombro										
		RL	*k* (min^{-1})	R^2_{aj}	*SL* (min)	*k* (min^{-1})	R^2_{aj}	RL	*SL* (min)	*k* (min^{-1})	R^2_{aj}	*b* (min^{-n})	*n* (-)	R^2_{aj}	*A* (min)	*B* (min^{-1})	*C* (-)	R^2_{aj}
UV 20 °C	*E. coli*	-	-	-	-0,75 (0,01)	0,41 (0,02)	98,7	-	-	-	-	0.18 (0.02)	1,01 (0,03)	99,4	0,43 (0,38)	-0,04 (0,08)	-11,93 (20,00)	99,2
	S. cerevisiae	-	-	-	1,00 (0,01)	0,41 (0,01)	99,6	-	-	-	-	0.11 (0.01)	1,15 (0,05)	98,9	0,82 (0,14)	-0,07 (0,05)	-7,40 (5,07)	99,1
	P. fluorescens	-	-	-	6,92 (0,03)	0,79 (0,04)	98,1	-	-	-	-	0.09 (0.02)	1,22 (0,08)	97,5	1,10 (0,31)	-0,05 (0,08)	-11,78 (27,23)	97,5
UV 40 °C	*E. coli*	3,36	0,80	98,2	-2,88 (0,05)	0,50 (0,05)	93,2	3,35	0,23 (0,06)	0,83 (0,51)	97,9	0.41 (0.06)	0,83 (0,06)	97.2	0,96 (0,16)	-0,25 (0,03)	-4,07 (0,28)	99,2
	S. cerevisiae	0,89	0,75 (0,24)	99,0	-0,77 (0,03)	0,58 (0,04)	96,4	2,67	1,24 (0,02)	0,89 (0,12)	99,6	0.27 (0.03)	1,02 (0,05)	98.7	0,92 (0,19)	-0,21 (0,05)	-4,23 (0,72)	99,1
	P. fluorescens	4,20	0,94 (0,79)	97,5	-	-	-	3,70	2.35 (0,06)	1,26 (0,23)	99,5	0.25 (0.05)	1,09 (0,09)	97.7	1,48 (0,13)	-0,25 (0,03)	-4,88 (0,27)	99,4
UV 45 °C	*E. coli*	3,12	1,00 (0,61)	93,6	-	-	-	3,42	-1,99 (0,09)	0,78 (0,81)	94,3	1.30 (0.20)	0,40 (0,07)	92.6	0,66 (0,64)	-0,54 (0,16)	-3,97 (0,88)	97,1
	S. cerevisiae	3,82	0,59 (0,72)	98,3	-	-	-	4,29	-1,14 (0,04)	0,54 (0,79)	98,2	0.34 (0.04)	0,90 (0,05)	98.5	0,82 (0,17)	-0,19 (0,03)	-4,84 (0,51)	99,3
	P. fluorescens	5,41	1,32 (1,44)	96,0	-1,53 (0,21)	0,84 (0,11)	86,9	4,95	2,04 (0,29)	1,71 (0,86)	97,5	0.56 (0.13)	0,86 (0,10)	92.1	1,28 (0,33)	-0,30 (0,07)	-5,76 (0,59)	95,1
UV 50 °C	*E. coli*	6,39	1,23 (0,88)	99,2	-0,72 (0,17)	1,02 (0,07)	96,4	6,09	0,96 (0,10)	1,32 (0,66)	99,5	0.55 (0.11)	0,92 (0,08)	96,5	1,40 (0,15)	-0,27 (0,03)	-6,77 (0,29)	99,2
	S. cerevisiae	4,00	0,93 (1,57)	96,0	-	-	-	3,79	1,11 (0,22)	1,07 (1,28)	96,3	0.40 (0.05)	0,91 (0,05)	97,2	1,17 (0,10)	-0,26 (0,02)	-4,63 (0,20)	99,4
	P. fluorescens	-	-	-	0,94 (0,20)	1,52 (0,13)	94,9	-	-	-	-	0.30 (0.05)	1,30 (0,09)	96,8	1,21 (0,77)	-0,08 (0,21)	-31,89 (140,75)	96,5

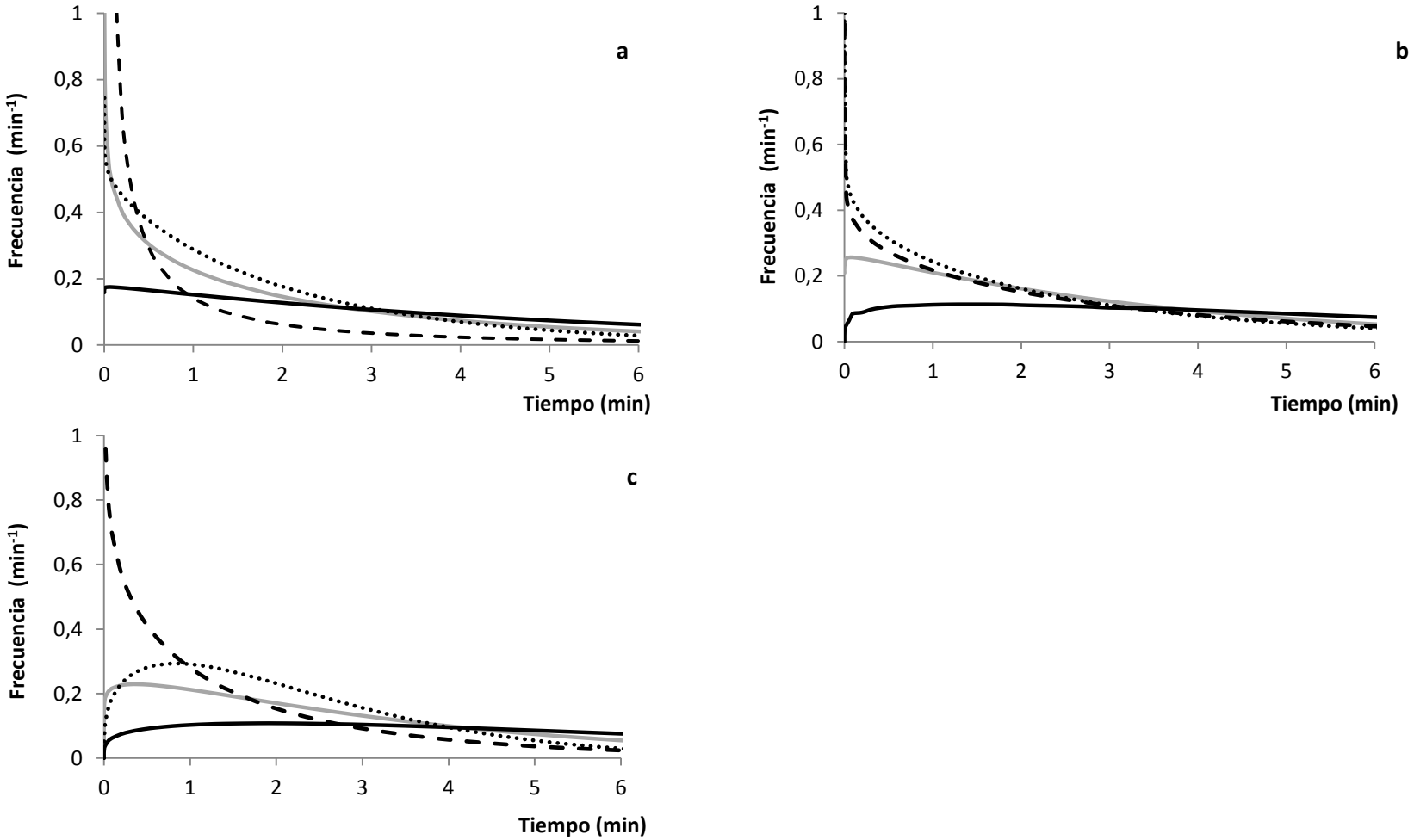


Figura 3. Distribuciones de frecuencias de resistencias correspondientes al modelo de Weibull para la inactivación de *E. coli* (a), *S. cerevisiae* (b)and *P. fluorescens* (c) en jugo mezcla de zanahoria-naranja tratado con UV-C por 15 min (dosis máxima 11,4 KJ/m^2) a 20 (▬), 40 (▬), 45 (---) ó 50 °C (…)

Tabla 2. Parámetros estadísticos asociados al modelo de Weibull correspondientes a la supervivencia de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. fluorescens*en jugo mezcla de zanahoria-naranja y sometidos a UV-C durante 15 min (dosis máxima 11,4 KJ/m^2) a 20, 40, 45 y 50°C

Microorganismo	***Tratamiento***		***tcm (min)***	$\bar{t}_c$ ***(min)***	σ^2_{tc} ***(min^2)***	ν_1 ***(-)***
E. coli	UV-C	20 °C	0,06	5,44	29,00	2,10
		40 °C	-	3,23	15,36	2,61
		45 °C	-	1,72	29,34	10,68
		50 °C	-	2,14	4,98	2,21
S. cerevisiae		20 °C	1,16	6,49	31,99	1,86
		40 °C	0,08	3,58	12,32	2,08
		45 °C	-	3,49	15,08	2,37
		50 °C	-	2,86	9,92	2,34
P. fluorescens		20 °C	1,89	6,39	26,49	1,74
		40 °C	0,36	3,45	10,05	1,95
		45 °C	-	1,94	5,37	2,57
		50 °C	0,83	2,31	3,17	1,68

La **Figura 4I** muestra las superficies de respuesta obtenidas por análisis de MSR, correspondientes a *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. fluorescens* en el jugo mezcla, las cuales ilustran la relación entre el tiempo de tratamiento UV-C requerido (*t*) para lograr una dada inactivación (o reducciones logarítmicas) y la temperatura empleada (*T*). Como se observa en las **Figuras 4Ia-c**, si bien a mayor temperatura se alcanzan mayores reducciones; el factor tiempo resultó el parámetro de mayor peso en la predicción del tiempo de procesamiento de JZN por UV-C. El análisis por MSR, determinó para los 3 microorganismos estudiados que *t* fue el parámetro significativamente de mayor peso en la estimación de Log N/No, seguido de t^2, *T* y T^2 (R^2_{ajust}= 89,6-98,9) (datos no presentados), hecho que quedó de manifiesto en la curvatura de las superficies obtenidas, con un aumento exponencial del *Log N/No* conforme se incrementó *t*. Esta velocidad de cambio fue mayor a mayores valores de *T* y para *P. fluorescens* seguida de *E. coli*. En la **Figura 4II**, se muestran los gráficos de contorno correspondientes a los distintos tiempos de procesamiento por UV-C requeridos para obtener una dada reducción de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. fluorescens* en JZN, según la temperatura evaluada. Puede observarse la menor influencia de la *T*, ya que para una dado tiempo de procesamiento, este parámetro influye levemente en las reducciones log alcanzadas. Además se observa que, a tiempos bajos de procesamiento la dependencia respecto de la temperatura es menor que a tiempos de tratamiento más altos. En particular, para *S. cerevisiae* (Figura 4IIb) si se procesa durante 3,5 min se alcanzan entre 1,5-2,0 reducciones log independientemente de la temperatura aplicada; mientras que para 11 min, se logran entre 2,5 a 4,0 reducciones log según la temperatura sea de 40, 45 ó 50°C. Sólo en el caso de *P. fluorescens*, se observó un máximo de inactivación a la mayor temperatura y tiempo evaluados (**Figura 4IIc**).

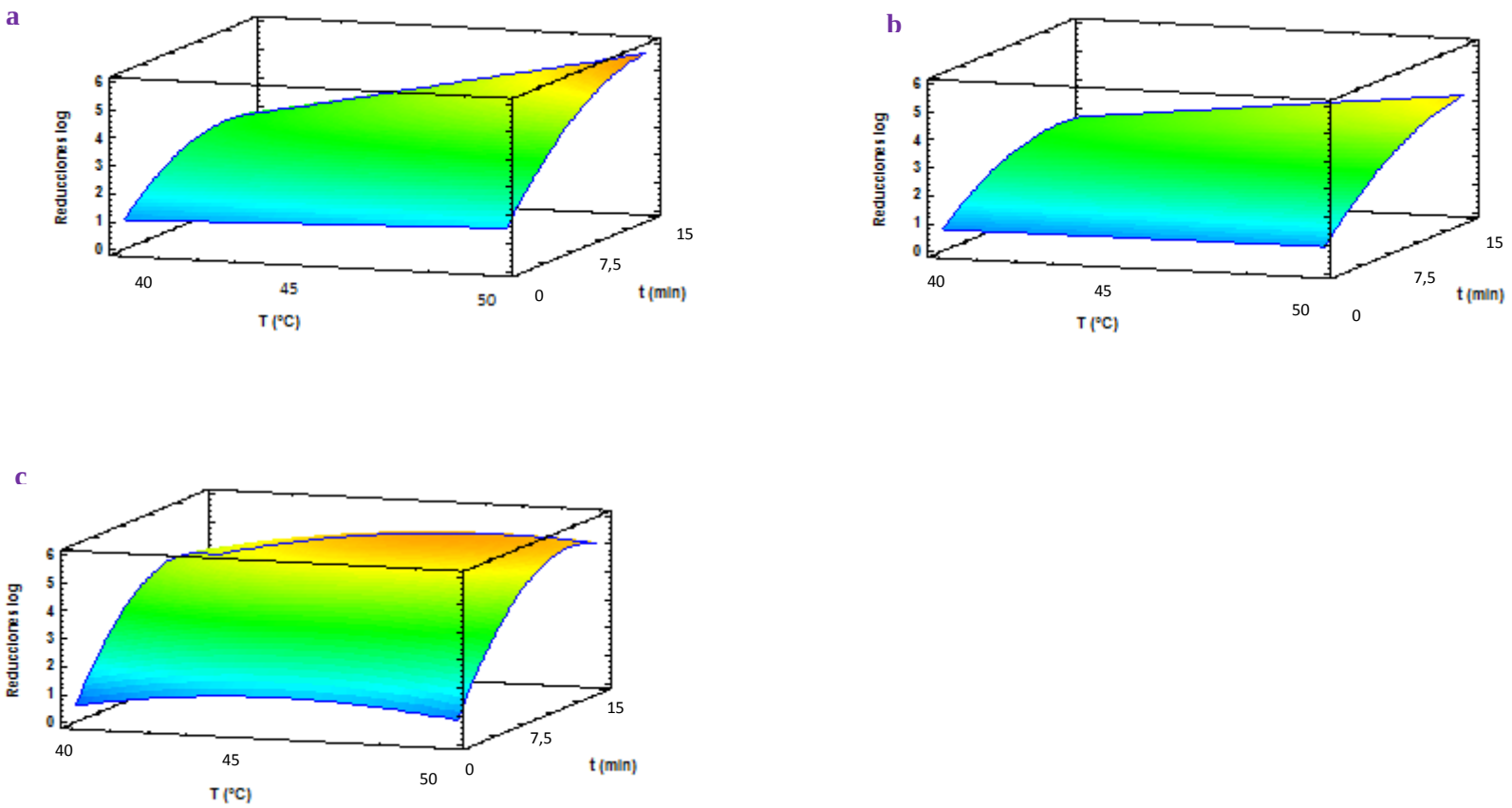


Figura 4I. Superficies de respuesta correspondientes al efecto de la temperatura (*T*) y del tiempo de procesamiento por UV-C (*t*) en las reducciones log (log (N/No)) de *E. coli* (a), *S. cerevisiae* (b) y *P. fluorescens* (c) en jugo mezcla de zanahoria-naranja.

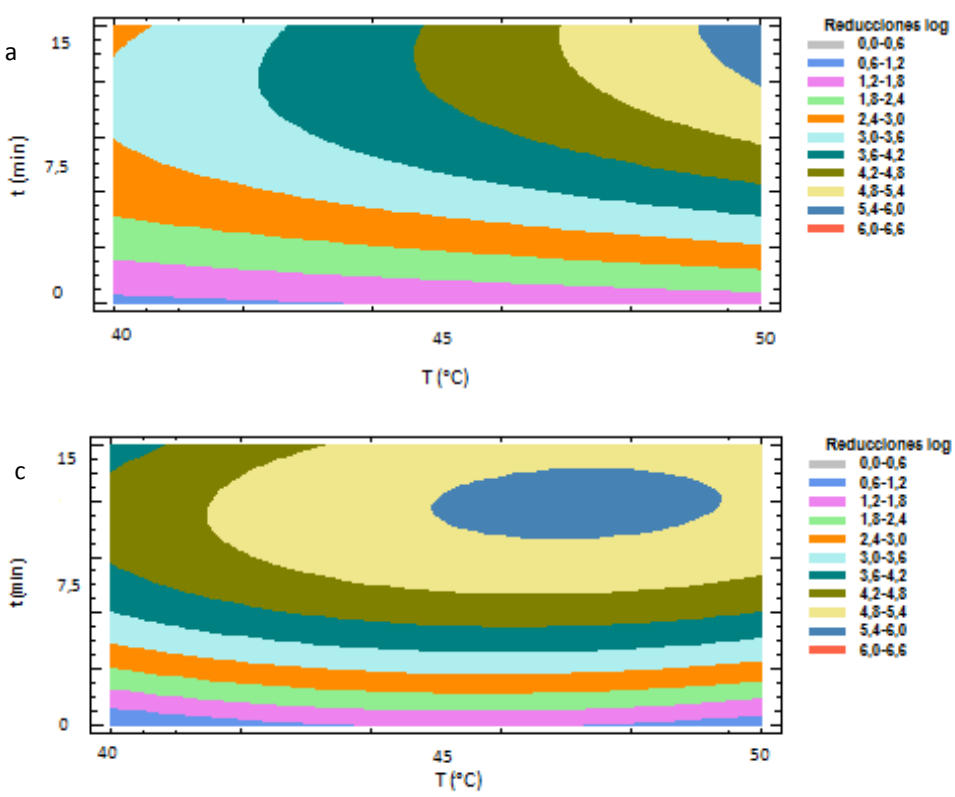


Figura 4II. Contornos correspondientes al efecto de la temperatura (*T*) y del tiempo de procesamiento por UV-C (*t*) en las reducciones log (log (N/No)) de *E. coli* (a), *S. cerevisiae* (b) y *P. fluorescens* (c) en jugo mezcla de zanahoria-naranja.

CONCLUSIONES

Este estudio permitió aportar información cuantitativa relevante acerca de la influencia del tratamiento de irradiación UV-C en combinación con temperatura moderada para la inactivación de microorganismos relevantes en jugo mezcla de zanahoria-naranja caracterizado por su alta turbidez. Los tratamientos combinados lograron una inactivación de hasta 6,0; 4,2 y 8,0 (no detectables) reducciones log de *E. coli*, *S. cerevisiae* y *P. fluorescens*, respectivamente, siendo algunas de las combinaciones sinérgicas para *P. fluorescens* y *E. coli*. Si bien se observó una dependencia del tiempo y de la temperatura en el nivel de reducciones logarítmicas alcanzadas, el primer factor resultó de mayor relevancia; siendo más notoria la influencia de la temperatura a altos tiempos de procesamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Baysal, A., Molva, C., Unluturk, S. 2013. UV-C light irradiation and modeling kinetics of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in white grape and apple juices. International Journal of Food Microbiology, 166: 494-498.

Caminiti, I.M., Palgan, I., Muñoz, A., Noci, F., Whyte, P., Morgan, D.J., Cronin, D.A., Lyng G.J. 2012. The effect of ultraviolet light on microbial inactivation and quality attributes of apple juice. Food and Bioprocess Technology, 5: 680–686.

Cheigh, C. I., Hwang, H. J., & Chung, M. S. 2013. Intense pulsed light (IPL) and UV-C treatments for inactivating *Listeria monocytogenes* on solid medium and seafoods. Food Research International, 54(1), 745-752.

Elmnasser, N., Dalgalarrondo, M., Orange, N., Bakhrouf, A., Haertlé, T., Federighi, M., & Chobert, J. M. 2008. Effect of pulsed-light treatment on milk proteins and lipids. Journal of agricultural and food chemistry, 56(6), 1984-1991.

Ferrante, S., Guerrero, S., & Alzamora, S. M. 2007. Combined use of ultrasound and natural antimicrobials to inactivate *Listeria monocytogenes* in orange juice. Journal of Food Protection, 70(8), 1850-1856.

Franz, C., Specht, I., Cho, G., Graef, V., Stah, M.R. 2009. UV-C inactivation of microorganisms in naturally cloudy apple juice using novel inactivation equipment based on Dean vortex technology. Food Control, 20: 1103–1107.

Gayán, E., Monfort, S., Álvarez, I., & Condón, S. 2011. UV-C inactivation of *Escherichia coli* at different temperatures. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 12(4), 531-541.

Gayán, E., Serrano, M. J., Monfort, S., Álvarez, I., & Condón, S. 2012. Combining ultraviolet light and mild temperatures for the inactivation of *Escherichia coli* in orange juice. Journal of Food Engineering, 113(4), 598-605.

Gayán, E., Mañas, P., Álvarez, I., Condón, S. 2013. Mechanism of the synergistic inactivation of *Escherichia coli* by UV-C light at mild temperatures. Applied and Environmental Microbiology, 79: 4465–4473.

Gayán, E., Serrano, M. J., Álvarez, I., & Condón, S. 2016. Modeling optimal process conditions for UV-heat inactivation of foodborne pathogens in liquid foods. Food Microbiology, 60, 13-20.

Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., Van Impe, J.F. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. International Journal of Food Microbiology, 59: 185 – 209.

Gouma, M., Gayán, E., Raso, J., Condón, S., & Álvarez, I. 2015. Inactivation of spoilage yeasts in apple juice by UV–C light and in combination with mild heat. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 32, 146-155.

Keyser, M., Műller, I.A., Cilliers, F.P., Nel, W., Gouws, P.A. 2008. Ultraviolet radiation as a non-thermal treatment for the inactivation of microorganisms in fruit juice. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9: 348–354.

Linton, R.H., Carter, W.H., Pierson, M.D., Hackney, C.R., Eifert, J.D. 1995. Use of modified Gompertz equation to predict the effects of temperature, pH and NaCl on the inactivation of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, 59: 16-23

Mansor A., Shamsudina R., Adzahanb N.M., Hamidonc M.N. 2014. Efficacy of ultraviolet radiation as non-thermal treatment for the inactivation of *Salmonella typhimurium* TISTR 292 in Pineapple Fruit Juice. Agriculture and Agricultural Science Procedia, 2, 173 – 180.

Peleg M., Cole M. 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. Critical Reviews in Food Science, 38: 353-380.

Schenk, M., Guerrero, S., & Alzamora, S. M. 2008. Response of some microorganisms to ultraviolet treatment on fresh-cut pear. Food and Bioprocess Technology, 1(4), 384-392.

Taze, B. H., Unluturk, S., Buzrul, S., & Alpas, H. 2015. The impact of UV-C irradiation on spoilage microorganisms and colour of orange juice. Journal of food science and technology, 52(2), 1000-1007.

Tran MT, Farid M. 2004. Ultraviolet treatment of orange juice. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 5: 495–502.

Unluturk, S., Atılgan, M. R., Baysal, A. H., & Unluturk, M. S. 2010. Modeling inactivation kinetics of liquid egg white exposed to UV-C irradiation. International journal of food microbiology, 142(3), 341-347.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universidad de Buenos Aires, CONICET y ANPCyT-BID.

Caracterización de la inactivación de microorganismos de relevancia en jugos de naranja, zanahoria y melón procesados con luz UV-C

García Carrillo, M. (1); Ferrario, M. (1); Schenk, M. (1,2) y Guerrero, S.(1,2)

(1) Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, 1428, Buenos Aires.
(2) Miembro del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina

RESUMEN

Actualmente la irradiación UV-C puede utilizarse como reemplazo del tratamiento térmico pero la efectividad de la misma puede estar limitada a tratamientos superficiales o jugos claros. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la luz UV-C en la supervivencia de *E. coli* ATCC 35218 y *S. cerevisiae* KE 162 en jugos de zanahoria, melón y naranja. Se aplicaron tres modelos conceptualmente diferentes (Gompertz, Weibull y Geeraerd) para caracterizar las curvas de inactivación. El tratamiento UV-C provocó hasta 3,2-4,8 reducciones logarítmicas, obteniéndose mayor inactivación en jugo de melón. Los modelos permitieron caracterizar adecuadamente la inactivación observada, y el modelo de Gompertz sobreestimó la caída total en aquellas curvas que carecieron de cola marcada. *E. coli* fue la cepa más sensible al tratamiento. Solamente las distribuciones de frecuencias weibullianas correspondientes al tratamiento UV-C de jugo de melón carecieron de moda, con menores valores de media y varianza, y mayor sesgo respecto de las correspondientes a zanahoria y naranja, indicando que la mayor parte de la población se inactivó a cortos tiempos. La mayor efectividad en el jugo de melón puede atribuirse a menores valores de $Absorbancia_{254\ nm}$ y turbidez. Este estudio brinda información cuantitativa respecto del efecto de luz UV-C en la inactivación microbiana en jugos claros y de alta opacidad.

Palabras clave: luz UV-C, jugos naturales, inactivación microbiana, modelado matemático.

ABSTRACT

Nowadays UV-C processing can be used to replace thermal treatment. Although its effectiveness could be limited to superficial treatments or clear juices. The aim of the present work was to evaluate the effect of UV-C light on the survival of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* in fresh carrot, melon and orange juices. UV-C treatment produced up to 3.9, 4.1 and 4.8 log reductions of *E. coli*, and 1.9, 2.7 and 3.2 log reductions of *S. cerevisiae* in orange, carrot and melon juices, respectively. The three models adequately characterized survival curves, and only in some cases, Gompertz model overestimated the overall change in the number of survivors (C value) due to the absence of tail.*E. coli* resulted the most sensitive strain to UV-C treatment. Weibullian frequency distributions corresponding to inactivation in melon juice were skewed to the right, evidencing that the majority of the population was destroyed in a short time; while frequencies corresponding to carrot and orange juices, exhibited mode and heavy tails, indicating that an important fraction of the population survived after the combined treatment. The higher effectiveness of UV-C in melon juice could be attributed to its lower $Absorbance_{254\ nm}$ and turbidity. This study gives useful quantitative information regarding the effect of an innovative technology like UV-C treatment on clear and opaque fruit juices.

Keywords: UV-C light, Natural juices, Microbial inactivation, Mathematical modeling.

INTRODUCCIÓN

Las nuevas tecnologías de procesamiento no térmico de alimentos se han empleado en estos últimos años con el propósito de reemplazar, al menos parcialmente, la severidad de los tratamientos térmicos que ocasionan pérdidas de la apariencia natural y calidad nutricional, y al mismo tiempo que aseguren 5 reducciones log de los patógenos más resistentes (US FDA, 2000). La radiación ultravioleta de onda corta (UV-C) representa un posible tratamiento de fácil implementación y bajo costo como alternativa para la pasteurización de jugos.

El tratamiento con luz UV-C involucra el uso de radiación de la región del espectro electromagnético que se extiende entre los 100 y los 400 nm. En particular, la radiación UV-C en el rango de 250 – 280 nm (efecto máximo a ≅ 254 nm), es letal para la mayoría de los microorganismos y ha demostrado ser efectiva para la pasteurización de jugos frutales claros (Koutchma et al., 2004; Guerrero Beltrán, 2005; Shah et al., 2016), aunque es escasa la caracterización mediante modelados matemáticos de la inactivación microbiana por esta tecnología, y en particular, en jugos de alta turbidez.

El objetivo de este trabajo fue obtener y caracterizar mediante la utilización de tres modelos conceptualmente diferentes, las curvas de inactivación por tratamiento con luz UV-C de *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Saccharomyces cerevisiae*KE 162 en tres jugos naturales de zanahoria, naranja y melón, distintos respecto de sus parámetros físico- químicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de inóculos

En elpresente estudio se emplearon las cepas *E. coli* ATCC 35218 y *S. cerevisiae* KE 162. Se preparó el inóculo inicial transfiriendo dos ansadas de un cultivo fresco en estría a un erlenmeyer conteniendo 20 mL de caldo Tripteína Soya (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) para bacterias o caldo Sabouraud (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) para levaduras. Los caldos se incubaron a 37ºC durante 18 horas o 27ºC durante 24 horas respectivamente. Los inóculos se centrifugaron 5 min a 5000 rpm y fueron resuspendidos en agua peptonada 0,1%.

Elaboración de los jugos

Se utilizaron jugos recién obtenidos de zanahoria (*Daucus carota*, var. Chantenay, $pH_{ajust.}$: 5,0; 7,1°Brix; $\varepsilon_{absortividad}$: 0,26 cm^{-1}), naranja (*Citrus sinensis*, var. Valencia, pH: 3,5; 11,1 °Brix; $\varepsilon_{absortividad}$: 0,23 cm^{-1}) y melón (*Cucumis melo*, variedad rocío de miel, pH: 5,6 y 5,7 °Brix) adquiridas en un mercado local. Las mismas se desinfectaron previamente mediante lavados con hipoclorito de sodio 5% y agua estéril, con el fin de reducir la carga microbiana superficial. Los jugos se obtuvieron en el laboratorio en condiciones asépticas con un extractor de jugos de tipo hogareño (Black and Decker, modelo JE 1500, China). Los jugos de melón y naranja se filtraron utilizando gasa estéril y se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 rpm (centrífuga Rolco, modelo AMC 3550, Buenos Aires, Argentina) con el fin de disminuir la cantidad de pulpa. Todos los jugos fueron envasados al abrigo de la luz y almacenados a -18ºC hasta su posterior utilización.

Caracterización de los jugos

La turbidez de los sistemas se determinó mediante un turbidímetro (LaMotte, Maryland, EE.UU.) usando un patrón de formazina (100 y 4000 NTU). El tamaño de partícula en el rango de 0,1 a 1000 µm se determinó mediante dispersión estática de luz (DEL) en un equipo Mastersizer 2000 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido) equipado con una unidad de dispersión Hydro 2000MU (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). La velocidad de la bomba se programó a 1800 rpm. Para las determinaciones, se empleó un valor de índice de refracción de los jugos de 1,35 y absortividad igual a 0,1. El coeficiente de absortividad ($\varepsilon_{absortividad}$) de los jugos se midió en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso a 254 nm empleando un espectofotómetro UV-visible (Jasco V-630, Tokio, Japón) con el fin de determinar la transparencia de los jugos a la luz UV-C. Para ello, se midieron diluciones en el rango de 0,2 a 1% $^{V}/_{V}$ de cada muestra. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Para estos estudios, se empelaron muestras de jugo sin inocular.

Equipo de irradiación UV-C y procedimiento

El equipo de irradiación UV-C para el procesamiento de líquidos existente en el laboratorio consiste de dos lámparas UV-C (TUV-100 W, 253,7 nm, Philips, Holanda), ubicadas cada una dentro de un tubo de vidrio de 0,87 m de largo, dejando un espacio anular (diámetro externo= 0,031 m; diámetro interno= 0,024 m, volumen= 0,22 L), que funciona como cámara de irradiación. La entrada y salida del jugo a la cámara de irradiación se efectuó mediante una bomba peristáltica (Cole-Palmer, Masterflex, L/S 24, Illinois, EE.UU.) con mangueras que descargaban a un vaso doble camisa de 800 mL de capacidad. El vaso estaba conectado a un baño termostático (HAAKE, Mess-Technik, Karlsruhe, Alemania), de modo de alcanzar una temperatura constante durante la experiencia de 25 ±1°C. Las lámparas UV-C se mantuvieron encendidas durante 15 minutos y luego se recircularon 745 mL de jugo (1,6 L/min) con la luz apagada y se añadieron 5 mL del inóculo, los cuales se recircularon durante 2 minutos, con el propósito de lograr el mezclado del sistema y posteriormente se encendió la lámpara. Se colectaron muestras entre los 0 y 15 minutos (0-11,4 kJ/m^2). Las experiencias se llevaron a cabo por duplicado para cada condición. Las dosis aplicadas se determinaron mediante un radiómetro (Melles Griot, modelo 13 PEM 001, Colorado, EE.UU.).

Determinación de microorganismos sobrevivientes

Las muestras irradiadas, tomadas a distintos intervalos de tiempo, fueron apropiadamente diluidas y sembradas por duplicado con un plaqueador orbital (Autoplate 4000, Spiral Biotech, EE.UU), en agar Tripteína Soya o agar Sabouraud (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia) e incubadas a 37°C ó 27°C para *E. coli* y *S. cerevisiae* respectivamente, durante 24 a 48 horas. Las curvas de inactivación se generaron a partir de los datos experimentales, graficando la fracción sobreviviente, Log N/N_o (donde N es el número de UFC/mL a un tiempo dado y N_o el número inicial de UFC/mL) versus el tiempo de tratamiento.

Modelado matemático

Uno de los modelos para estudiar la cinética de inactivación de los diferentes microorganismos por radiación UV-C fue el modelo de distribución de frecuencias de resistencias tipo Weibull (Peleg y Cole, 1998):

$$S_{(t)} = \log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -b \cdot t^n \qquad (1)$$

donde S es la fracción de supervivientes; *b* y *n* son los parámetros de escala y de forma respectivamente. Los valores de *b* y *n* luego fueron usados para generar las curvas de frecuencia de resistencias utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{d\phi}{dt_c} = bnt_c^{n-1}\exp\left(-bt_c^n\right) \qquad (2)$$

donde t_c es una medida de la resistencia o sensibilidad del microorganismo al tratamientoaplicado y $\frac{d\phi}{dt_c}$ es la distribución de tipo Weibullcorrespondiente a t_c. Todos los parámetros del modelo se calcularon aplicando el procedimiento de regresión no lineal deStatgraphics Plus para Windows 5.1® (Statistical Graphics Corp., Washington, EE.UU.). Asimismo, se calcularon otros parámetros estadísticos de la distribución (moda, media,varianza, y coeficiente de sesgo) (Peleg y Cole, 1998). Las curvas de inactivación fueron también ajustadas por el modelo de Gompertz (Linton et al., 1995):

$$\text{Log}\,[N_{(t)}/N_{(0)}] = Ce^{-e(A+Bt)} - Ce^{-e(A)} \qquad (3)$$

donde, los parámetros *A*, *B* y *C* representan las diferentes regiones en la curva de inactivación: (*A*), el hombro inicial [min]; (*B*), la tasa máxima de inactivación [min^{-1}] y (*C*), el cambio global en el número de sobrevivientes [–].

Los modelos de Geeraerd, en sus versiones de cola u hombro fueron también aplicados:

$$\log(N) = \log\left[\left(10^{\log(N_0)} - 10^{\log(N_{res})}\right).e^{-k_{max}.t.}\left(\frac{e^{k_{max}.SL}}{1+\left(e^{k_{max}.SL}-1\right).e^{-k_{max}.t}}\right) + 10^{\log(N_{res})}\right] \quad (4)$$

donde, *SL* representa la duración del hombro, definido como el tiempo en que comienza la inactivación; k_{max}, la tasa de inactivación; *RL*, las reducciones logarítmicas, calculadas como el cociente entre el logaritmo del número inicial de microorganismos (N_0) y el logaritmo del número residual de microorganismos finalizado el tratamiento (N_{res}). Las versiones del modelo de Geeraerd con hombro corresponden a la condición de N_{res}=0 de la ecuación 4, mientras que para la versión con cola, corresponde a la condición de *SL*=0

Los parámetros de los modelos y los estadísticos asociados (coeficiente de determinación, R_{aj}^2, raíz cuadrada de los cuadros medios del error (RMSE) y los criterios de Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC) fueron calculados mediante el programa InfoStat 2009 (InfoStat Group, FCA-UNC, Argentina).
Se efectuó un análisis de componentes principales (PCA) a modo de ilustrar la relación entre las reducciones alcanzadas para los distintos sistemas tratados y los parámetros de los modelos de Weibull, Gompertz y Geeraerd. El coeficiente de correlación cofenético (*CCC*) estima en qué medida el análisis respeta la distancia original entre las variables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Figura 1** muestra el comportamiento de *E. coli* y *S. cerevisiae* en los diferentes jugos procesados con luz UV-C. Las curvas de inactivación para ambos microorganismos, presentaron en el caso de jugo de melón, una marcada concavidad hacia arriba. Mientras que para *E. coli* en los jugos de naranja y zanahoria, las curvas de inactivación exhibieron hombro seguido de un comportamiento casi lineal y, una leve concavidad hacia abajo en el caso de *S. cerevisiae*. Se alcanzó una reducción moderada de 1,9 a 3,2 ciclos log para la levadura; y una importante reducción de 3,9 a 4,8 ciclos log para *E. coli*. En concordancia con lo observado en jugo de melón, Taze et al. (2015) reportaron concavidad hacia arriba para la inactivación de la flora nativa en jugo de naranja tratado con luz UV-C (0-1.10 KJ/m^2). En cambio, Guerrero- Beltrán y Barbosa- Cánovas (2005) detectaron una cinética aproximadamente lineal para la inactivación de *S. cerevisiae* en jugo de manzana procesado por luz UV-C. Estos hallazgos están en concordancia con nuestros resultados correspondientes a la inactivación en jugo de naranja y de zanahoria.

Los datos de las curvas de inactivación fueron modelados aplicando la forma acumulativa de la distribución de frecuencia de resistencias de Weibull y el modelo de Gompertz (**Figura 1I**), y las diferentes versiones del modelo de Geeraerd (**Figura 1II**). El modelo weibulliano ajustó adecuadamente los datos experimentales con valores del coeficiente de determinación, R^2, en el rango de 93,6 a 99,6%. Los valores de los parámetros *b* y *n* fueron utilizados para obtener las distribuciones de frecuencia de resistencias correspondientes a los distintos microorganismos (**Figura 2**). Estas distribuciones de frecuencia carecieron de moda y presentaron importantes sesgos a la derecha en el jugo de melón, es decir que la mayor parte de los microorganismos en la población fueron sensibles a los efectos de la luz UV-C a dosis bajas en ambos casos. Estos resultados concuerdan con aquellos observados por Schenk et al. (2008) para el tratamiento con luz UV-C (0-87 KJ/m2) de rodajas de pera inoculadas con *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114D, *Escherichia coli* ATCC 11229, y *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256. Ellos también observaron distribuciones de frecuencias de resistencias sesgadas a la derecha similares a las de este trabajo y con esparcimiento considerable de los datos de muerte (valores de varianza grandes), sin cola ni moda.

Por el contrario, las distribuciones de frecuencias de resistencias de *S. cerevisiae* en los jugos de naranja y de zanahoria, y de *E. coli* en naranja, exhibieron moda, alta varianza y notoria cola, indicando una importante resistencia al tratamiento

UV-C (**Figura 2**). Las distribuciones correspondientes a jugo de melón carecieron de moda y presentaron menor valor de media y varianza respecto a los jugos de naranja y zanahoria (**Tabla 2**), por lo cual resultó una matriz más adecuada para la inactivación por UV-C.

El modelo de Gompertz ajustó adecuadamente los datos experimentales de todas las curvas de supervivencia con valores de coeficiente de determinación, R^2, en el rango de 97,7 a 99,9%. De los valores de los parámetros estimados (**Tabla 1**) se desprende nuevamente que el tratamiento UV-C fue más efectivo en el jugo de melón, por presentar menor valor *A* (duración de hombro inicial), mayor caída total (*C*) y mayor tasa de inactivación (*B*). Excepcionalmente, el modelo sobreestimó un mayor valor de *C* para el jugo de zanahoria, debido a que su curva de inactivación careció de una cola marcada. La sobreestimación del parámetro *C* también fue reportada por Ferrante et al. (2007), quienes aplicaron el modelo de Gompertz modificado para modelar la inactivación de *L. monocytogenes* en jugo de naranja fresco (pH: 3,5) aditivado con vainillina (0; 1000 y 1500 ppm) y sonicado (600 W, 20 kHz, 95,2 micrómetros de amplitud de onda; 45°C). Ellos describieron una sobreestimación del parámetro *C* para las condiciones más severas de tratamiento (100 y 1500 ppm de vainillina), dado que la población microbiana fue inactivada rápidamente generando una curva de inactivación sin una región de cola y siguiendo casi una cinética de primer orden.

De los dos microorganismos tratados, *E. coli* resultó la cepa más sensible al tratamiento UV-C, por exhibir menor valor de *A*, y mayores valores de *B* y *C* (**Tabla 1**). En concordancia, Gayán et al. (2016) también reportaron que las bacterias Gram- negativas resultaron más sensibles a la luz UV-C que las levaduras.

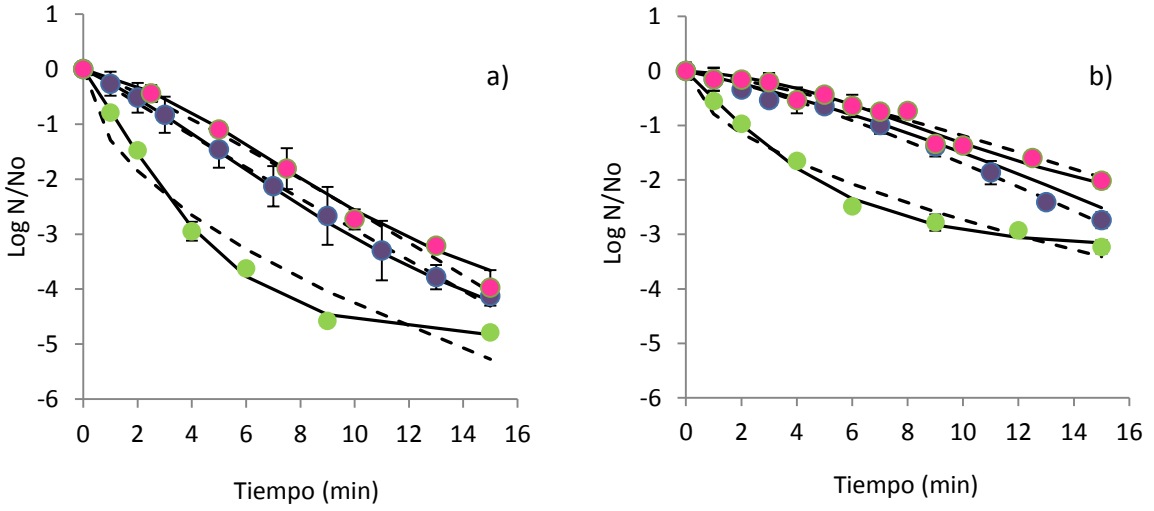


Figura 1. Curvas de inactivación de *E. coli* (a) y *S. cerevisiae* (b) en jugos de melón (●), zanahoria (●) y naranja (●) tratados por luz UV-C durante 15 min (dosis máxima 11,4 KJ/m^2). Datos experimentales (punto) y ajuste por el modelo de Weibull (línea discontinua) y el modelo de Gompertz (línea continua).

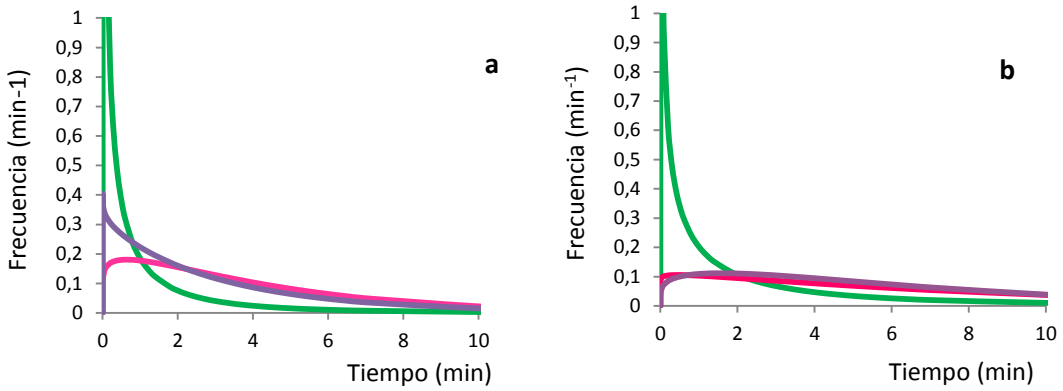


Figura 2. Distribuciones de frecuencias de resistencias correspondientes al modelo de Weibull para la inactivación de *E. coli* (a) y *S. cerevisiae* (b) en jugos de melón (—), zanahoria (—) y naranja (—) durante 15 min UV-C (dosis máxima 11,4 KJ/m^2).

Asimismo, el modelo de Geeraerd ajustó adecuadamente los datos experimentales presentando valores de coeficiente de determinación, R^2, en el rango de 95,3 a 99,7%. En concordancia con lo predicho por el modelo de Gompertz, en el jugo de melón se observó la mayor tasa de inactivación (k_{max}) para ambos microorganismos. En cambio, este modelo fue más inflexible en detectar la presencia de hombro, dado que sólo resultó significativo para las curvas de inactivación de ambos microorganismos tratados en jugo de naranja y para *S. cerevisiae* inoculada en zanahoria (**Tabla 1**). En los casos que las curvas presentaron cola marcada, este modelo también permitió estimar la caída total (*RL*) (**Tabla 1**), cuyos valores predichos son más similares a los valores observados, que los predichos por el modelo de Gompertz.

El modelo de Gompertz brindó mejor ajuste a los datos experimentales, exhibiendo menores valores de RMSE, AIC y BIC en 4 de 6 casos evaluados, seguido Weibull (2 casos favorables) (datos no presentados). El modelo de Geeraerd presentó menor valor predictivo respecto a los otros modelos de acuerdo a los criterios de AIC y BIC, los cuales consideran en simultáneo el ajuste y la parsimonia del modelo. Por lo cual, es probable que este modelo presente sobre-parametrización, y que los criterios de AIC y BIC penalicen el alto número de parámetros presentes en este modelo.

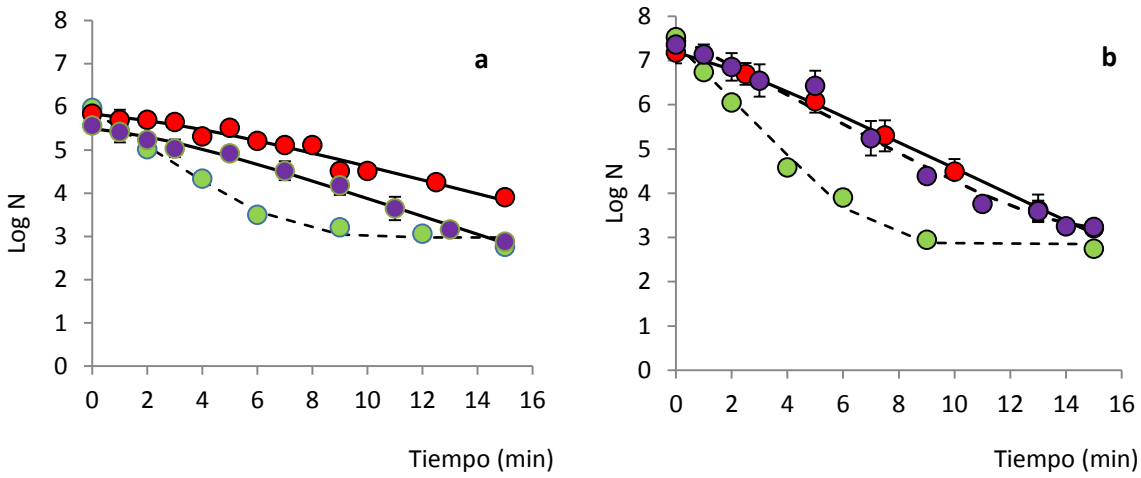


Figura 3. Curvas de inactivación de *E. coli* (a) y *S. cerevisiae* (b) en jugos de melón (●), zanahoria (●) y naranja (●) tratados por luz UV-C durante 15 min (dosis máxima 11,4 KJ/m^2). Datos experimentales (punto) y ajuste por el modelo de Geeraerd con hombro (línea continua) o cola (línea discontinua).

Con el propósito de analizar las diferencias en cuanto a la inactivación observada entre los jugos estudiados, se determinó el coeficiente de absortividad de los mismos a 254 nm, la turbidez y el tamaño de partícula. La absortividad y la turbidez de los jugos mostró una asociación negativa con la efectividad de la inactivación: el jugo de zanahoria presentó la mayor absortividad y turbidez, seguido por el jugo de naranja, y por último el jugo de melón. Esto quiere decir que, la cantidad total de partículas y los sólidos disueltos que absorben en la región germicida de la lámpara, impedirían laabsorción de luz UV-C por parte de los microorganismos, disminuyendo la eficacia del proceso de desinfección (Koutchma et al., 2004).

Tabla 1. Parámetros estimados correspondientes a los modelos de Weibull, Gompertz y Geeraerd para estimar la inactivación de *S. cerevisiae* y *E. coli* en jugos de melón, naranja y zanahoria tratados con luz UV-C (0-11,4 kJ/m^2).

		Weibull			Gompertz modificado					Geeraerd		
Microorganismo	matriz	*b* (min^{-n})	*n* (-)	R^2_{aj}	*A* (min)	*B* (min^{-1})	*C* (-)	R^2_{aj}	*RL*	k_{max} (min^{-1})	*SL* (min)	R^2_{aj}
E. coli	Naranja	0,19	1,13	99,2	1,16	-0,17	-4,96	99,2	3,9	0,68	1,10	99,7
	Zanahoria	0,32	0,96	99,6	0,73	-0,14	-6,48	99,9	4,1	0,76	-	98,1
	Melón	1,29	0,52	93,6	0,41	-0,34	-6,28	99,7	4,8	1,45	-	98,7
S. cerevisiae	Naranja	0,07	1,23	97,4	1,40	-0,17	-2,90	97,7	1,9	0,37	2,55	95,3
	Zanahoria	0,1	1,23	99,1	1,00	-0,05	-11,90	99,2	2,7	0,48	2,29	99,1
	Melón	0,79	0,54	97,9	0,05	-0,28	-4,97	99,1	3,2	0,94	-	98,6

Tabla 2. Parámetros estadísticos asociados a las distribuciones de frecuencia de resistencia correspondientes al modelo de Weibull para la inactivación de *E. coli* y *S. cerevisiae* en jugos de naranja, zanahoria y melón sometidos a luz UV-C durante 15 min (dosis máxima 11,4 kJ/m^2).

		t_{cm} (min)	t_c (min)	*Varianza* (min^2)	*Sesgo* (-)
E. coli	Naranja	0,64	4,16	13.6	1,9
	Zanahoria	-	3,34	12,1	2,2
	Melón	-	1,14	5,9	5,6
S. cerevisiae	Naranja	2,22	8,12	44,1	1,8
	Zanahoria	1,66	6,08	24,7	1,8
	Melón	-	2,84	27,2	4,5

La **Figura 4** muestra el gráfico en dos dimensiones correspondiente al PCA que vincula los parámetros de los modelos y las reducciones log alcanzadas para cada sistema. El parámetro *CCC* resultó igual a 0,99; lo cual asegura una adecuada reducción de la información con este análisis. La componente principal 1 (CP 1), la cual explicó el 71,3% de la varianza, estuvo asociada positivamente a *A*, moda, media, varianza y *SL*, y negativamente a *B*, sesgo y k_{max}. La CP 2, explicó el 14,5% restante de la varianza, y mostró asociación positiva con *C*. El análisis mostró que los sistemas correspondientes a jugo de melón estuvieron asociados a mayor tasa de inactivación (k_{max}) y mayor sesgo, y menores valores de moda, *SL*, media y varianza. Lo que indica que el tratamiento por luz UV-C fue más efectivo para la inactivación en jugo de melón, encontrándose una leve diferencia en la sensibilidad de los microorganismos al tratamiento. En cambio, sí se observó una importante diferencia en la resistencia a la acción germicida de la luz UV en zanahoria y naranja, donde *E. coli* resultó más sensible al tratamiento en estas matrices.

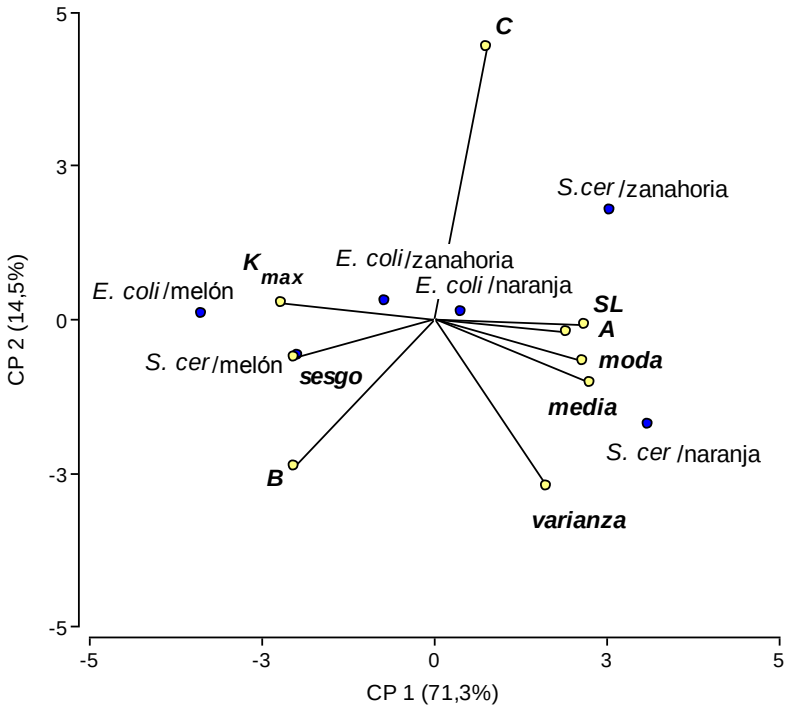


Figura 4. PCA que representa la relación espacial entre los parámetros de los modelos de Weibull, Gompertz y Geeraerd y la inactivación observada para *E. coli* y *S. cerevisiae* en los jugos de melón, zanahoria y naranja.

CONCLUSIONES

Este estudio aportó información cuantitativa relevante acerca de la influencia de una tecnología de preservación de jugos, como lo es la luz UV-C, sobre la inactivación de algunos microorganismos de relevancia. Se alcanzó una inactivación moderada para *S. cerevisiae* (1,9-3,2 reducciones log) y una importante inactivación de E. *coli* (3,9-4,8 reducciones log) en los tres jugos. La inactivación resultó más efectiva en el jugo de melón, debido a su menor turbidez y absorbancia en la región UV-C. El análisis de componentes principales reveló asociaciones entre los distintos sistemas y los parámetros de los modelos, permitiendo una mejor comprensión de la variabilidad obtenida en la efectividad del tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

Ferrante, S., Guerrero, S., & Alzamora, S. M. 2007. Combined use of ultrasound and natural antimicrobials to inactivate *Listeria monocytogenes* in orange juice. Journal of Food Protection, 70(8), 1850-1856.

Gayán, E., Serrano, M. J., Álvarez, I., & Condón, S. 2016. Modeling optimal process conditions for UV-heat inactivation of foodborne pathogens in liquid foods. Food Microbiology, 60, 13-20.

Guerrero Beltrán, J.A., Barbosa-Cánovas, G. 2005. Reduction of S*accharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in apple juice by ultraviolet light. Journal of Food Process Engineering, 28: 437-452.

Koutchma, T., Keller, S., Chirtel, S., Parisi, B. 2004. Ultraviolet disinfection of juice products in laminar and turbulent flow reactors. Innovative Food Science and Engineering Technologies, 5: 179–189.

Linton, R.H., Carter, W.H., Pierson, M.D., Hackney, C.R., Eifert, J.D. 1995. Use of modified Gompertz equation to predict the effects of temperature, pH and NaCl on the inactivation of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, 59:16-23

Peleg M., Cole M.B. 1998. Reinterpretation of microbial survival curves. Critical Reviews in Food Science, 38: 353-380.

Shah, N.N., Shamsudin, R., Rahman, R., Adzahan, N. 2016. Fruit Juice Production Using Ultraviolet Pasteurization: A Review. *Beverages, 2 doi:10.3390/beverages2030022.*

Schenk, M., Guerrero, S., & Alzamora, S. M. 2008. Response of some microorganisms to ultraviolet treatment on fresh-cut pear. Food and Bioprocess Technology, 1(4), 384-392.

Taze, B. H., Unluturk, S., Buzrul, S., & Alpas, H. 2015. The impact of UV-C irradiation on spoilage microorganisms and colour of orange juice. Journal of food science and technology, 52(2), 1000-1007.

US FDA. 2000. Irradiation in the production, processing and handling of food. Federal Register, 65: 71056-71058

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universidad de Buenos Aires, CONICET, ANPCyT-BID e Instituto Nacional de la Yerba Mate.

Influence of temperature and surface on adhesión process of Staphylococcus aureus isolated from brazilian dairies.

Martin J.G.P. (1), Morales C.B. (2), Silva G.O.S (2), Fonseca C.R. (2), Belmonte C.P. (2), Miquelutti D.L.2, Porto E. (2)

(1) Department of Microbiology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil.
(2) Hygiene and Dairy Laboratory, Luiz de Queiroz College of Agriculture (ESALQ), Piracicaba, São Paulo, Brazil.
Dirección de e-mail: guilherme.martin@ufv.br

RESUMEN

Las biopelículas consisten en importante fuente de contaminación de los alimentos en las industrias de lácteos. *Staphylococcus aureus* es un patógeno implicado con frecuencia en las enfermedades transmitidas por los quesos. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la influencia de la temperatura y de la superficie sobre la adhesión de *S. aureus* aislado de industrias lácteas brasileñas productoras de queso Minas Frescal. Los ensayos de adhesión se realizaron en cupones en reactor de biopelícula, comparando la adhesión entre dos temperaturas (5°C y 35°C), dos superficies (acero inoxidable y polipropileno) y tres tiempos de contacto (3, 6, 12 horas). El número de células adheridas en ambas superficies fue de 3,0 y 6,0 log10 UFC.cm^{-2} a 5°C y 35°C, respectivamente, para la mayoría de las situaciones evaluadas. En general, la temperatura de 35°C favoreció la adherencia de *S. aureus*. A 5°C, hubo un número considerable de células adheridas, pero en poblaciones significativamente inferiores a las observadas a 35°C. No se observó interacción entre superficie y temperatura. El estudio demostró la capacidad de adhesión de *S. aureus* aislado de industrias lacteas brasilenãs, situación que puede favorecer el desarrollo de biopelículas en equipos y utensilios, con riesgo para la salud de los consumidores.

Palabras claves: Biopelículas, Lacteos, Acero inoxidable, Polipropileno, *Staphylococcus aureus.*

ABSTRACT

Biofilms consist in important source of food contamination in dairy industries. *Staphylococcus aureus* is a pathogen frequently involved in foodborne diseases caused by cheese consume. This study aimed to evaluate the influence of temperature and surface on adhesion of *S. aureus* isolated from Brazilian dairies. The isolates were collected from industries producers of Minas Frescal cheese. The adhesion assays were performed in coupons in a biofilm reactor, comparing the adhesion between two temperatures (5°C and 35°C), two surfaces (stainless steel and polypropylene) and three contact times (3, 6, 12 hours). The number of cells adhered on both surfaces was about 3.0 and 6.0 $\log_{10}$ FCU.cm^{-2} at 5°C and 35°C, respectively, for most of the situations, with a significant increase over the evaluation period. In general, the temperature of 35°C favored a greater adherence of *S. aureus*. At 5°C, there was a considerable number of adhered cells, but in populations significantly lower than those observed at 35°C. Interaction between surface and temperature was not observed. The study demonstrated the ability of adhesion of isolated *S. aureus* from Brazilian dairies, a situation that may favor the development of biofilms on equipment and utensils, indicating health risk to the consumers.

Keywords: Biofilm, Dairy, Stainless steel, Polypropylene, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCTION

Regarding to the microbiological safety, the most part of the problems for the dairy industry consist in the biofilm formation in processing plants. The presence of bacterial communities on surfaces of utensils and equipment represents the main source of dairy products contamination by pathogenic bacteria. Its epidemiologic importance is indicated by the large number of published studies about the persistence of pathogens involved in foodborne diseases on surfaces that have direct contact with food (Simões et al. 2010, Oliveira et al. 2013).

Biofilms are defined as a bacterial community associated irreversibly to a surface and protected by in a polysaccharide matrix (Donlan 2002). Its formation occurs in three distinct stages: adhesion, consolidation and colonization. In the first step, physical forces play an important role, allowing the adhesion of the bacterium to all types of surfaces, including equipment used in food processing. After the initial stage, bacteria start to produce a layer of extracellular substances (EPS), which makes the adhesion irreversible. The EPS layer favor the establishment and multiplication of the bacterial cells on the surface, resulting in a mature biofilm (Notermans et al 1991).

Surface characteristics, such as composition and conservation status, influence directly in the bacterial adhesion process (Joseph et al. 2001). Despite its apparent uniformity, equipment surfaces, when observed microscopically, showed a lot of cracks and grooves, whereas microorganisms can adhere and start the process of biofilm formation (Stone and Zottola 1985).

In the food industry, the biofilm formation is influenced by different variables, as appropriate design of equipment, raw material quality, efficiency of cleaning process, among others. The non-compliance with the basic quality requirements can favor the bacterial adhesion on surfaces from the food processing plants, resulting in contamination of the final product and health risks to consumers (Kumar and Anand 1998, Joseph et al. 2001).Moreover, the high amounts of residues from the food processing favors the bacterial adhesion and the biofilm formation in equipment, providing protection to the microorganisms (Chmielewski and Frank 2003). In the dairies, milk residues, especially proteins and minerals such as calcium phosphate are generally constituents of the biofilm matrix in tanks and pipes (Bremer et al. 2006).

Studies about the influence of the variables involved in the adhesion process, as surface composition, temperature, contact time, residues (carbohydrates, fats, proteins and minerals) and bacterial species could be help to understand the biofilm formation, facilitating its control within the food industry (Simões et al. 2010).This study aimed to evaluate the influence of temperature and surface on adhesion of *S. aureus* isolated from Brazilian dairies.

MATERIAL AND METHODS

The *S. aureus* strains used in this study (n=3) were collected from dairy plants producing Minas Frescal cheese, a Brazilian fresh cheese with high water activity, from the following places: cutting lire (S1), food handlers (S2) and syneresis table (S3). In all strains were identified genes responsible by the polysaccharides production, which is involved in adhesion and biofilm formation process (*icaA* and *icaD* genes).

Adhesion study

Coupons (12 mm diameter) produced with stainless steel (AISI 304) and polypropylene were used as surfaces for bacterial adhesion. The coupons were cleaned by immersion in 1.0% sodium hydroxide solution (m/v) during 30 minutes, rinsed in distilled water, immersed in 70% alcohol (v/v) and finally rinsed with distilled water. Then, the coupons were sterilized by autoclaving at 121°C during 15 minutes (Travagin 2010).

The coupons were kept into a biofilm reactor (CDC 90 Biofilm Reactor). The system was sterilized (autoclaving at 121°C/15 min). Four hundred milliliters of UHT milk inoculated (10^4 CFU/mL milk) were transferred to the biofilm reactor. Thus, the coupons were removed aseptically after 3, 6 and 12 hours of incubation. The system was submitted to 5°C and 35°C for the surfaces evaluated (stainless steel and polypropylene).

Figure 1. The CDC Biofilm Reactor.

Aliquots of the milk used in the assays before the inoculation were also incubated to check their sterility. After incubation, the coupons were aseptically removed from the biofilm reactor, rinsed to remove non-adhered cells (Phosphate Buffer at pH 7.2), transferred to tubes with saline peptone water and sonicated at 20 kHz during 1 min. Dilutions were prepared from the first tube and pour plate was carried out for enumeration on Petri dishes containing Trypticase Soy Agar (TSA), incubated at 35°C/48 h. The bacterial population adhered to the surface of coupons was determined using the equation: CFU/cm^2 = CFU/mL of suspension × (diluent volume (mL) / sample area in cm^2). In this step, the enumeration averages of 3 coupons per experiment were considered. The experiment was performed with 2 repetitions.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

In order to study the characteristics of the surfaces and adhered cells, the coupons were submitted to SEM analysis. They were washed in phosphate buffer to remove non-adherent cells and fixed in modified Karnovsky solution. Thus, the coupons were washed three times during 10 minutes in 0.05 M cacodylate buffer and the dehydration was performed using acetone in increasing concentrations (25%, 50%, 75%, 90%, 100%) (10 minutes in each solution). For removal of acetone, the critical point drying was performed in CO_2 chamber. The polypropylene coupons were submitted to the ethanol dehydration. After that, the coupons were placed on stubs and metallized using gold (Ribeiro-Furtini 2005, Santos 2009). The stubs were analyzed by Scanning Electron Microscope ZEISS DSM 940 A.

Statistical analysis

The results were analyzed by ANOVA according to a completely randomized design in a 3 × 2 × 2 factorial arrangement – 3 times (3, 6 and 12 hours), 2 temperatures (5 and 35°C) and 2 surfaces (stainless steel and polypropylene), in triplicate and 2 repetitions, with minimum level of significance of 5% (SAS 2002).

RESULTS AND DISCUSSION

Regarding S3 Strain, the bacterial population adhered after 3 hours of incubation ranging from about 3.0 $\log_{10}$ CFU/cm^{-2} to 6.0 $\log_{10}$ CFU/cm^{-2} at 35°C (**Figure 2**). This considerable increasing was observed to both surfaces in this temperature, but not at 5°C.

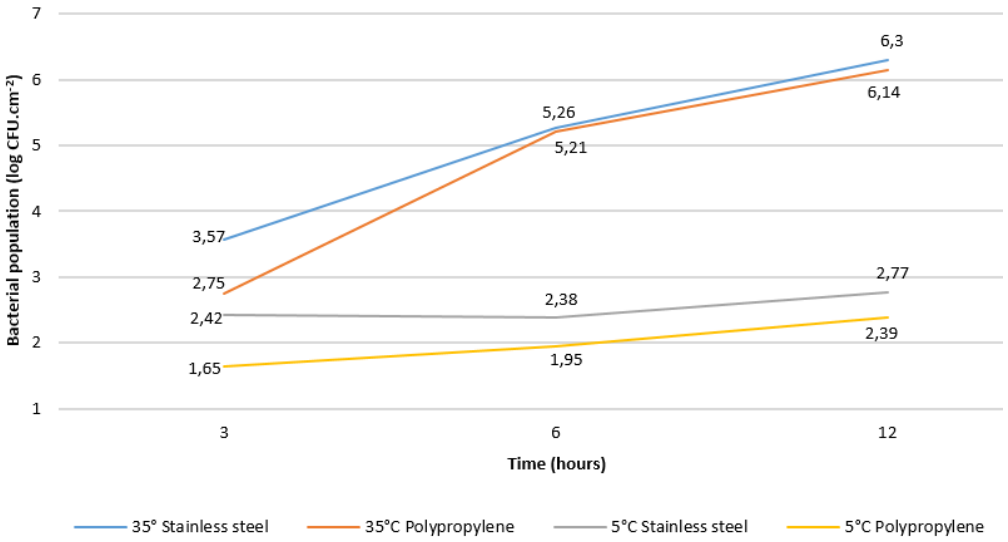


Figure 2. Enumeration of adhered *S. aureus* isolated from cutting lire (S1) at different conditions.

The differences in adhesion between the surfaces at 35°C were not significant ($p < 0.05$). In other words, was not influence of the surface on bacterial adhesion. Luppens et al. (2002) found that the type of material did not influence the bacterial adhesion of *S. aureus* on the surfaces evaluated (glass, stainless steel and polystyrene). However, other studies indicate a higher adhesion of *S. aureus* on stainless steel at 25°C in comparing to polypropylene surface. According the authors, the results may vary depending on the growth substrate and the biofilm study conditions evaluated (Oulahal et al. 2008).

The SEM analysis showed cells adhered to polypropylene surface (**Figure 3**). In this figure, residues of milk can be observed around the bacterial cell, demonstrating the influence of the food residues in the adhesion process.

The S2 strain showed similar results to temperatures and surfaces evaluated (**Figure 4**). There was a considerable increasing on adhesion during the incubation at 35°C, which is probably due to *S. aureus* is a mesophilic micro-organism, whose optimum growth temperature is around 40°C. At 5°C, the increasing from 3 to 12 hours of contact was statistically insignificant.

For this strain, the SEM showed a lot of cells adhered on the coupon surface with potential to form a biofilm (**Figure 5**). Some irregularities and deposited material can be observed, representing a situation where the bacterial adhesion certainly was favored.

Finally, for the strain S3, a different pattern was observed in comparing to the others strains. In this situation, a higher counting of adhered cells for the polypropylene surface was observed (**Figure 6**).

Polypropylene is the material used to produce cheese molds.Despite strain S3 has been isolated from syneresis table, it could contaminate cheeses kept on the table during the syneresis process, allowing the cross-contamination of cheese molds. As demonstrated above, polypropylene molds could favor the adhesion of bacterial cells, providing a favorable condition for biofilm formation in this material. Since the shaped cheeses are kept at refrigeration temperature, this experiment represents a similar situation frequently observed in practice. Regarding the shape process, the cheeses are kept inside the molds during about 2 hours, which could increase the risks of dissemination of *S. aureus* potentially biofilm producer to the final product.

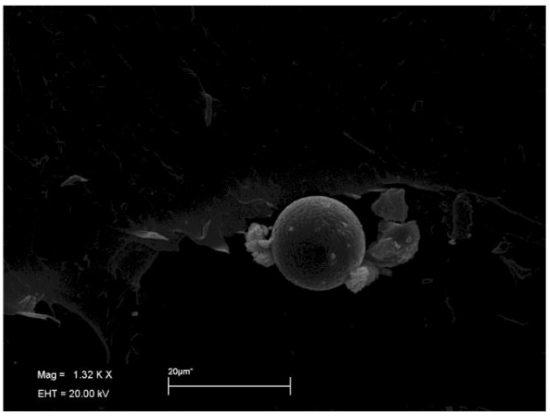


Figure 3. SEM of the polypropylene coupon incubated at 35°C after 12 hours (S2).

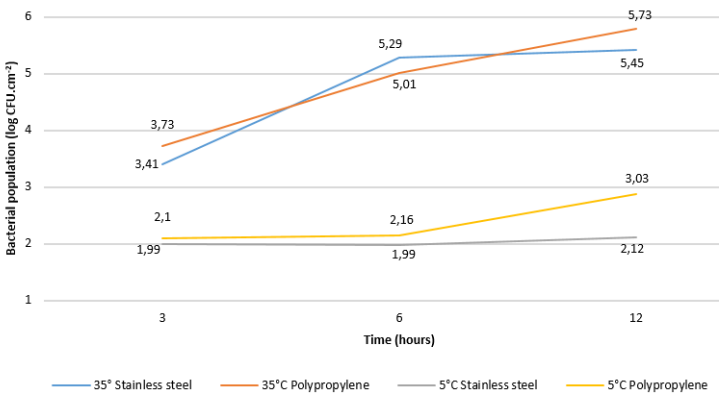


Figure 4. Enumeration of adhered cells of *S. aureus*isolated from food handlers (S2) at different conditions.

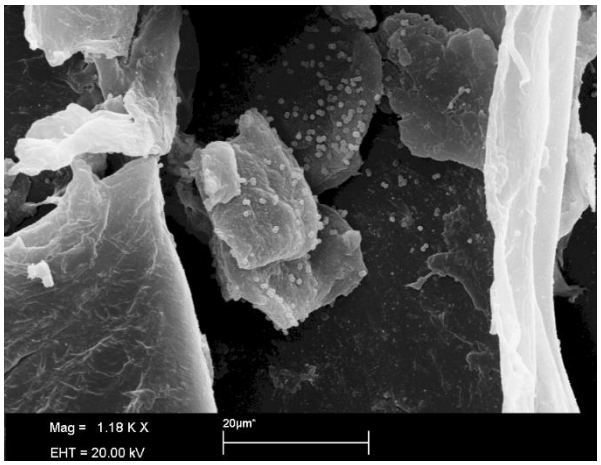


Figure 5. SEM of the polypropylene coupon incubated at 35°C after 12 hours (S2)

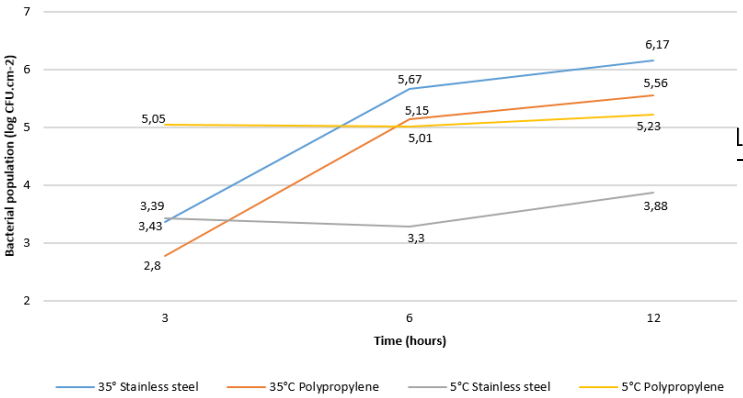


Figure 6. Enumeration of adhered cells of *S. aureus* isolated from syneresis table (S3) at different conditions.

.

CONCLUSIONES

The temperature of 35°C showed a positive influence on adherence of *S. aureus* in both surfaces evaluated. In general, no interaction was observed between surface and temperature on the adhesion process. The results demonstrated the ability of adhesion of isolated *S. aureus* from dairy on surfaces commonly found in Minas fresh cheese production, a situation that may favor the development of biofilms on equipment and utensils, indicating health risk to the consumers.

REFERENCES

Bremer PJ, Fillery S, Mcquillan AJ. 2006. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. International Journal of Food Microbiology, 106: 254-262.

Chmielewski RAN, Frank JF. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2: 22-32.
Donlan RM. 2002. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Disease Journal, 8: 881-890.
Joseph B, Otta SK, Karunasagar I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. International Journal of Food Microbiology, 64: 367-372.
Kumar CG, Anand SK. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. International Journal of Food Microbiology, 42: 9-27.
Luppens SB, Reij MW, Heijden RW, Rombouts FM, Abee T. 2002. Development of a standard test to assess the resistance of Staphylococcus aureus biofilm cells to disinfectants. Applied and Environmental Microbiology, 68: 4194-4200.
Notermans S, Dormans JANA, Mead GC. 1991. Contribution of surface attachment to the establishment of micro-organisms in food processing plants: a review. Biofouling, 5: 21-36.
Oliveira MMM, Brugnera DF, Piccoli RH. 2013. Biofilmes em indústrias de laticínios: aspectos gerais e uso de óleos essenciais como nova alternativa de controle. Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes", 68: 65-73.
Oulahal N, Brice W, Martial A, Degrave P. 2008. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. Food Control, 19: 178-185.
Ribeiro-Furtini LL. Caracterização e isolamento de microrganismos aderidos em tubulação de laticínio e seu comportamento frente à detergência. 80 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2005.
Simões M, Simões LC, Vieira MJ. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. Food Science and Technology, 43: 573-583.
Travagin BNFS. Estudo da formação de biofilmes de *L. monocytogenes* frente a diferentes condições encontradas em laticínios. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2010.

AKNOWLEDGEMENTS
To FAPESP by the financial assistance (Processo FAPESP n. 2011/07192-7) and to CAPES by the scholarships.

Emulsiones gelificadas de caseinoglicomacropéptido como *carriers* de compuestos bioactivos

Morales R.1.(1), Martinez M.J.(1), Pilosof A.M.R.(1,2.)

(1) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
(2) Universidad de Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

El uso de emulsiones para el delivery de moléculas de interés permite la incorporación de lípidos o compuestos hidrofóbicos bioactivos en alimentos. El caseinoglicomacropéptido (CMP) es un péptido bioactivo obtenido por hidrólisis de κ–caseína con propiedades biológicas y gelifica a temperatura ambiente y pH ácido. Para evaluar la potencialidad del CMP de formar y estabilizar emulsiones gelificadas, se prepararon emulsiones aceite en agua(O/W) usando CMP con Tween80, gelatina, lecitina, goma arábiga y caseinato de sodio (CasNa) a pH6,5. Posteriormente, se disminuyó el Ph(hasta 2-3) para promover su gelificación y luego se aumentó el pH a 6,5 para revertir la gelificación. Se determinó el tamaño de gota, mediante un equipo de dispersión estática de luz Mastersizer2000, de las emulsiones a pH 6,5 antes de la gelificación y luego de la reversión por pH. Las emulsiones de CMP resultaron inestables y la adición de Tween80, lecitina oCasNa mejoró su estabilidad. Las emulsiones de CMP-Tween80 presentaron la mayor estabilidad aún después de revertirlas. Estas emulsiones gelificadas tienen un promisorio uso como *carrier* de ingredientes funcionales porque además de incluir CMP que presenta propiedades bioactivas, serían útiles para transportar aceites bioactivos y minerales unidos al CMP.

Palabras Claves: Caseinoglicomacropéptido, Emulsiones gelificadas, Delivery, Compuestos bioactivos.

ABSTRACT

The use of emulsions for the delivery of molecules of interest allows the incorporation of lipidorhydrophobicbioactive compounds in foods. Caseinglycomacropeptide (CMP) is a bioactive peptide obtained by hydrolysis of κ-casein with biological properties and forms gels at room temperature and acidic pH conditions. In order to evaluate the potential use of CMP to form and stabilize gelled emulsions, O/W emulsions were prepared using CMP and Tween 80, gelatin, lecithin, arabic gum and sodium caseinate (NaCas) at pH 6.5. Subsequently, the pH was adjusted (to 2-3) to promote thegelation and then the pH was restored to 6.5 to reverse gelation. The droplet size of the emulsions at pH 6.5 before the gelation and after the gel reversibility experiment was determined by static light scattering using a Mastersizer 2000. Single CMP emulsions were unstable, and the addition of Tween 80, lecithin or NaCas improved the stability of CMP emulsions. CMP-Tween 80 emulsions showed the highest stability even after pH-reversibility test. These gelled emulsions have potential use as *carrier* of functional ingredients because besides using CMP which is a compound with bioactive properties is possible the use of bioactive oils and minerals that can be bound to CMP.

Keywords: caseinglycomacropeptide, gelled emulsions, delivery, bioactive compounds.

INTRODUCCIÓN

La incorporación de componentes bioactivos (tales como péptidos bioactivos, vitaminas, antioxidantes) en los alimentos representa un desafío para el desarrollo de alimentos funcionales innovadores, que puede proporcionar beneficios fisiológicos o reducir el riesgo de enfermedades. Sin embargo, es indispensable la protección de estos componentes bioactivosen condiciones adversas (es decir, luz, temperatura, humedad, oxígeno); esta protección puede lograrse mediante su incorporación a una matriz estable.

Las emulsiones presentan un amplio campo de estudio que incluye su aplicación en la liberación controlada de medicamentos, cosméticos y productos alimentarios, entre otros. Desde el punto de vista termodinámico, las emulsiones son sistemas inestables y su formación no ocurre de manera espontánea, requieren de la acción externa de una energía de mezclado. Lograr que una emulsión perdure con las características deseadas a través del tiempo, no es algo sencillo, depende entre otros factores de los surfactantes seleccionados y el

tamaño de gota de la misma. Algunas proteínas y polisacáridos pueden acumularse en la interfase aceite/agua (O/W, por sus siglas en inglés) debido a la presencia en su estructura de grupos polares y no polares (Hasenhuettl et al., 2008), por lo que pueden utilizarse como tensioactivos en emulsiones y espumas. Las emulsiones, luego de formadas, tienen un cierto grado de estabilidad que se determina en función de la rapidez con la que el sistema se transforma de nuevo en dos fases separadas. Uno de los factores relacionados con este fenómeno es el tamaño de gota. Se han estudiado sistemas con tamaño de gota igual a o menor a200 nm, nanoemulsiones, los cuales debido al pequeño tamaño presentan una menor susceptibilidad a la separación de fases por gravedad (Troncoso et al., 2012), lo que permite lograr sistemas con mucha estabilidad. En los últimos años, existe un interés creciente en la gelificación de emulsiones debido a que mejora la estabilidad a la oxidación de los lípidos y promueve una liberación controlada de compuestos de interés, resultando en un óptimo vehículo para compuestos activos (Ruffin et al., 2014). Además, estos sistemas otorgan la posibilidad de formular productos alimenticios con diferentes propiedades de textura (Dickinson, 2012). En un trabajo reciente, se estudiaron emulsiones gelificadas de proteínas de suero de leche que muestran un gran potencial para ser usado en formulaciones de alimentos como agente texturizante y/o como un portador de ingredientes termolábiles (Mantovani et al., 2016).

El caseinoglicomacropéptido (CMP) presenta diversas propiedades biológicas y nutricionales, entre las que se destacan sus efectos antitrombótico y antiinfeccioso (Brody, 2000; Yuleiys et al., 2002; Thomä-Worringer et al., 2006; Choi et al., 2012). Este péptido se forma en la primera etapa de coagulación enzimática de la leche durante la elaboración de quesos. En esta etapa la quimosina o renina ocasiona la ruptura del enlace Phe105-Met106, de la κ-caseína, provocando la desestabilización y desnaturalización de las micelas de caseína. De la ruptura de este enlace se originan dos polipéptidos: la para-κ-caseína (que comprende los residuos 1-105), y el CMP (106-169), que contiene todas las modificaciones post-traduccionales de la κ-caseína de partida (fosforilación, glicosilación, etc.). Su perfil de aminoácidos y su contenido en azúcares lo hacen fuertemente polar, por lo que es eliminado durante el desuerado con el suero de quesería.La carencia de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) del CMP permite su uso como ingrediente en las dietas para personas que padecen de fenilcetonuria (van Calcar y Ney, 2012). Asimismo, el CMP es rico en aminoácidos de cadenas laterales ramificadas (valina e isoleucina) y pobre en metionina, lo cual lo hace particularmente útil en el control de diversos trastornos del hígado en los que los aminoácidos de cadenas laterales ramificadas son utilizados como fuente de energía(El-Salam et al., 1996).

Este péptido tiene buenas propiedades funcionales, entre ellasinterfaciales.Debido a su estructura molecular es capaz de cubrir la interfase aún a bajas concentraciones (Thomä Worringer et al., 2007a; b) lo que significa que es un péptido con una alta actividad superficial; sin embargo, forma películas interfacialesdébiles (Martinez et al., 2009)que conduce a formar sistemas dispersos con baja estabilidad(Martinez et al., 2012a).Esta deficiencia podría ser resuelta con el uso de mezclas de emulsionantes,las cuales pueden conferir a la interfase y a la dispersión mejores propiedades que los mismos componentes solos debido a las interacciones sinérgicas entre moléculas. Por tal razón, el objetivo de este trabajo fue estudiar el uso potencial del CMP solo y en presencia de otros emulsionantes para diseñar emulsiones gelificadas como *carrier* de compuestos bioactivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El caseinoglicomacropeptido (CMP), BioPURE-GMP® fue provisto por DAVISCO Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota, USA). Su composición en base seca fue: proteína 79,0% siendo el CMP 86,3% del total de proteínas, grasas 0,6%, cenizas 6,3% y humedad 6,4%. El grado de glicosilación es alrededor del 50%. El valor de pH del CMP luego de su disolución en agua Milli-Q fue de 6,7. Se trabajó con diferentes emulsificantes como: gelatina bovina, Tween 80, lecitina, goma arábiga y caseinato de sodio (CasNa), todos ellos de origen comercial.El aceite que se utilizó como fase oleosa fue aceite de girasol comercial.Las emulsiones se prepararon utilizando CMP, Tween 80, gelatina, lecitina y goma arábiga a concentraciones entre 2 y 8% (**Tabla 1**), a pH 6,5.

Tabla 1: Composición de sistemas de estudio

Muestra	Emulsificante
CMP	CMP 8%
T_{c2}	CMP 8% + Tween 80 2%
T_{c4}	CMP 8% +Tween 80 4%
LEC	CMP 8% + Lecitina 2%
GEL	CMP 8% + Gelatina 0,5%
GA	CMP 8% + Goma arábiga 2%
$CasNa_{c2}$	CMP 8% + CasNa 2%
$CasNa_{c4}$	CMP 8% + CasNa 4%

Preparación de emulsiones

Las pre-emulsiones aceite/agua se prepararon mediante la mezcla de aceite de girasol comercial y soluciones del emulsionante en una proporción 10:90 durante 3 minutos a temperatura ambiente, usando un mezclador de alta velocidad, Ultraturrax T8 (IKA - WerkeGmbH& Co. KG, Staufen, Alemania) a 25000 RPM, con una unidad de dispersión S8 N-5G. A continuación, la pre-emulsión se sometió a ultrasonidos de alta intensidad utilizando un procesador de ultrasonidos Vibra Cell, modelo VCX 750 (Sonics&Materials, Inc., Newton, CT, EE.UU.) a una frecuencia de 20 kHz y una amplitud de 20% por 10 min. El tubo de vidrio con la muestra se introdujo en un baño de glicerina refrigerado a 0,5°C para disipar el calor producido durante la sonicación manteniendo la temperatura de la muestra por debajo de 25°C.

Posteriormente a la obtención de la emulsión, se disminuyó el pH del sistema a 2 y 3, con el fin de promover la gelificación de las mismasya que el CMP en solución es capaz de gelificar a temperatura ambiente por efecto de pH (Farías et al., 2010). Luego de 24 horas de preparadas las emulsiones gelificadas, las mismas se revirtieron mediante el aumento de pH con NaOH 0,1 N a pH 6,5.

Estudio del tamaño de gota

Para la determinación del tamaño de gota de las emulsiones originales a pH 6,5, de las obtenidas luego del ensayo de reversibilidad y para la evaluación de la estabilidad de las mismas en el tiempo se utilizó un equipo de dispersión de luz estática Mastersizer 2000 con un 2000MU Hydro como unidad de dispersión (Malvern Instruments Ltd, Reino Unido.) y una velocidad de bomba de 1800 rpm. Se utilizó el índice de refracción de la fase dispersa (1,47) y su parámetro de absorción (0,001).

Se obtuvieron las distribuciones de tamaño de gota por volumen y también los diámetros característicos:diámetro de volumen de superficie o diámetro de Sauter (D_{32}) (Ec. (1)) y diámetro de volumen medio equivalente o diámetro De Broucker (D_{43}) (Ec. (2)).

$$D_{32} = \sum n_i * d_i^3 / \sum n_i * d_i^2 \quad (1)$$

$$D_{43} = \sum n_i * d_i^4 / \sum n_i * d_i^2 \quad (2)$$

donde n_i es el número de gotitas de diámetro d_i. D_{32} proporciona una medida del diámetro medio mientras D_{43} está relacionada con cambios en el tamaño de partícula que implican procesos de desestabilización (Arzeni et al., 2012, Galazka et al., 1996, Gu et al., 2005 y Huang et al., 2001).Los resultados se presentan como la media y la desviación estándar de diez lecturas hechas en una muestra.

Análisis estadístico

Para la comparación de medias de los resultados obtenidos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) ($P < 0,05$), utilizando el programa estadístico Statgraphic Plus 5.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Distribución de tamaño de gota de emulsiones

El tamaño de gota en emulsiones alimentarias es un importante factor a determinar ya que define su estructura y por lo tanto, su comportamiento en el tiempo. En la **Figura 1** se observan las distribuciones de tamaño de gota de las emulsiones inicialmente a pH 6,5 y luego de 7 días de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C) con los respectivos valores de D_{32} y D_{43}. Se puede observar que las emulsiones de CMP presentaron inicialmente una distribución

bimodal con undiametro medio (D_{32}) de 0,340 µm. Luego de 7 días de almacenamiento se obtuvo un D_{32} de 0,413 µm y un aumento importante del D_{43} evidenciando la desestabilización del sistema. Este comportamiento se puede atribuir a que como se mencionó anteriormente el CMP debido a su estructura molecular es capaz de cubrir la interfaserápidamente, pero las películas interfaciales formadas son débiles lo que conduce a la rápida desestabilización del sistema(Martinez et al., 2012b).

Cuando se adicionó gelatina (GEL) y goma arábiga (GA) las emulsiones presentaron distribuciones bimodales que fueron incrementando mucho su tamaño durante el almacenamiento, evidenciando una desestabilización incluso mayor que con el CMP solo.

En cambio, cuando se adicionóTween 80 (Tw_2 y Tw_4), lecitina (LEC) y caseinato de sodio ($CasNa_2$ y $CasNa_4$) se observó una mejora en la estabilidad respecto al CMP solo. Estas presentaron distribuciones monomodales con valores de D_{32}<0,5 µm y se mantuvieron estables luego de 7 días. De estas 5 emulsiones, CMP-Tween 80 4% fue la que presentó un D_{32} más bajo, con valor de 0,209 µm que se mantuvo sin variación durante más de 20 días, haciendo de esta emulsión el sistema más estable estudiado.

Reversibilidad de emulsiones gelificadas por pH

El estudio de reversibilidad de las emulsiones gelificadas se realizó con el objetivo de evaluar si estos sistemas al ajustarlos a su condición inicial de pH eran capaces de mantener su estabilidad para ser utilizados en una matriz líquida. En la **Figura 2** se pueden observar los resultados de la reversibilidad de las emulsiones gelificadas obtenidos para el sistema CMP + Tween 80 4% por ser el que presentó el tamaño de gota más pequeño (209 nm) y estabilidad en el tiempo.

El diámetro de gota de dicha emulsión no cambió después de ajustarle el pH desde pH 2 y pH 3 hasta pH 6,5 lo que revirtió el estado gelificado, evidenciandouna gran estabilidad. Las demás emulsiones estudiadas presentaron un tamaño de gota mayor después del estudio de reversibilidad por pH. Esto puede explicarse por la carga de las moléculas de proteína; a medida que varía el pH se modifica la carga neta del CMP y de los emulsionantes proteicos. En condiciones ácidas, existen fuerzas electrostáticas de repulsión entre residuos de carga positiva de las cadenas del péptido, y los residuos de los emulsionantes proteicos, producidos por la protonaciónde grupos amino;esto provoca la desestabilización del sistema que se traduce en una reversibilidad poco efectiva ya que durante la gelificación de las mismas ya el sistema se desestabiliza. En cambio, para el Tween 80, el sistema no se vería afectado por la diminución del pH ya que, debido a su carácter no iónico, no habría repulsión electrostática con los residuos cargados del CMP.

La gelificación de las emulsiones presenta dos ventajasprincipales: estabilización adicional del sistema debido a su alta viscosidad, y la posible mejora en su uso como *carrier* de ciertas moléculas, ya que se ha reportado que los geles constituyen una excelente matriz para el transporte de minerales promoviendo su absorción (Remondetto et al., 2004).

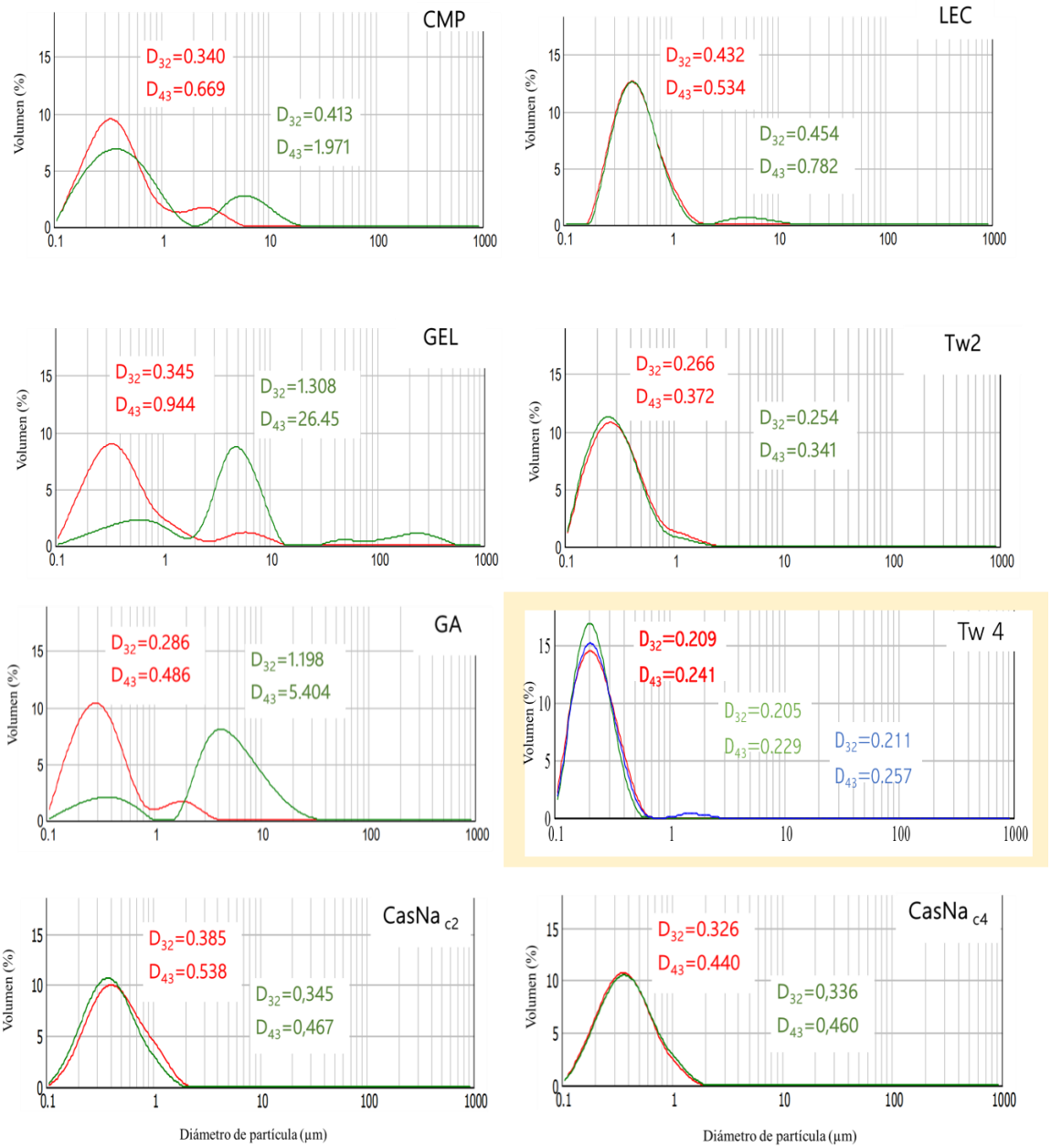


Figura 1. Distribución de tamaño de gota de emulsiones a pH 6,5 inicialmente (—), luego de 7 días de almacenamiento (—) y luego de 20 días de almacenamiento (—). Temperatura 25°C.

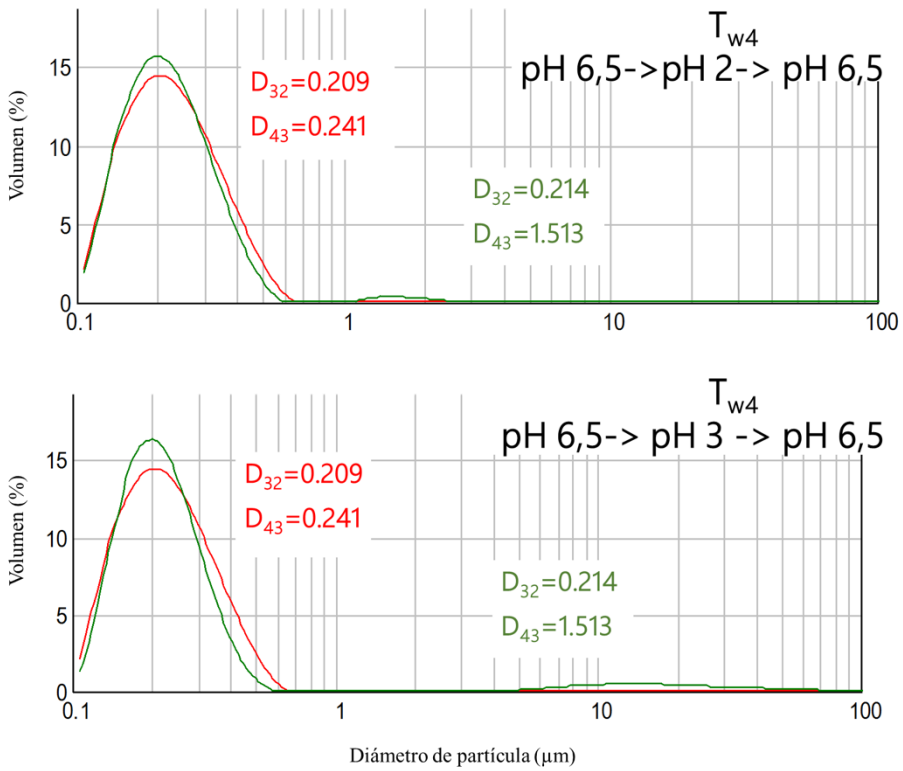


Figura 2. Distribución de tamaño de gota de emulsiones a pH 6,5 inicialmente (—) y luego de revertir las emulsiones gelificadas a pH 2 o 3 al valor inicial (6,5) (—). Temperatura 25°C.

CONCLUSIONES

La incorporación de Tween 80 en emulsiones de CMP no sólo incrementa su estabilidad, sino que da lugar a la formación de estructuras gelificadas estables para su almacenamiento, como también sistemas estables a la reversión por pH.

Además de utilizar CMP que *per se*es un compuesto bioactivo, esta emulsión gelificada sería útil para transportar aceites bioactivoso compuestos solubles en aceite. Estos sistemas tienen un uso potencial como *carrier*de ingredientes funcionales, una estrategia que se utiliza ampliamente en otros campos y que podría encontrar una amplia gama de aplicaciones en el desarrollo de alimentos funcionales innovadores.

BIBLIOGRAFÍA

Brody EP. 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide. Br. J. Nutr. 84:S39-S46.

van Calcar SC, Ney DM. 2012. Food Products Made with Glycomacropeptide, a Low-Phenylalanine Whey Protein, Provide a New Alternative to Amino Acid-Based Medical Foods for Nutrition Management of Phenylketonuria. J. Acad. Nutr. Diet.

Choi J, Sabikhi L, Hassan A, Anand S. 2012. Bioactive peptides in dairy products. Int. J. Dairy Technol. 65:1-12.

Dickinson E. 2012. Emulsion gels: The structuring of soft solids with protein-stabilized oil droplets. Food Hydrocoll. 28:224-241.

El-Salam MHA, El-Shibiny S, Buchheim W. 1996. Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. Int. Dairy J. 6:327-341.

Hasenhuettl GL, Hartel RW, Media SS. 2008. Food Emulsifiers and Their Applications. (Edition S, editor.). LLC, New York. .

Mantovani RA, Cavallieri Angelo Luiz Fazani, Cunha RL, Cavallieri ÂLF, Cunha RL. 2016. Gelation of oil-in-water emulsions stabilized by whey protein. J. Food Eng. 175:108-116.

Martinez MJ, Carrera Sánchez C, Rodríguez Patino JM, Pilosof AMR, Sánchez CC, Patino JMR, Pilosof AMR. 2009. Bulk and interfacial behaviour of caseinoglycomacropeptide (GMP). Colloids Surfaces B Biointerfaces 71:230-237.
Martinez MJ, Pizones Ruiz-Henestrosa VM, Carrera Sánchez C, Rodríguez Patino JM, Pilosof AMR. 2012a. Interfacial and foaming interactions between casein glycomacropeptide (CMP) and propylene glycol alginate. Colloids Surfaces B Biointerfaces 95:214-221.
Martinez MJ, Pizones Ruiz-Henestrosa VM, Carrera Sánchez C, Rodríguez Patino JM, Pilosof AMR. 2012b. Interfacial and foaming interactions between casein glycomacropeptide (CMP) and propylene glycol alginate. Colloids Surfaces B Biointerfaces 95:214-221.
Remondetto GE, Beyssac E, Subirade M. 2004. Iron availability from whey protein hydrogels: an in vitro study. J. Agric. Food Chem. 52:8137-43. A
Ruffin E, Schmit T, Lafitte G, Dollat JM, Chambin O. 2014. The impact of whey protein preheating on the properties of emulsion gel bead. Food Chem. 151:324-332.
Thomä-Worringer C, Sørensen J, López Fandiño R,. 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. Int. Dairy J. 16:1324-1333.
Thomä Worringer C, Siegert N, Kulozik U. 2007a. Foaming properties of caseinomacropeptide - 1. Impact of concentration and interactions with whey proteins. Milchwissenschaft 62:249-252.
Thomä Worringer C, Siegert N, Kulozik U. 2007b. Foaming properties of caseinomacropeptide - 2. Impact on pH and ionic strenght. Milchwissenschaft 62:253-255.
Troncoso E, Aguilera JM, McClements DJ. 2012. Fabrication, characterization and lipase digestibility of food grade nanoemulsions. Food Hydrocoll. 27:355-363.
Yuleiys O, Escobar A, Ponce P, Oliva Y, Escobar A, Ponce P. 2002. Caseinomacropéptido bovino: una alternativa para la salud. Rev. Salud Anim. 24:73-81.

AGRADECIMIENTOS
Trabajo realizado con fondos de la Universidad de Buenos Aires, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

Envases activos nanocompuestos para la conservación de un producto lácteo

Ortega F. (1), Arce V.B. (2), García M.A. (1)

(1) CIDCA, Facultad Ciencias Exactas UNLP – CONICET La Plata - CICPBA, 47 y 116 S/Nº, La Plata (B1900AJJ), Buenos Aires, Argentina.
(2) CIOP (CICPBA -CONICET-UNLP), La Plata, Argentina.
Dirección de e-mail: florortega.28@gmail.com

RESUMEN

Con el fin de desarrollar películas nanocompuestas con capacidad antimicrobiana, se acopló la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) a la preparación de suspensiones filmogénicas de almidón de maíz obteniéndose los correspondientes films mediante la técnica de casting. Las AgNPs fueron sintetizadas mediante un método químico "verde" y se caracterizaron por técnicas espectrofotométricas y microscopía electrónica, encontrando que son esféricas con un diámetro que varía entre los 5 y 20 nm. La adición de nanopartículas no afectó la capacidad filmogénica de la suspensión de almidón gelatinizado. El contenido de AgNPs causó un leve aumento en la opacidad manteniendo la capacidad de barrera al UV del material. Se observó que la permeabilidad al vapor de agua disminuyó con la concentración de AgNPs incluidas en la formulación. Además, las AgNPs permiten el refuerzo de la matriz, desarrollando un material más resistente y tenaz, con superficies lisas y homogéneas como se evidencia por SEM. Las películas nanocompuestas con concentraciones de AgNPs mayores a 25µM inhibieron el crecimiento de *E. coli ATCC* y *Salmonella spp.*, responsables de la mayoría de las enfermedades transmitidas por alimentos. Películas conteniendo 50 µM de AgNPs permitieron extender la vida útil de queso fresco durante 21 días.

Palabras Clave: Nanopartículas, Películas activas, Capacidad antimicrobiana.

ABSTRACT

In order to develop nanocomposite films with antimicrobial capacity, synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) was coupled to filmogenic corn starch suspensions preparation, obtaining the corresponding materials by casting technique. The AgNPs were synthesized by a chemical "green" method, were characterized by spectrophotometric techniques and electron microscopy, finding that they are spherical with diameters varying between 5 and 20nm. The addition of nanoparticles did not affect the filmogenic capacity of gelatinized starch suspension. The content of AgNPs caused a slight increase in film opacity, keeping the material UV-barrier capacity. A decrease in water vapor permeability with increasing AgNPs concentration was observed. Besides, AgNPs allows the matrix reinforcement, developing a more resistant and tough material, with smooth and homogeneous surfaces as evidenced by SEM. Nanocomposite films containing AgNPs concentrations greater than 25 µM inhibited the growth of *E. coli ATCC* and *Salmonella spp.*, which are responsible for most foodborne diseases. Films containing 50 µM AgNPs allowed to extend the shelf-life of fresh cheese samples for 21 days.

Keywords: Nanoparticles, Active films, Antimicrobial capacity.

INTRODUCCIÓN

Los envases alimentarios cumplen funciones muy importantes para la conservación de alimentos, previniéndolos de contaminaciones físicas, químicas y/o microbiológicas, así como también de su posible adulteración. La aplicación de la nanotecnología permite el desarrollo de nanobiocompuestos, que consisten en una matriz biopolimérica reforzada con algún material en la escala nanométrica (1-100nm), lo cual permite mejorar sus propiedades mecánicas, térmicas, ópticas y fisicoquímicas (Rhim et al. 2013, Kuorwel et al. 2015). En este contexto, desde hace unos años se han incorporado tanto a películas biodegradables como sintéticas, nanopartículas metálicas de oro, plata, cobre, o sus óxidos, entre otros. Sin embargo, las nanopartículas de plata son comúnmente utilizadas debido a su estabilidad óptica, catalítica, térmica y eléctrica, además de ofrecer actividad antimicrobiana frente a un amplio espectro de bacterias, virus y hongos (Zhang et al. 2008, Rhim et al. 2013).

La síntesis química es el procedimiento más utilizado para la obtención de AgNPs de forma y tamaño controlado, a partir de la reducción de una sal de plata usando un agente reductor químico en presencia de un estabilizante (Masala y Seshadri 2004). En la actualidad se observa un incremento en el desarrollo de síntesis verdes amigables con el medio ambiente y la salud, basadas en la utilización de solventes no tóxicos, y agentes reductores y estabilizantes de bajo impacto ambiental (Raveendran et al. 2003). Oluwafemi et al. (2013) reportaron una síntesis controlada utilizando maltosa como agente reductor en presencia de almidón como estabilizante, obteniendo nanopartículas de plata con diámetros $\leq$ 5nm. Otros autores han observado que AgNPs obtenidas por métodos de síntesis química verde han demostrado tener buena actividad antimicrobiana inclusive a concentraciones de orden mM (Cheng et al. 2015, Cheviron et al. 2014).

Los objetivos propuestos para este trabajo fueron acoplar la síntesis de AgNPs a las suspensiones filmogénicas, caracterizar tanto las nanopartículas como las películas nanocompuestas desarrolladas y finalmente evaluar su capacidad antimicrobiana y aplicación como envase activo para la conservación de un producto lácteo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de las películas nanocompuestas previamente se gelatinize una suspensión de almidón de maíz al 3%p/p a 78ºC durante 20min. El acoplamiento de la síntesis de AgNPs a la suspensión filmogénica se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por Oluwafemi et al. (2013) con algunas modificaciones. A las suspensiones gelatinizadas se le agregaron 10 ml de solución de $AgNO_3$ (5-50 µM) y luego 20 ml de maltosa 1.310^{-3} M como agente reductor. Para lograr la formación de las AgNPs los sistemas se mantuvieron en agitación a 78ºC durante 20 min. Transcurrido este tiempo, las suspensiones se enfriaron hasta 50ºC y se les agregó glicerol como plastificante (30%p/p en relación al almidón), (López et al. 2013). Las películas se obtuvieron por moldeo y deshidratación de las suspensiones filmogénicas a 50ºC (método de casting). Se prepararon además películas control sin el agregado de AgNPs.

Con el fin de corroborar la formación de AgNPs, se obtuvo el espectro UV-vis entre 200-800 nm utilizando un espectrómetro T90+UV/vis Spectrometer (PG Instruments, USA). Luego para la caracterización de su tamaño y forma se realizó una microscopía electrónica de transmisión (TEM) en un microscopio JEM 1200EX II, (Jeol, Japón), operando a 80kV, y equipado con una cámara Erlangshen ES1000W, Model 785 (Gatan Inc., Pleasanton, California, USA), completando la observación con imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) realizadas con un FE-SEM ZeissSupra™ 40 (Alemania) con cañón de electrones por emisión de campo, una columna GEMINI® de tercera generación y un detector In-Lens. El voltaje de aceleración utilizado fue de 3,00 kV.

En relación a la caracterización de las películas nanocompuestas se evaluó el color superficial con un colorímetro Minolta (CR 300, Japón), midiéndose los parámetros de luminosidad (L*), y cromaticidad a* y b*, los cuales se utilizaron para determinar la diferencia de color (ΔE) respecto al control. La opacidad y capacidad de barrera al UV se obtuvieron a partir de la integración de los espectros de absorbancia del espectro UV-vis obtenidos con un espectrofotómetro, T90+UV/vis Spectrometer (PG Instruments, USA) en la región de 400 a 700nm y 200 a 400nm respectivamente. La transparencia se calculó según lo propuesto por Zhang y Hang (2006). Se determinó la permeabilidad al vapor de agua (WVP) siguiendo el método ASTM E96 con algunas modificaciones (López et al. 2011). La solubilidad del material desarrollado en agua, a 25 y 100ºC, se obtuvo mediante un ensayo de diferencia de masas luego de que porciones regulares de las películas ($4cm^2$), estuvieran sumergidas durante 1h en el solvente. El correspondiente comportamiento mecánico de las películas se estudió mediante ensayos de tracción con un texturómetro TA.XT2i – Stable Micro Systems

(Inglaterra), utilizando mordazas de tensión A/TG sobre probetas de 0.6x7cm. Las curvas de fuerza (N) en función de la deformación (mm) fueron registradas por el software del equipo, Texture Expert Exceed y a partir de éstas se obtuvieron los parámetros de esfuerzo ténsil (TS, MPa), módulo elástico (ME, MPa) y elongación a la ruptura (E, %).

La correspondiente capacidad antimicrobiana se evaluó a través de un ensayo de difusión en agar sobre cepas de *S. aureus ATCC*, *Salmonella spp.*, *E.Coli ATCC* y *Penicillium spp.* siguiendo el protocolo de Pranoto et al. (2005). Placas con agar Mueller-Hinton (Merck) se inocularon con 100 µl del inóculo correspondiente para el caso de las bacterias (10^4 UFC/ml), mientras que para el *Penicillium spp.* (10^2 UFC/ml) se inocularon placas con agar YGC (Merck). Se cortaron discos de los films de 2 cm de diámetro, se colocaron directamente sobre las placas de Petri y finalmente se incubaron a 37ºC realizándose observaciones visuales durante 72 hs para el caso de las bacterias y 7 días para el hongo.

Para el ensayo de aplicación de las películas activas, se envasaron muestras de 10 g de queso fresco utilizando los films con una concentración de AgNPs 50 µM, los cuales se termosellaron. Siguiendo el procedimiento de López et al. (2013), las muestras fueron almacenadas a 4ºC en bolsas sintéticas de PD 141(CRYOVAC®). Recuentos de hongos y levaduras se hicieron al tiempo inicial, y luego de 7, 14, 21 y 28 días de almacenamiento a partir de la siembra de 100 µl de los homogenatos de las muestras de queso almacenadas, sobre placas con agar YGC las cuales se incubaron durante 5 días a 37ºC. Los recuentos de microorganismos viables se determinaron por conteo del número de colonias formadas, expresándose los resultados como UFC/g queso.

Se realizó el análisis multifactorial de varianzas y, regresiones lineales y no lineales con el software Systat® (Versión 13.0)**.** Las diferencias en las propiedades de las películas y las formulaciones se determinaron mediante el test de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD) usando un nivel de significación α=0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El espectro UV-vis confirmó la formación de AgNPs, ya que se evidenció por espectrofotometría la presencia del plasmón característico con máximo a 425nm. La amplitud de dicho plasmón se debe a la interacción de las nanopartículas con la matriz y a una posible aglomeración de las mismas. (**Figura 1a**). Mediante los estudios de TEM y SEM se observó que las nanopartículas presentan una morfología esférica con una distribución uniforme sobre la matriz, y en algunos casos se encuentran formando aglomerados. Mediante el software Image J se calculó el diámetro medio de las AgNPs sintetizadas, siendo el mismo de 21 ± 6.7nm. (**Figura 1b** y **c**)

En relación al color de las películas obtenidas, las diferencias de color (ΔE), la luminosidad (L*) y el parámetro de cromaticidad b fueron afectados por la presencia de AgNPs (**Figura 2**). Sin embargo, debido a la baja concentración de AgNPs utilizadas, visualmente las películas resultaron ser prácticamente incoloras. Con respecto a la capacidad de barrera al UV, todas las películas desarrolladas presentaron esta característica, sin embargo, se observó que a concentraciones mayores a 10 µM AgNPs su comportamiento era similar al de las películas control. El agregado de AgNPs y su concentración no afecto significativamente ($p>0,05$) la opacidad y transparencia de las películas desarrolladas, obteniéndose en general materiales con cierto grado de opacidad. El agregado de AgNPs disminuyó significativamente ($p<0.01$) la WVP de las películas, pero no se observaron efectos significativos a concentraciones mayores a 10 µM. Este comportamiento podría atribuirse a un aumento en la tortuosidad de la matriz de las películas desarrolladas. Observaciones al SEM (**Figura 3a**) de la superficie de las películas desarrolladas permitieron explicar los bajos valores obtenidos para dicho parámetro, ya que se evidenció la ausencia de grietas, poros o imperfecciones en la superficie. Asimismo, en las micrografías observadas no se detectó migración superficial del glicerol, lo cual refleja la compatibilidad de la matriz con el plastificante. Seguidamente, se confirmó la presencia de AgNPs en los films activos con la espectroscopía EDX. En la **Figura 3b** se puede ver que los principales elementos detectados fueron C y O, debido a la composición del almidón, y una fuerte señal del Au correspondiente a la metalización de la muestra; cerca de los 3keV se observa una señal característica debida a la resonancia de plasmones superficiales de las AgNPs (Bindhu y Umadevi 2013).

a)

b)

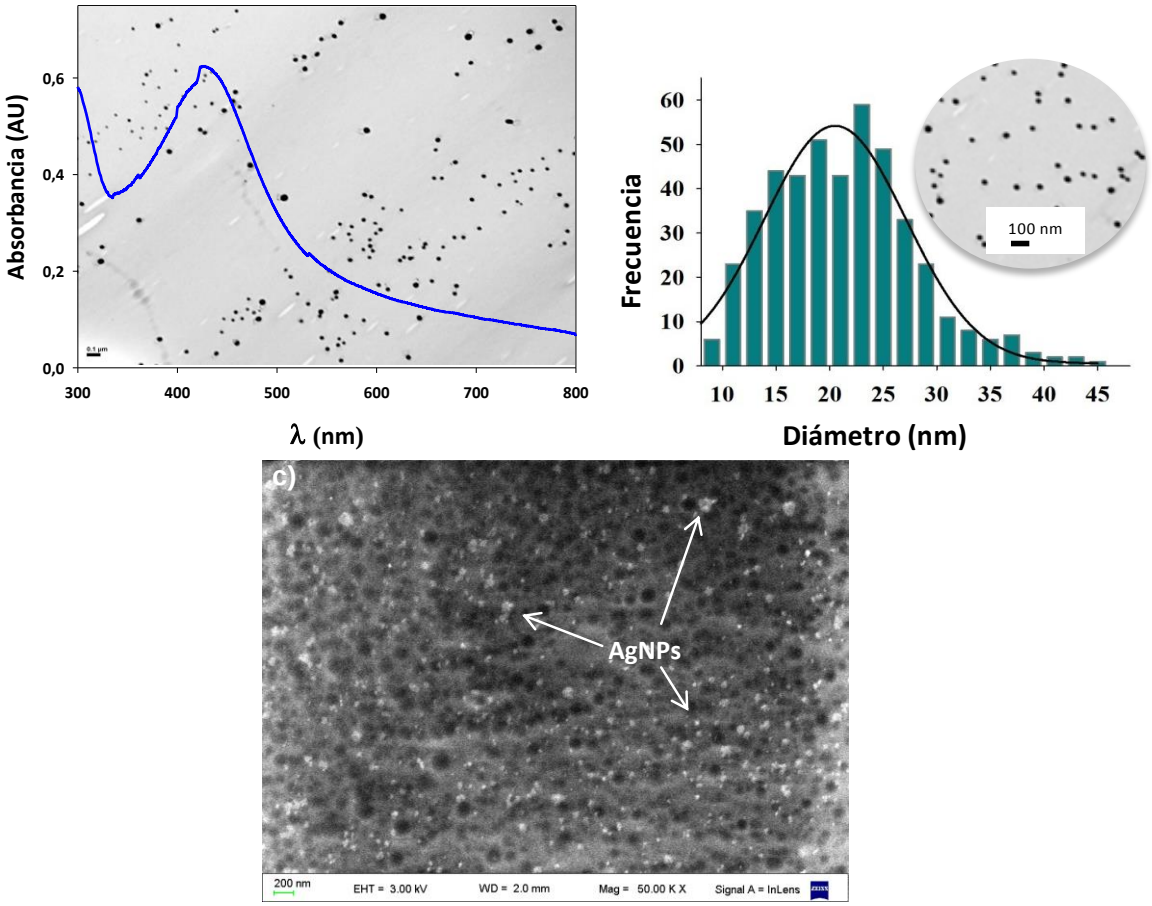


Figura 1. Nanopartículas de plata estabilizadas con almidón de maíz: a) observación del espectro UV-visible, b) correspondiente histograma, y c) micrografías de SEM de las correspondientes NPs (puntos blancos) distribuidas en la matriz polimérica.

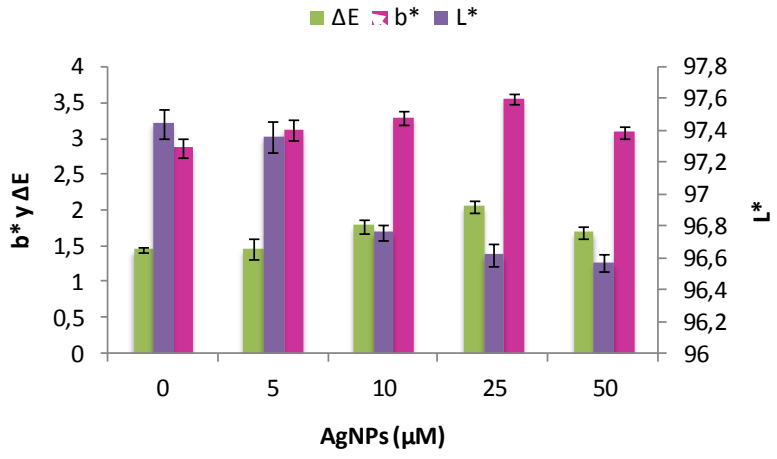


Figura 2. Parámetros de color superficial de las películas desarrolladas.

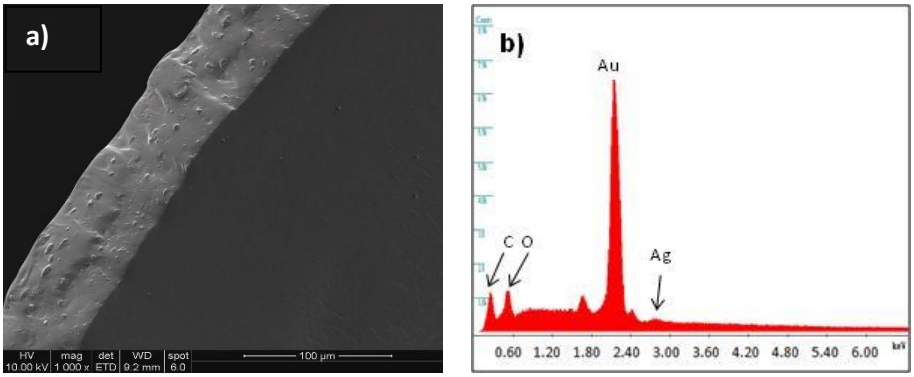


Figura 3. a) Micrografía electrónica de barrido de la sección transversal de la película de almidón de maíz con 50µM de AgNPs y b) espectro EDX.

Independientemente de la temperatura ensayada se observó que en general la solubilidad de las películas disminuye con el aumento del contenido de AgNPs, siendo este efecto significativo ($p<0,05$) a 25ºC y haciéndose muy significativo ($p<0,01$) a 100ºC. A temperatura ambiente (25ºC), los films nanocompuestos fueron 31% solubles, mientras que a 100ºC su solubilidad aumentó a 45%, debiéndose esta conducta a que las AgNPs permitirían el desarrollo de una estructura más resistente, indicando un posible efecto de refuerzo. Como se puede observar en la **Figura 4**, los resultados de solubilidad fueron consistentes con los obtenidos para WVP.

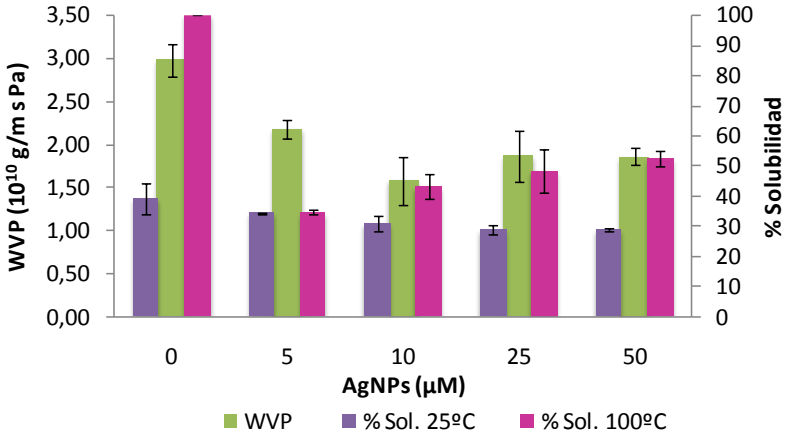


Figura 4. Parámetros de permeabilidad al vapor de agua y solubilidad de las películas nanocompuestas con respecto al control.

Las curvas de tensión-deformación (**Figura 5**) de las películas control mostraron que su comportamiento mecánico corresponde al de un material dúctil y flexible, mientras que las de las películas con 50 µM AgNPs se asocian a un material más fuerte, sugiriendo que las nanopartículas se comportan como un refuerzo inorgánico de la matriz polimérica. Las películas con concentraciones de AgNPs hasta 25 µM exhibieron significativamente ($p<0.01$) mayor resistencia a la tracción que las películas control, evidenciando el refuerzo de la matriz. Sin embargo, la elongación a la ruptura se mantuvo prácticamente constante (alrededor del 40%), lo que lleva a materiales resistentes y duros. Considerando al módulo elástico como un indicador de la rigidez del material cuanto mayor es su valor, se observó un efecto significativo ($p<0.05$) en dicho parámetro por el agregado de nanopartículas, lo cual permite sostener la idea del efecto de refuerzo de la matriz por las AgNPs.

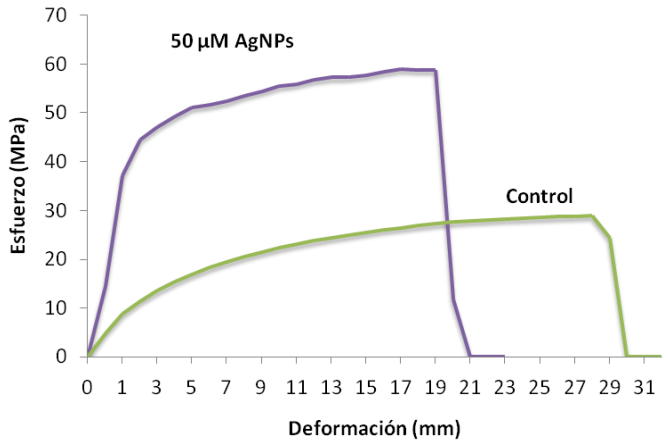


Figura 5. Perfil de esfuerzo-deformación de películas de almidón de maíz control y con el agregado de AgNPs en concentración 50µM.

Con respecto a la evaluación de la capacidad antimicrobiana de las películas activas, los resultados revelaron que la inhibición fue por contacto dado que no se observo un halo de inhibición, sugiriendo que no habría migración de las AgNPs desde la matriz (**Tabla 2**). La inhibición del crecimiento de *E. Coli ATCC* fue apreciable a partir de la concentración de AgNPs de 25 µM, en cambio para *Salmonella spp.* el efecto se hizo efectivo a partir de 10 µM. Para *S. aureus ATCC* solo se observó una marcada disminución del desarrollo en las placas de 50 µM AgNPs, respecto al resto de las concentraciones. Estos resultados se pueden asociar con la diferente estructura de la membrana celular y con el grosor de la capa de peptidoglicano de la misma, siendo las bacterias Gram negativas (*E. Coli ATCC, Salmonella spp.*) más sensibles que las Gram positivas (*S. aureus ATCC*). Para *Penicillium spp.*, se observó una reducción del crecimiento con las películas que contenían una concentración de AgNPs de 10 µM y una inhibición completa para concentraciones ≥ 25 µM.

Tabla 1. Inhibición del desarrollo de *E. Coli ATCC, Salmonella spp, S. aureus ATCC* y *Penicillium spp*. de películas nanocompuestas y control.

AgNPs en películas nanocompuestas (µM)	*E. Coli ATCC*	*Salmonella spp.*	*S. aureus ATCC*	*Penicilliumspp.*
0	-	-	-	-
5	-	-	-	-
10	-	+	-	< crecimiento
25	+	+	-	+
50	+	+	< crecimiento	+

En base a los resultados obtenidos seleccionamos las películas con concentración de AgNPs de 50µM, ya que además de su capacidad antimicrobiana, presentaron mayor integridad al ataque de microorganismos, así como también mejores propiedades de barrera y mecánicas. Por termosellado de los nanocompuestos se obtuvieron envases, los que permitieron almacenar muestras de queso fresco a 4ºC. La vida útil de las muestras de queso refrigeradas está determinada principalmente por la contaminación microbiana. El queso fresco se caracteriza por ser un producto poco fermentado, aunque ligeramente ácido (pH≈ 5), con actividad acuosa elevada, un bajo porcentaje de sal (< 3%) y con un potencial de óxido-reducción electronegativo (ausencia de oxígeno). Estas condiciones permiten el desarrollo de muchos microorganismos, especialmente de hongos y levaduras. Así, se definió la vida útil del queso fresco como el tiempo necesario para alcanzar 10^6 UFC/g de muestra (López et al. 2011). Teniendo en cuenta este valor, para la muestra control la vida útil fue de 14 días, mientras que para la muestra envasada con la película nanocompuesta la vida útil media fue de 21 días (**Figura 6**).

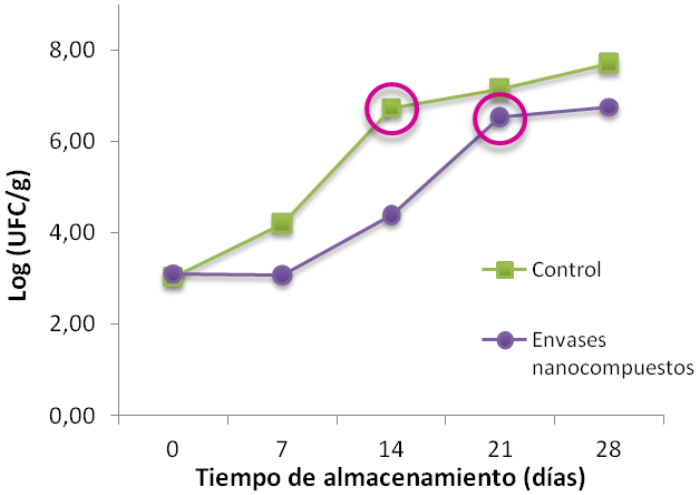


Figura 6. Efecto de los films nanocompuestos sobre la vida media de muestras de queso fresco almacenadas a 4ºC.

CONCLUSIONES

Fue posible acoplar la síntesis de AgNPs directamente a la obtención de la matriz polimérica de almidón, mediante una metodología simple y de fácil implementación.

La caracterización de las AgNPs mediante técnicas espectrofotométricas y de microscopía electrónica, permitió estimar que su tamaño medio es de 21 nm y que en ciertos casos las mismas se encuentran formando aglomerados.

Por otro lado, la incorporación de AgNPs no afecto la capacidad filmogénica de la suspensión de almidón gelatinizada, siendo las películas obtenidas homogéneas e incoloras, manteniendo en todos los casos su capacidad de barrera al UV. Con respecto a las propiedades de barrera, se observó una disminución en la WVP, al aumentar la concentración de nanopartículas, lo cual es satisfactorio ya que evitaría la condensación de humedad dentro de los envases obtenidos con este material y el posible desarrollo de microorganismos. Además, las AgNPs permitieron reforzar la matriz polimérica, dando un material más resistente y tenaz.

En relación a la capacidad antimicrobiana, las películas nanocompuestas mostraron tener un gran efecto sobre patógenos responsables de enfermedades transmitidas por alimentos, tanto Gram positivos como negativos, a concentraciones mayores a 25 µM. A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron las películas de concentración 50 µM de AgNPs para evaluar la vida útil de un producto lácteo. Estas películas activas fueron capaces de extender la vida útil de muestras de queso fresco durante 21 días.

BIBLIOGRAFÍA

BindhuMR, UmadeviM. 2013. Synthesis of monodispersed silver nanoparticles using Hibiscus cannabinus leaf extract and its antimicrobial activity, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 101: 184–190.

ChengF, BettsJW, KellySM, HectorAL. 2015. Green synthesis of highly concentrated aqueous colloidal solutions of large starch-stabilised silver nanoplatelets, Materials Science and Engineering C 46: 530–537.

Cheviron P, Gouanvé F, Espuche E. 2014. Green synthesis of colloid silver nanoparticles and resulting biodegradable starch/silver nanocomposites, Carbohydrate Polymers 108: 291–298.

KuorwelKK, CranMJ, OrbellJD, BuddhadasaS, BiggerSW.2015. Review of Mechanical Properties, Migration, and Potential Applications in Active Food Packaging Systems Containing Nanoclays and Nanosilver, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 14: 411–430.

López OV, Lecot CJ, Zaritzky NE, García MA. 2011. Biodegradable packages development from starch based heat sealable film, Journal of Food Engineering 105: 254–263.

LópezOV, GiannuzziL, ZaritzkyNE, GarcíaMA.2013. Potassium sorbate controlled release from corn starch films, Materials Science and Engineering C 33: 1583–1591.

Masala O and Seshadri R. 2004. Synthesis routes for large volumes of nanoparticles. Annu. Rev. Mater. Res. 34: 41–81.

Oluwafemi OS, Vuyelwa N, Scriba M, Songca SP.2013. Green controlled synthesis of monodispersed, stable and smaller sized starch-capped silver nanoparticles, Materials Letters 106: 332–336 .

PranotoY, RakshitSK, SalokheVM.2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. LWT-Food Science and Technology 38: 859–865.

RaveendranP, FuJ, WallenSL. 2003. Completely "Green" Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles, J. AM. CHEM. SOC. 125: 13940–13941.

RhimJW, ParkHM, HacCS. 2013. Bio-nanocomposites for food packaging applications, Progress in Polymer Science 38: 1629–1652

Zhang Y, Peng H, Huang W, Zhou Y, Yan D.2008. Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles, Journal of Colloid and Interface Science 325: 371–376.

ZhangY and HanJH.2006. Mechanical and thermal characteristics of pea starch films plasticized with monosaccharides and polyols, Journal of Food Science7: 1109–118.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con la ayuda de los proyectos: PICT 2012-1817, PICT 2011-1213 y PICT 2015-0921 (ANPCyT, Argentina) y PVT- Fac. Cs. Exactas UNLP. Florencia Ortega es becaria doctoral de CONICET, M. Alejandra García es investigadora de CONICET, Valeria B. Arce es investigadora de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC).

Aislamiento de bacterias lácticas autóctonas de interés industrial a partir de frutas y hortalizas frescas

Ortiz S. (1), Gallo A. (1), Raffellini S. (1)

(1) Dto. Tecnología, Universidad Nacional de Luján, Argentina. ortizs@mail.unlu.edu.ar

RESUMEN

Las bacterias lácticas pueden poseer propiedades de interés para elaboración de alimentos vegetales innovadores. Cepas productoras de exopolisacáridos podrían emplearse para modificar la reología de alimentos, y aquellas que producen sustancias antimicrobianas podrían utilizarse como bioprotectoras contra microorganismos indeseables, o incluso como probióticas si soportan bajos pH o altas concentraciones de sales biliares. El objetivo del trabajo fue aislar, a partir de vegetales, bacterias lácticas con propiedades de interés industrial: capacidad de inhibición de microorganismos, resistencia a sales biliares y bajos pH, y producción de exopolisacáridos. Las cepas se aislaron en MRS agar a partir de frutas y hortalizas frescas. Se evaluó capacidad inhibitoria contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis y *Escherichia coli*, utilizando método de estrías cruzadas. Se evaluó crecimiento en MRS a pH 2,5 y con sales biliares (1%), y producción de exopolisacáridos en MRS con sacarosa (5%). Se aislaron 86 cepas de bacterias lácticas. Las heterofermentativas fueron significativamente más inhibitorias (zona de inhibición promedio: 18,9±3,3 mm), que las homofermentativas (14,8±5,1 mm). La bacteria indicadora más inhibida fue *Listeria monocytogenes* (18,9±4,2 mm). Todas resistieron pH 2,5 y sales biliares, y 53 cepas produjeron exopolisacáridos. Por consiguiente, estas cepas autóctonas pueden ser potencialmente aplicadas en elaboración de alimentos vegetales innovadores.

Palabras clave: bacterias lácticas, vegetales, probióticas, exopolisacáridos.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) may possess properties of industrial interest to developing innovative vegetable foods. Exopolysaccharide producing strains could be used to modify food rheology; strains producing antimicrobial substances could be used as bioprotective cultures against undesirable microorganisms, or as probiotic cultures if they support low pH and high concentrations of bile salts. The objective of this work was to isolate LAB strains with properties of industrial interest (inhibition of undesirable microorganisms, resistance to bile salts and low pH, and exopolysaccharide production). Strains were isolated on MRS agar from fruits and vegetables. Inhibitory activity of each strain was evaluated against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella* Enteritidis using cross-streaking technique. Growth of each strain in MRS at pH 2.5 and with bile salt (1%), and exopolysaccharide production on MRS with sucrose (5%) were evaluated. 86 LAB strains were isolated. Heterofermentative LAB strains were significantly more inhibitory (mean length of inhibition zone: 18.9 ± 3.3 mm) than homofermentative strains (14.8 ± 5.1 mm). *Listeria monocytogenes* was the most inhibited indicator bacteria (18.9 ± 4.2 mm). All LAB strains resisted pH 2.5 and bile salts, and 53 strains produced exopolysaccharides. Therefore, these native strains can be applied in innovative vegetable foods.

Keywords: lactic acid bacteria, vegetables, probiotics, exopolysaccharides.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas son un grupo de bacterias Gram positivas, en forma de cocos o bastones, que no forman esporas, catalasa negativa y reconocidas como organismos GRAS por la FDA. Son utilizadas desde hace millones de años en la fermentación de alimentos, lo que permite extender la vida útil y mejorar las condiciones de preservación de los mismos, además de producir cambios deseables en el sabor y en la textura (Ross et al. 2002). Pueden emplearse solas o con otros grupos microbianos en la elaboración de alimentos fermentados de origen vegetal, como por ejemplo zanahorias, coliflor, pepinos, aceitunas, repollo, entre otros (Hansen 2002, Grosu-Tudorand Zamfir 2011). Algunas cepas de bacterias lácticas tienen la habilidad de producir exopolisacáridos (EPS) que modifican las características reológicas y la textura del alimento. Esta propiedad es importante a nivel industrial para la elaboración de productos alimenticios innovadores de matriz vegetal, ya que estas cepas aplicadas al alimento pueden actuar como productoras *in situ* de bioespesantes naturales (Grosu-Tudorand Zamfir 2011). En los últimos años la producción de EPS por bacterias lácticas ha recibido creciente atención, debido a los posibles efectos benéficos para la salud, en particular la actividad anticancerígena, antitumoral e inmunomoduladora (Behare et al. 2009, Patel et al. 2012, Madhuri and Prabhakar 2014). Estas bacterias tienen, además, la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y deteriorantes por su habilidad de generar metabolitos antimicrobianos (ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, entre otros), pudiendo ser utilizadas en consecuencia para aumentar la vida útil de los alimentos y garantizar su inocuidad (O´Sullivan et al. 2002, Rodgerset al. 2002,Trias et al. 2008). Aparte de su potencial como biopreservadores, se ha demostrado que ciertas cepas de bacterias lácticas pueden producir efectos benéficos para la salud de los consumidores, por lo tanto podrían ser aplicadas en alimentos como bacterias probióticas, si logran tolerar las barreras biológicas del tracto gastrointestinal, como por ejemplo bajos pH y sales biliares (Vinderola and Reinheimer 2003). Por otra parte, las cepas aisladas a partir de sustratos similares a aquellos en los cuales se prevé emplearlas suelen estar mejor adaptadas a los mismos para desarrollar plenamente las propiedades de interés (Vignolo et al. 1999). El objetivo del presente trabajo fue aislar, a partir de vegetales frescos, cepas de bacterias lácticas con propiedades de interés industrial (capacidad de inhibición de bacterias patógenas, resistencia a sales biliares y bajos pH, y producción de exopolisacáridos), para su futura aplicación en el desarrollo de alimentos innovadores de matriz vegetal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sustratos vegetales utilizados para los aislamientos

Se realizaron aislamientos de cepas de bacterias lácticas a partir de vegetales frescos (acelga, ciboulette, menta, hojas de cebolla de verdeo, puerro, rúcula, remolacha y lechuga) provistos en forma directa por establecimientos hortícolas localizados en el Partido de Luján, y a partir de frutas y hortalizas frescas o mínimamente procesadas, adquiridas en supermercados de la misma localidad (arándanos, brotes de soja, zanahoria y radicheta, en bandejas de 100-300 g). Los sustratos se mantuvieron en condiciones de refrigeración hasta el momento de ser procesados para efectuar los aislamientos.

Procesamiento de los vegetales para el aislamiento de bacterias lácticas

Para el aislamiento de bacterias lácticas a partir de cada uno de los sustratos, se preparó un homogenato en bolsas plásticas estériles (Whirl-Pack Nasco, USA) para lo cual se pesó 20 g del material vegetal correspondiente, se agregó 180 ml de agua peptonada (0,1%), y posteriormente se homogeneizó en digestor tipo Stomacher (Lab Cima, Argentina) durante 30 segundos a velocidad media. Además, una fracción de cada una de las muestras de vegetales provenientes de los establecimientos hortícolas se sometió a una pre-incubación bajo condiciones de anaerobiosis previo a su procesamiento para el aislamiento de bacterias lácticas. Para esto, 50 g de las hortalizas se envasaron al vacío en bolsas plásticas (Envasadora Multivac A3000 Germany), y se incubaron a 30ºC durante 48 h, al cabo de las cuales se procesaron de la misma manera que las muestras que no se sometieron a pre-incubación.

Aislamiento y conservación de las cepas aisladas

A partir de los homogenatos de cada muestra se realizaron placas de aislamiento en agar MRS (Biokar Diagnostic, Beauvais, Francia) mediante siembra en superficie por agotamiento. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 h en condiciones de anaerobiosis, al cabo de las cuales se aislaron con pipeta Pasteur las colonias que presentaron morfología típica de bacterias lácticas. Estas colonias se inocularon en caldo MRS que se incubó a 30°C durante 24 h y se re-estriaron dos veces en MRS agar para asegurar pureza.

Las cepas aisladas se conservaron a - 20°C en caldo MRS adicionado con 15% de glicerina. Antes de ser empleadas en los ensayos correspondientes, las cepas se inocularon en caldo MRS y se incubaron durante 24 h a 30°C.

Identificación taxonómica preliminar de las cepas aisladas

Para su identificación preliminar las cepas aisladas se sometieron a las siguientes pruebas: coloración de Gram, catalasa, fermentación de azúcares, diferenciación entre homofermentativas y heterofermentativas.

Determinación de propiedades de interés industrial de las cepas aisladas

a) Determinación de la actividad inhibitoria *in vitro* de las cepas aisladas

Cepas indicadoras empleadas en la determinación de la actividad inhibitoria

Como bacterias indicadoras para la determinación de la actividad inhibitoria de las cepas làcticas autóctonas aisladas, se utilizaron las siguientes cepas pertenecientes a la colección de cultivos del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Nacional de Luján:

- *Escherichia coli* ATCC 35218.
- *Salmonella* Enteritidis MA 44 y *Listeria monocytogenes* MA134, aisladas a partir de alimentos.

Antes de ser empleadas en los ensayos de inhibición, estas cepas se desarrollaron en caldo y agar triptona soja (TSB y TSA, Biokar, Francia) durante 24 h a 37°C.

Determinación de la capacidad inhibitoria de las cepas de bacterias lácticas aisladas sobre bacterias indicadoras

Para determinar la capacidad inhibitoria de las cepas de bacterias lácticasse utilizó la técnica de estrías cruzadas(Dubois et al. 1979). Las cepas lácticas se sembraron en un arco de las placas de Petri sobre agar MRS y se incubaron 24 h a 30°C. Posteriormente, cada una de las cepas indicadoras se sembraron en forma de estría perpendicular al cultivo desarrollado de la cepa láctica y las placas se incubaron a 37°C. Las longitudes de las zonas de inhibición se midieron con calibre (en mm) cada 24 h durante 120 h. Los ensayos se realizaron por triplicado.

b) Resistencia a sales biliares y pH ácidos

La resistencia a la bilis se determinó mediante el método modificado propuesto por Kociubinski et al. (1999). A partir de cultivos O.N., las cepas de bacterias lácticas se sembraron con ansa calibrada en placas de agar MRS adicionado con diferentes concentraciones finales en el medio (0,3%, 0,5% y 1%) de sales biliares (Britania, Argentina) y se incubaron a 30ºC durante 24 h. Para control, las cepas se sembraron también en medio MRS sin adición de sales biliares. Finalizada la incubación se comparó cualitativamente el desarrollo de las cepas en medios con y sin sales biliares adicionadas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Para medir la resistencia a pH ácidos se sembró cada cepa en caldo MRS a pH: 2,5 y 6,5 (el pH fue ajustado con HCl, antes su esterilización). Las cepas se incubaron a 30ºC durante 24 h al cabo de las cuales se determinó en forma cualitativa la turbidez producida (Thakkar et al. 2015). Los ensayos se realizaron por triplicado.

c) Producción de exopolisacáridos (EPS)

La producción de EPS se determinó sembrando cada cepa, con ansa calibrada, en MRS agar suplementado con 5% de sacarosa (Grosu-Tudorand Zamfir 2011). Las placas se incubaron a 30ºC durante 24-48 h al cabo de las cuales se observó el desarrollo de colonias mucosas. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Para la comparación de la capacidad de inhibición de las cepas aisladas se realizaron análisis de varianza y de comparaciones múltiples (test de mínimas diferencias significativas de Fisher), empleados para establecer diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,05$). Estos análisis se hicieron utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS PLUS (StatPoint Inc., USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento de cepas

Se aislaron 176 cepas a partir de los diferentes sustratos. Para el aislamiento se seleccionaron las colonias crecidas en agar MRS que presentaron características macroscópicas similares a las de las bacterias lácticas (colonias pequeñas, blanquecinas y de bordes lisos), según se observa en Figura 1.

Figura 1: Placas de aislamiento por agotamiento de bacterias lácticas en MRS agar

Identificación taxonómica preliminar de las cepas aisladas

De 176 cepas aisladas, 86 se corresponden con las características típicas de las bacterias lácticas: cocos o bastones Gram positivos, catalasa negativos, fermentadores de glucosa tanto en anaerobiosis como aerobiosis. En la **Tabla 1**, se presentan las cepas aisladas a partir de los diferentes sustratos empleados.

El 76% de las cepas aisladas fermentó la glucosa por la vía heterofermentativa (con producción de ácido y CO_2). Según la caracterización realizada el mayor porcentaje de cepas aisladas puede clasificarse preliminarmente como pertenecientes al género *Leuconostoc* (66%), por ser cocos heterofermentativos y al género *Lactobacillus* (19%) por ser bastones homo o heterofermentativos. Además, se observó que la pre-incubación de los vegetales bajo condiciones de vacío, favoreció el aislamiento de cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* (53% de las cepas aisladas bajo esas condiciones) con respecto al aislamiento sin pre-incubación (11% de las cepas aisladas).

Tabla 1: Caracterización taxonómica preliminar de cepas lácticas aisladas a partir de diferentes sustratos

Producto	**Nº de cepas aisladas**	**Morfología celular**	**Producción de CO_2 a partir de glucosa**	
			Homofermentativas	Heterofermentativas
Arándano	10	Bastones (4)	0	4
		Cocos (6)	0	6
Brotes de soja	25	Bastones (2)	1	1
		Cocos (23)	2	21
Zanahoria	14	Bastones (1)	1	0
		Cocos (13)	3	10
Radicheta	22	Bastones (1)	0	1
		Cocos (21)	5	16
Rúcula	2*	Bastones (2)	2	0
Remolacha	2*	Bastones (2)	2	0
Acelga	4*	Bastones (2)	1	1
		Cocos (2)	1	1
Puerro	2*	Cocos (2)	0	2
Cebolla de	1*	Cocos (1)	1	0
Ciboulette	1*	Bastones (1)	0	1

Menta	1*	Cocos (1)	1	0
Lechuga	2*	Bastones (1)	1	0
		Cocos (1)	0	1

*Aislamientos realizados a partir de sustratos vegetales pre-incubados al vacío

Determinación de propiedades de interés industrial de las cepas aisladas

a) Determinación de la actividad inhibitoria *in vitro* de las cepas aisladas

Todas las cepas aisladas mostraron capacidad inhibitoria contra las bacterias indicadoras ensayadas, sin embargo hubo variación en el grado de inhibición. Todas las cepas lácticas aisladas mantuvieron la inhibición estable durante las 120 h ensayadas.

Considerando el promedio de las longitudes de las zonas de inhibición producidas por cepas lácticas autóctonas, se observó que la especie más inhibida fue *Listeria monocytogenes* (18,9±4,2 mm) seguida por *Salmonella* Enteritidis (18 ± 3,9 mm), y *Escherichia coli* (16,5 ± 3,9 mm).

Las cepas heterofermentativas fueron significativamente más inhibitorias (promedio de zonas de inhibición: 18,9±3,3 mm), que las cepas homofermentativas (promedio de zonas de inhibición: 14,8±5,1 mm), como puede observarse en la **Figura 2**.

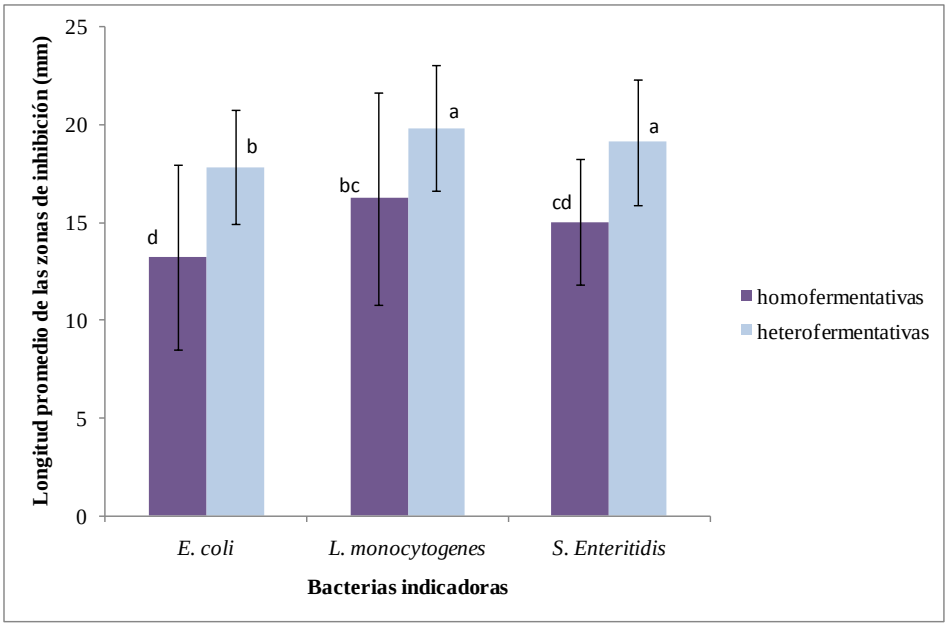


Figura 2. Inhibición producida por cepas lácticas homofermentativas y heterofermentativas sobre bacterias indicadoras. Promedio con letras diferentes indican diferencias significativas.

b) Resistencia a sales biliares y pH ácidos

Las sales biliares y la acidez gástrica son algunas de las barreras que deben superar los microorganismos en el tracto gastrointestinal para ser empleados como probióticos adicionados a los alimentos (Havenaar and Huis in´t Veld 1992). De ahí el interés por determinar si las cepas aisladas desarrollaban en MRS agarizado adicionado con 0,3%, 0,5% y 1% de sales biliares y en caldo MRS a pH 2,5.Las 86 cepas de bacterias lácticas aisladas desarrollaron en MRS agarizado adicionado con 0,3%, 0,5% y 1% de sales biliares incubadas a 30ºC durante 24 h.En todas las cepas aisladas se visualizó desarrollo cuando se incubaron en caldo MRS a pH 2,5 durante 24 h a 30ºC, sin embargo, la turbidez más notable se observó en cepas pertenecientes al género *Leuconostoc* y *Lactobacillus.*

c) Producción de exopolisacáridos

En 53 cepas de bacterias lácticas se observó la producción de colonias grandes mucosas cuando se sembraron en superficie en MRS agar con 5% de sacarosa. Se destaca que el 72% de las cepas aisladas que producen EPS provienen de sustratos adquiridos en supermercados, en cambio solo el 13% de las cepas lácticas aisladas de sustratos provistos

directamente por establecimientos hortícolas produjeron EPS, como puede observarse en **Tabla 2**.

Tabla 2: Producción de exopolisacáridos en MRS agar con 5% de sacarosa

Fuente de obtención de sustratos	**Nº de cepas aisladas**	**Nº de cepas productoras de EPS**		
		Morfología	Fermentación de glucosa	
			Homofermentativas	Heterofermentativas
Sustratos vegetales adquiridos en supermercados	71	Bastones	0	5
		Cocos	3	43
Sustratos vegetales provistos directamente por establecimientos hortícolas	15	Bastones	0	1
		Cocos	0	1

CONCLUSIONES

A partir de frutas y hortalizas frescas o mínimamente procesadas pueden aislarse cepas de bacterias lácticas con diferentes propiedades funcionales. El tratamiento previo al cual son sometidos los vegetales incide en la naturaleza de la microbiota que los coloniza. Se obtuvieron cepas con capacidad inhibitoria, productoras de exopolisacáridos, resistentes a bajos pH y a las sales biliares: deberá proseguirse con las investigaciones para determinar la factibilidad de aplicar las cepas autóctonas aisladas en la elaboración de alimentos de matriz vegetal, ya sea como bioprotectoras, como probióticas o como productoras de bioespesantes naturales.

BIBLIOGRAFÍA

Behare PV, Singh R, Kumar M, Prajapati JB, Singh RP. 2009. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: A review. Journal Food Science Technology, 46: 1–11.

Dubois G, Beaumier H and Charbonneau R. 1979. Inhibition of bacteria isolated from ground meat by *Streptococcaceae* and *Lactobacillaceae*. Journal of Food Science, 44: 1649-1652.

Grosur-Tudor, SS. and Zamfir M. 2011. Isolation and characterization of lactic bacteria fromromanian fermented vegetables. Romanian Biotechnological Letters, 16:148-154.

Hansen EB. 2002. Comercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. International Journal of Food Microbiology, 78: 119-131.

Havenaar R, and Huis in´t Veld JHJ. 1992. Probiotics: A general view. In: The lactic acid bacteria in health & Disease. BJB Wood (Ed.) Elsevier Aplplied Science, London. pag 151-170.

Kociubinski G, Pérez P, De Antoni G. 1999. Screening of bile resistance and bile precipitation in lactic acid bacteria and bifidobacteria. Journal Food Protection, 62:905-912.

Madhuri KV and Prabhakar KV. 2014. Microbial exopolysaccharides: biosynthesis and potential applications. Oriental Journal of Chemistry, 30: 1401-1410.

O´Sullivan L, Ross R, Hill C. 2002. Potencial of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie, 84: 593-604.

Patel S, Majumder A, Goyal A. 2012. Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. Indian Journal Microbiology, 52:3–12.

Rodgers S, Kailasapathy K, Cox J, Peiris, P. 2002. Bacteriocin production by protective cultures. Food Service Technology, 2: 59-68.

Ross RP, Morgan S, Hill C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. Food Microbiology, 79: 3-16.

Thakkar P, Modi HA. and Prajapati JB. 2015. Isolation, characterization and safety assessment of lactic acid bacterial isolates from fermented food products. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 4: 713-725.

Trias R, Badosa E, Montesinos E, Bañeras L. 2008. Bioprotective Leuconostoc strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruit and vegetables. International Journal of Food Microbiology, 27: 91-98.

Vignolo GM, Ruiz Holgado AAP, Oliver G. 1999. Potencial de bacterias lácticasy sus metabolitos en la preservación de alimentos. Tecnología Láctea Latinoamericana, 15: 36-45.

Vinderola CG and Reinheimer JA. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Research International, 36: 895-904.

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen el subsidio otorgado por el Departamento de Tecnología de la Universidad Nacional de Luján para la realización de este trabajo, y a la Dra. María Cristina Mans por su asesoramiento técnico.

Influencia del secado spray en el desempeño de fermentos adjuntos de lactobacilos mesófilos

Peralta GH (1), Audero G (2), Páez R (2), Perotti MC (1,3), Bergamini CV (1,3), Hynes ER (1,3)

(1) Instituto de Lactología Industrial, UNL/CONICET. Santiago del Estero 2829. 3000 Santa Fe, Argentina.
(2) INTA EEA Rafaela, Ruta 34 km 227, Santa Fe, Argentina
(3) Facultad de Ingeniería Química, UNL. Santiago del Estero 2829. 3000 Santa Fe, Argentina.
Dirección de e-mail: cvberg@fiq.unl.edu.ar

RESUMEN

La comercialización de cultivos lácticos autóctonos, que han demostrado ser adecuados para su uso como fermentos adjuntos en quesería, requiere de adecuados procesos de conservación (liofilización, congelado, secado spray) que no sólo mantengan la viabilidad, sino que también preserven la capacidad metabólica de los cultivos. En este trabajo, se evaluó la influencia del secado spray en el desempeño como fermentos adjuntos de dos cepas de lactobacilos mesófilos de origen NSLAB: *Lactobacillus paracasei* 90 y *Lactobacillus plantarum* 91. Se evaluó la sobrevivida de los cultivos al proceso de secado y al almacenamiento del polvo. La performance de los cultivos como fermentos adjuntos se evaluó en dos modelos de queso: 1) extracto de queso y 2) queso cremoso miniatura, en los que se determinó el impacto en el metabolismo de azúcares y producción de ácidos orgánicos y compuestos volátiles. Ambas cepas mantuvieron una elevada viabilidad en el polvo después del secado y durante el almacenamiento (4ºC/12 meses), como así también en ambos modelos de queso. Los perfiles de fermentación de azúcares y producción de compuestos volátiles para los cultivos deshidratados de ambas cepas fueron similares que los observados para los cultivos frescos. Además, la capacidad de *Lb. paracasei* 90 para aumentar la producción de acetoína y diacetilo en modelos de queso fue confirmada para el cultivo secado spray.

Palabras clave: cultivos adjuntos, lactobacilos, secado spray, queso.

ABSTRACT

The commercialization of authochtonous lactic cultures, which have demonstrated to be useful for their use as adjunct cultures for cheeses, require suitable conservation processes (freezing-drying, freezing, spray-drying). These processes not only should maintain the viability, but also preserve the metabolic capacity of cultures. In this work, we assessed the influence of spray-drying on the performance as adjunct cultures of two authochtonous strains of mesophilic lactobacilli: *Lactobacillus paracasei* 90 and *Lactobacillus plantarum* 91. Dried cultures were monitored during storage for survival rate, and they were applied on two cheese models: sterile cheese extract and miniature soft-cheese. The influence of the culture on metabolism of carbohydrate and production of organic acids and volatile compounds was quantified. Both strains remained at high levels in the powder after drying and during storage (4ºC/12 months). They maintained high levels in both cheese models during incubation or ripening. Similar profiles of carbohydrate fermentation and bioformation of volatile compounds were observed in the cheese extracts for each tested strain, both as fresh and dried cultures. In addition, the ability of *Lb. paracasei* 90 to markedly increase the production of acetoin and diacetyl in cheese models was confirmed for the spray-dried culture.

Keywords: adjunct cultures, lactobacilli, spray-drying, cheeses.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas de origen adventicio no pertenecientes al fermento, denominadas NSLAB por sus siglas en inglés (non starter acid bacteria), son una parte importante de la microbiota del queso, ya que pueden crecer desde niveles iniciales muy bajos hasta valores muy elevados en las primeras semanas de maduración, y mantenerse en dichos niveles durante varios meses (Gobbetti et al. 2015). La adición a la leche de quesería de cultivos formulados a partir de cepas de origen NSLAB, frecuentemente lactobacilos mesófilos aislados de quesos de buena calidad, ha sido propuesta como una estrategia para producir cambios deseables en los quesos, tales como controlar la flora adventicia y mejorar el aroma y textura del queso (Johnston et al. 2015). De

hecho, existen varios trabajos publicados acerca de la evaluación de este tipo de cepas como fermentos adjuntos en queso (Settanni et al. 2011, Randazzo et al. 2012, Ciocia et al. 2013). Sin embargo, la comercialización de cepas NSLAB requiere de la aplicación de procesos de conservación para obtener las mismas en un formato adecuado que proporcione estabilidad, alta concentración de células y sobre todo, que preserve la viabilidad y actividad metabólica del fermento (Parente y Cogan 2004).

Los procesos de conservación usualmente aplicados a fermentos lácticos para su uso en la industria láctea son la liofilización, congelado y secado spray. En particular, los fermentos liofilizados pueden ser conservados a temperatura ambiente, aunque a 4ºC o -20ºC se prolonga la vida útil del mismo debido a una mejor conservación de la viabilidad y actividad metabólica (Parente y Cogan 2004). El congelado a muy bajas temperaturas es uno de los mejores métodos para preservar la viabilidad y actividad metabólica; sin embargo, el manejo de los mismos es poco práctico para la industria. En los últimos años, se ha incrementado el interés en la aplicación del secado spray como método de conservación de bacterias, ya que muestra ventajas económicas debido a sus altas tasas de producción y bajos costos de operación (Santivarangkna et al. 2007). La supervivencia de las bacterias al proceso de secado spray depende de muchos factores tales como la cepa, la fase y condición de crecimiento y los parámetros del proceso de secado, como la temperatura de entrada y de salida, velocidad del flujo de aire, velocidad de alimentación del producto y el tamaño de las gotas atomizadas (Santivarangkna et al. 2007). Los primeros intentos de utilizar el secado spray en bacterias presentaron algunos inconvenientes tales como baja supervivencia luego de la aplicación del secado o disminución de la viabilidad durante el almacenamiento, retraso en la producción de ácido láctico, y dificultad en la rehidratación del polvo (Johnson y Etzel, 1995, Teixeira et al. 1995, To y Etzel, 1997). Sin embargo, la tecnología actual ha mejorado y permite un mejor control de las condiciones del proceso. De hecho, excelentes tasas de conservación han sido reportadas para algunas cepas de bacterias lácticas, aunque también hay reportes de resultados no totalmente satisfactorios (Silva et al. 2011, Páez et al. 2013, Lavari et al. 2014). La mayoría de los antecedentes en esta temática son en fermentos primarios y cepas probióticas, mientras que muy pocos trabajos se han reportado sobre la producción de fermentos deshidratados a partir de cepas de origen NSLAB y sobre el estudio de la influencia del proceso de secado en el desempeño de dichos cultivos como adjuntos en quesería (To y Etzel 1997, Gobbetti et al. 2015).

El objetivo de este trabajo fue obtener fermentos adjuntos deshidratados por secado spray de dos cepas autóctonas de origen NSLAB *Lb. paracasei* 90 y *Lb. plantarum* 91, y evaluar la capacidad de los mismos de producir cambios bioquímicos relacionados con el flavor en dos modelos de queso. El desempeño de los cultivos deshidratados se comparó con los cultivos frescos, y se evaluó la dosis más adecuada del fermento deshidratado de *Lb. paracasei* 90 para utilizar como adjunto en quesos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas y condiciones de crecimiento

Lactobacillus paracasei 90 (Lb90) y *Lb. plantarum* 91 (Lb91) pertenecen al cepario del Instituto de Lactología Industrial (INLAIN). En trabajos previos realizados en nuestro Instituto, se han determinado características tecnológicas y bioquímicas de estas cepas; además, cultivos frescos de las mismas han sido ensayados como fermentos adjuntos en quesos y modelos de queso, observándose un desempeño adecuado de los mismos (Milesi et al. 2008, Milesi et al. 2010, Peralta et al. 2014, 2016a, 2016b).

Secado spray

Cada una de las cepas en estudiose inoculó al 2% en caldo MRS (Biokar Diagnostics), y se incubó a 37°C durante 18h. Las células se recuperaron a partir de estos cultivos mediante centrifugación (6000 g 5ºC 15 min); el pellet celular se lavó dos veces con buffer fosfato de potasio pH 7 y luego se resuspendió en leche al 20% (p/v). Estas suspensiones celulares se secaron por atomización en un secador spray de laboratorio (Büchi B-290, Suiza) que contiene una tobera integrada para dos fases. Las temperaturas del aire de entrada y de salida fueron 140°C y 82°C, respectivamente. El caudal de alimentación fue de 600 L/h. Los polvos obtenidos se envasaron al vacío. La humedad de los polvos fue determinada por secado a una temperatura de 101±1°C hasta peso constante (FIL-IDF 26A: 1993). Los recuentos de lactobacilos en las suspensiones, antes e inmediatamente después del secado y después de 8 y 12 meses de almacenamiento de los polvos a 4ºC, se realizaron en MRS-ágar (48h de incubación a 37°C).

Modelos de quesos

El desempeño de los fermentos deshidratados en los cambios bioquímicos relacionados con la producción de compuestos de aroma se evaluó en dos modelos

de queso. En primer lugar, ambas cepas (Lb90 y Lb91) fueron ensayadas en un extracto estéril de queso Cremoso (Peralta et al. 2016b), mientras que. en segundo lugar, únicamente la cepa Lb90 se evaluó en quesos Cremosos miniatura (Milesi et al. 2010).

Extracto de queso estéril

El primer modelo en el que se estudiaron los fermentos consistió de un extracto estéril de queso, que fue preparado de acuerdo a Peralta et al. (2016b), utilizando en su preparación quesos Cremoso elaborados en la planta piloto del Instituto de acuerdo a Milesi et al. (2009). Para la preparación de los extractos, se disgregaron y homogeneizaron con agua destilada (1:1) los quesos a los 20 días de maduración (5ºC), y la suspensión resultante se centrifugó (17000g/15 min/10ºC). La fracción soluble se estandarizó en su contenido de cloruro de sodio al 1,5% (p/v), se filtró a través de membranas de PVDF de 0,45µm (Millipore, Sao Paulo, Brasil) y por último se calentó 30 min - 70ºC. El valor de pH inicial de los extractos fue 5,20. Los extractos experimentales se inocularon individualmente con cada cepa con el fin de alcanzar una concentración inicial de 10^6 UFC/mL, y luego se incubaron a 37ºC durante 48h. Los cultivos se adicionaron en tres formas diferentes: cultivo fresco (**F**), cultivo deshidratado (**D**) y cultivo deshidratado con una reactivación previa (**R**). Una alícuota de un cultivo overnight en MRS (después de dos repiques *overnight* sucesivos) se inoculó en los extractos F. Para los extractos D, se añadió una cantidad del polvo directamente. Por último, para los extractos R, el polvo secado por spray (0,5 g) fue reactivado por dos repiques *overnight* sucesivos en MRS y luego una alícuota fue adicionada a estos extractos. Un extracto control **C**, sin inocular, fue incubado en las mismas condiciones que los extractos experimentales. Los extractos fueron analizados en cuanto a recuentos de lactobacilos, pH, contenido de azúcares y ácidos orgánicos y perfil de compuestos volátiles. Todos los extractos se realizaron por duplicado usando cultivos independientes de cada cepa.

Queso Cremoso miniatura

La cepa Lb90, que demostró el mejor desempeño en relación a la producción de compuestos de aroma en el extracto de queso, se utilizó como cultivo adjunto en el modelo de queso miniatura. En esta experiencia, sólo estudiamos la influencia de la adición del fermento deshidratado directamente. Se elaboraron cuatro tipos de quesos: un queso control (**C**), usando *St. thermophilus* como fermento primario, y tres quesos experimentales (**E**) con la adición del mismo fermento primario, además de la incorporación del fermento adjunto Lb90. El fermento adjunto deshidratado se añadió en tres niveles de modo de alcanzar $5x10^3$, $1x10^5$ y $5x10^6$ UFC/mL en la leche para quesería; estos quesos fueron nombrados **E1**, **E2** y **E3**, respectivamente. Los quesos fueron elaborados en tinas de 5L según el procedimiento descripto en Milesi et al. (2010).Los quesos fueron envasados al vacío y madurados durante 30 días a 5°C. Se realizaron análisis de composición global, recuentos microbiológicos, pH, contenido de azúcares y ácidos orgánicos, y perfil de compuestos volátiles.

Análisis químicos y microbiológicos en los modelos de queso

En los quesos se realizaron determinaciones de pH (Bradley et al. 1993), grasa (IDF, 1997), proteína (IDF, 1993) y humedad (IDF, 1982) a los 3 días de maduración. Los recuentos microbiológicos se realizaron a 3, 15 y 30 días de maduración: el fermento primario y los lactobacilos mesófilos (NSLAB y fermento adjunto) se determinaron por recuento en placa utilizando APC-Leche y MRS-ágar, respectivamente, luego de 48 h de incubación a 37ºC (Milesi et al. 2010).

En los extractos se analizó el pH y los recuentos de los lactobacilos en MRS-ágar a 0 y 48 h de incubación.

Azúcares y ácidos orgánicos en los modelos de queso

La concentración de ácidos orgánicos, lactosa y galactosa se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de acuerdo a Peralta et al. (2016b). El cromatógrafo utilizado consta de bomba cuaternaria, desgasificador en línea, inyector manual, horno para el control de temperatura de la columna, detector UV-visible y detector de índice de refracción (Series 200 y Flexar, Perkin Elmer, EE.UU.). La separación cromatográfica se llevó a cabo a una temperatura de 65ºC en una columna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) equipada con un guardacolumna (Bio-Rad Laboratories, USA) catión H^+, utilizando una fase móvil de H_2SO_4 0,01M con un caudal de 0,6 mL/min.

Las muestras de los extractos de queso se diluyeron (1/3) con la fase móvil, se filtraron a través de membranas 0,45µm (Millex, Millipore, Sao Paulo, Brasil) y se inyectaron en el cromatógrafo. Las muestras de queso (5g) se homogeneizaron con agua destilada (15 mL) usando un homogeneizador Ultraturrax (modelo T25, IKA, Staufen, Alemania), en tres ciclos de 1 min a 17000 rpm. La suspensión se incubó durante 1 h a 40ºC, y luego se centrifugó (3000 g-30min- 10ºC) y se filtró a través de papel de filtro. La solución filtrada se ajustó a un volumen final de 25 mL. Las muestras se filtraron a través de las membranas 0,45µm, y se inyectaron en el cromatógrafo.

Compuestos volátiles en los modelos de queso

Se utilizó la metodología de microextracción en fase sólida (SPME) acoplada a un cromatógrafo gaseoso (GC) con detector de ionización de llama (FID) (Perkin Elmer, Estados Unidos) para aislar, separar y semi-cuantificar los compuestos, según Peralta et al. (2014). Las muestras refrigerados de los extractos (10 mL) y las muestras de los quesos miniatura (5g) se transfirieron a viales de GC. Los viales se atemperaron a 40±1°C durante 10 min, y luego se expuso 30 min la fibra CAR / PDMS 75 m (Supelco Inc. Bellefonte, PA, EE.UU.) en el espacio de cabeza.Los compuestos volátiles retenidos en la fibra fueron desorbidos térmicamente en el puerto de inyección durante 5min a 250ºC, se utilizó una columna HP INNOWax (60m×0,25mm×0.25µm) (Agilent J&W, Estados Unidos) y el detector se mantuvo a 290ºC. Las áreas de los compuestos se expresaron en unidades arbitrarias.

Análisis estadísticos

Los resultados de azúcares y ácidos orgánicos fueron analizados por ANOVA de una vía utilizando el software SPSS (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). Por su parte, los resultados de los compuestos volátiles fueron analizados mediante un análisis de componentes principales (ACP) utilizando el programa PAST (Hammer et al., 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fermentos deshidratados

Humedad y recuentos

El contenido de humedad de los polvos fue inferior al 4% (p/p) (**Tabla 1**). Ambas cepas mostraron buena resistencia al proceso de secado spray, ya que los recuentos en los polvos reconstituidos al volumen líquido original fueron similares a los recuentos en las suspensiones antes del secado (**Tabla 1**).

Los polvos obtenidos tuvieron recuentos de alrededor de 10^{10}UFC/g, que se mantuvieron sin cambios significativos durante el almacenamiento a 4ºC. Resultados similares en cuanto a la elevada supervivencia luego del secado spray fueron reportados para otras cepas de lactobacilos mesófilos, sometidas a un proceso de secado con condiciones similares a las utilizadas en el presente trabajo (Páez et al. 2012). Por otro lado, en relación a la viabilidad durante el almacenamiento refrigerado, se han reportado disminuciones de entre 1,6 y 2,5 órdenes logarítmicos para otras cepas de lactobacilos mesófilos luego de 6 meses de almacenamiento a 5ºC (Lavari et al. 2014).

Tabla 1. Humedad de los fermentos deshidratados y recuentos microbiológicos (UFC/mL) en las suspensiones celulares, antes y después del secado spray, y durante el almacenamiento del polvo.

Cepa	Humedad (%)	Recuentos (log UFC/mL)			
		Antes del secado	Después del secado (meses)[a]		
			0	8	12
Lb90	3,23±0,76	9,46±0,15	9,37±0,27	9,48±0,43	9,03±0,25
Lb91	3,70±0,68	9,48±0,25	9,44±0,50	9,63±0,18	8,95±0,17

[a] Para los recuentos de células viables después del secado spray, los polvos se reconstituyeron al volumen de líquido original (0,2 g/mL).

Extractos de queso

pH y recuentos

El pH de los extractos inoculados con lactobacilos disminuyó significativamente durante la incubación. Los valores obtenidos estuvieron entre 4,11 y 4,27 para los extractos con Lb90, y entre 4,21 y 4,49 para los extractos con Lb91. Además, se verificó un incremento del número de células viables de lactobacilos durante la incubación. El recuento inicial fue 6,2 y 6,7 log UFC/mL, mientras que después de 48h, se observó un incremento de aproximadamente 2 órdenes logarítmicos en todos los extractos experimentales. Los extractos controles permanecieron estériles durante la incubación y sin variaciones del pH inicial (5,20). Estos resultados reflejan un similar comportamiento en cuanto al crecimiento de los fermentos, independientemente de su forma de adición (F, D o R), aunque la disminución de pH fue levemente menor en los extractos D.

Azúcares y ácidos orgánicos

Seis ácidos orgánicos (cítrico, pirúvico, láctico, acético, propiónico y butírico) y dos azúcares (lactosa y galactosa) fueron cuantificados en los extractos de queso. Los ácidos láctico y cítrico tuvieron los niveles más altos, entre 920-1457mg/100mL y 104-150mg/100mL, respectivamente. Los otros ácidos mostraron niveles inferiores, con valores de 2,3 a 5,7mg/100mL para el ácido pirúvico, de 17,4 a 60,2mg/100mL para el ácido acético, de 18,4 a 102,7mg/100mL para el ácido butírico y de 9,5 a 12,1mg/100mL para el ácido propiónico. La concentración de los ácidos cítrico, pirúvico y láctico fue más alta en los extractos experimentales que en los extractos controles. La concentración de lactosa en el extracto control fue muy baja, mientras que la galactosa mostró niveles muy altos (571mg/100mL). En los extractos experimentales se observó una disminución en los niveles de ambos azúcares, siendo este efecto mayor para Lb90. La fermentación de azúcares y la producción de ácido láctico, verificado en los extractos experimentales, fue levemente mayor en los extractos F y R, en comparación a los extractos D, para ambas cepas, lo que sugiere un cierto retraso en esta actividad metabólica por el fermento deshidratado.

Compuestos volátiles

Veintisiete compuestos volátiles fueron detectados en el espacio de cabeza de las muestras de los extractos, 1 aldehído, 10 alcoholes, 7 cetonas, 6 ácidos, 2 ésteres y 1 lactona. Un ACP fue aplicado utilizando como variables el valor de área de cada compuesto en los extractos luego de 48h de incubación. Los primeros cinco componentes principales explicaron el 85% de la varianza total. El gráfico de loading y scores para CP1 y CP2, que explican en conjunto el 64% de la varianza, se muestra en la **Figura 1**. Una clara discriminación entre los extractos controles y experimentales fue observada a lo largo del CP1, mientras que a lo largo del CP2 se detectó una diferenciación según la cepa inoculada en el extracto. Los extractos con Lb91 fueron caracterizados por 2-propanona, 2-butanona, butanoato de etilo, 1-propanol y 1-butanol, mientras que los extractos con Lb90 fueron asociados principalmente con el diacetilo, acetoína y ácido pentanoico. En particular, los valores de área de diacetilo para los extractos con Lb90 fueron 10 veces mayores que para el resto de los extractos. Por último, no se observaron diferencias entre los extractos F, D y R para cada cepa, lo que demuestra que el secado spray no afectó la capacidad de estos cultivos para producir los compuestos volátiles detectados.

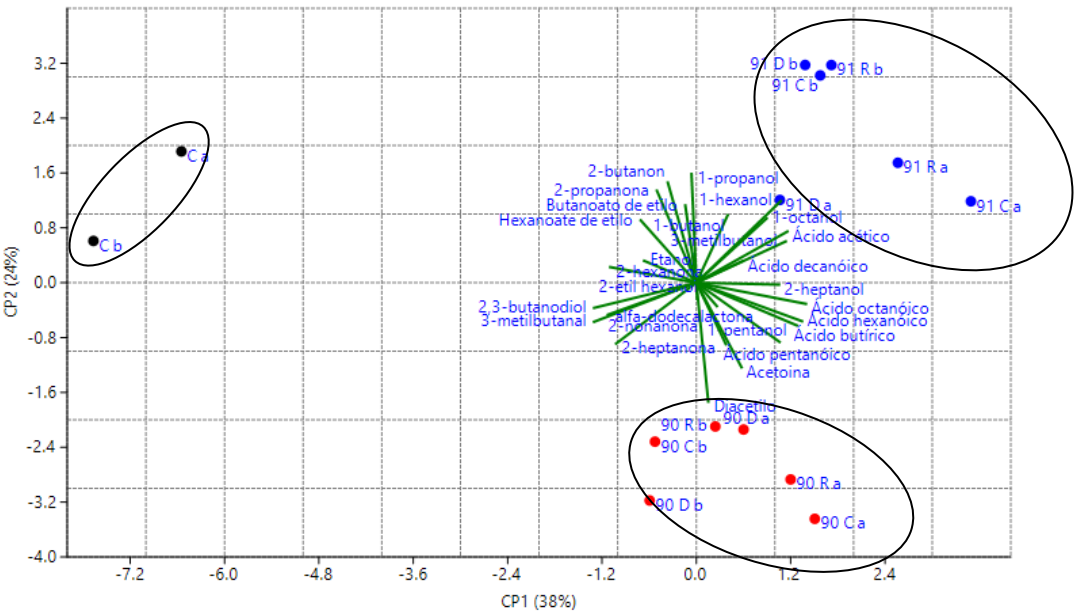


Figura 1. Gráfico de loading y scores para CP1 vs. CP2 del ACP de los compuestos volátiles en los extractos control (C,●) y extractos inoculados con Lb90 (90,●) y Lb 91 (91,●), adicionadas como cultivo fresco (F), deshidratado (D) o deshidratado previa reactivación (R). a y b: réplicas de la experiencia.

Quesos cremoso miniatura

Composición global y pH

Los valores medios de pH, contenido de proteína, grasa y humedad de los quesos fueron 5,20, 18,5%, 23,4% y 55,5% (p/p), respectivamente. Los valores fueron similares para los quesos control y experimentales.

Recuentos microbiológicos

En la **Figura 2** se presentan los resultados de los recuentos microbiológicos.El recuento de *St. thermophilus* se mantuvo por encima de 9 log UFC/g durante el período de maduración en todos los quesos. Por su parte, los lactobacilos estuvieron en los siguientes niveles iniciales: 4,6, 5,9 y 7,7 log UFC/g en los quesos E1, E2 y E3, respectivamente, los cuales se mantuvieron sin cambios significativos durante la maduración. De esta manera, la población de lactobacilos en los quesos se correlacionó directamente con la dosis del fermento adjunto utilizada; los niveles de lactobacilos en cada uno de los tres quesos (E1, E2 y E3) fueron aproximadamente 1 orden log mayor que el inóculo utilizado en cada caso. Finalmente, en el queso control los lactobacilos (NSLAB) estuvieron por debajo de 3 órdenes logarítmicos.

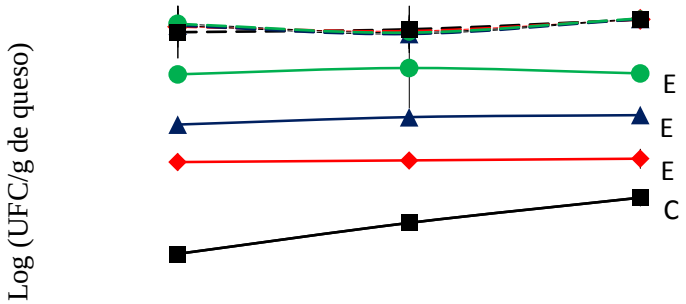


Figura 2. Recuentos del fermento primario (líneas discontinuas) y lactobacilos mesófilos (líneas continuas) en los quesos durante la maduración. C (■): queso control. E1 (♦), E2 (▲), y E3 (●): quesos experimentales con adición del fermento

deshidratado de Lb90 en niveles de $5x10^3$, $1x10^5$ y $5x10^6$ UFC/mL, respectivamente, en la leche de quesería.

Azúcares y ácidos orgánicos

En general, los niveles de los ácidos orgánicos y azúcares fueron similares en todos los quesos durante la maduración (**Tabla 2**). La única diferencia significativa se observó para el ácido láctico y propiónico a los 30 días, compuestos que presentaron mayores valores en los quesos E3. Los ácidos láctico y cítrico fueron los mayoritarios en todos los quesos, mientras que niveles más bajos se encontraron para los ácidos pirúvico y propiónico, lo que fue similar a lo observado en los extractos. En el mismo sentido, la lactosa estuvo en valores muy bajos (<0,1%), mientras que mayores valores de galactosa fueron detectados. En los quesos, a diferencia de lo observado en los extractos, el fermento adjunto no produjo una disminución de la galactosa.

Tabla 2. Ácidos orgánicos y azúcares (mg/100g queso) en los quesos controles (C) y experimentales (E), a 30 días de maduración (promedio±desviación estándar de dos réplicas de elaboración).

	C	**E1**	**E2**	**E3**
Ácido cítrico	148,9±4,2	136,4±5,5	165,1±19,7	180,8±14,3
Ácido pirúvico	8,4±1,1	7,8±1,3	9,0±0,4	7,6±0,6
Ácido láctico	$1211,8±10,5^{ab}$	$1082,0±48,8^{a}$	$1295,5±85,9^{bc}$	$1416,4±103,8^{c}$
Ácido propiónico	$9,6±0,2^{a}$	$8,1±0,3^{a}$	$9,8±1,3^{a}$	$12,8±0,9^{b}$
Lactosa	103,3±9,3	89,8±35,0	77,9±17,1	100,4±1,5
Galactosa	721,1±22,9	650,5±28,2	771,6±43,6	769,8±31,9

Compuestos volátiles

Veinte compuestos volátiles fueron determinados en el espacio de cabeza de los quesos: 1 aldehído, 5 alcoholes, 7 cetonas, 5 ácidos, 1 éster y 1 lactona.

Se realizó un ACP utilizando como variables los valores de área de todos los compuestos volátiles determinados en los quesos a 3 y 30 días de maduración. Los primeros cuatro componentes principales explicaron el 80% de la varianza total; los gráficos de loading y scores de CP1 vs. CP2 y CP3 vs. CP4 se muestran en la **Figura 3**. A lo largo de los CP1 y CP2 se detectó un agrupamiento de muestras de acuerdo al tiempo de maduración, y réplica de elaboración, respectivamente, por lo que estos factores fueron los que determinaron la mayor variación en los quesos. Sin embargo, también se observó una influencia de la adición del fermento adjunto a lo largo del CP4, que explicó un 10% de la variancia total; este efecto fue detectado solamente en los quesos con la mayor dosis de Lb90 (E3), los cuales se caracterizaron por mayores niveles de diacetilo y acetoína, además de α-dodecalactona, y los ácidos acético y decanoico (Figura 3B). Un análisis de ANOVA de los scores de las muestras para los primeros cuatro CP, permitió confirmar nuestra interpretación de la significancia de los mismos, ya que se observaron diferencias significativas en el CP1, CP2 y CP4 de acuerdo al tiempo de maduración, réplica de elaboración y tipo de queso, respectivamente (**Tabla 3**). Hay pocos trabajos que han evaluado el efecto de diferentes dosis de cultivo adjunto. En particular, Carunchia Whetstine et al. (2006) estudiaron la adición de un cultivo adjunto de *Lactococcus lactis* ATCC 29146 a dos niveles (10^4 y 10^5 UFC/mL) en queso Cheddar y observaron, al igual que en nuestro trabajo, que hubo mayores cambios cuando utilizaron el nivel más alto del cultivo adjunto.

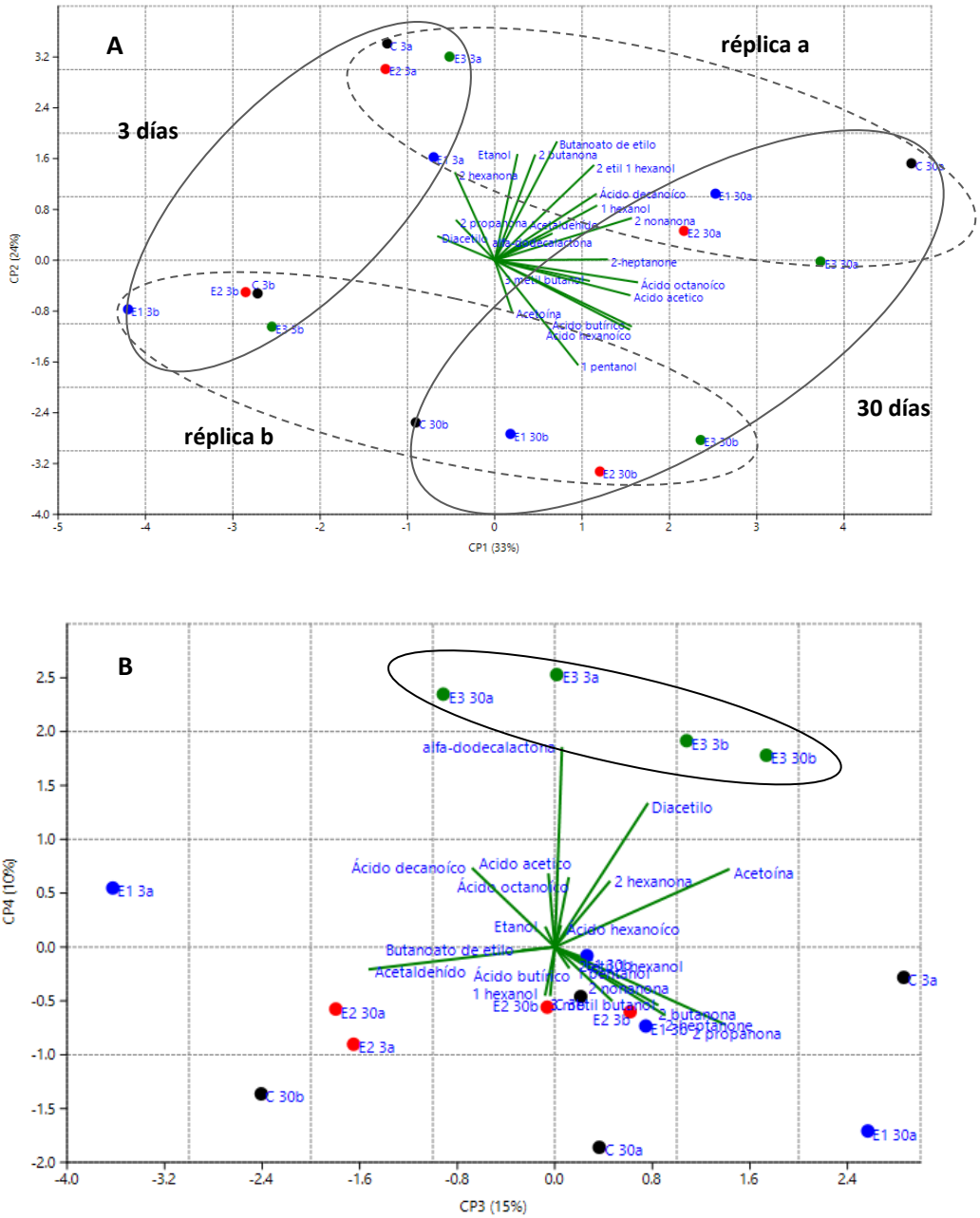


Figura 3. Gráfico de loading y scores del ACP de los compuestos volátiles en los quesos a 3 días y 30 días de maduración. (C: ●, E1: ●, E2: ● y E3: ●). a y b: réplicas de elaboración. A- CP1 vs. CP2, las elipses engloban las muestras de 3 y 30 días de maduración (líneas continuas) y las muestras de las réplicas a y b (líneas discontinuas). B- CP3 vs. CP4, la elipse engloba los quesos E3.

Tabla 3. Significancia de la adición de Lb90, tiempo de maduración y réplica de elaboración en los cuatro primeros CP del ACP de los compuestos volátiles de los quesos C, E1, E2 y E3 a 3 y 30 días de maduración.

CP	Adición de Lb90	Tiempo de maduración	Réplica de elaboración
1	NS	*	NS (p=0,062)
2	NS	NS (p=0,052)	*
3	NS	NS	NS
4	*	NS	NS

* = $p \leq 0,05$
NS= no hubo diferencias significativas, p>0,05.

CONCLUSIONES

El secado spray mostró ser apropiado para la producción de cultivos adjuntos deshidratados de las cepas autóctonas de *Lb. paracasei* 90 y *Lb. plantarum* 91, ya que se conservó la viabilidad y actividades metabólicas claves de cada cepa. En particular, la característica positiva de *Lb. paracasei* 90 de incrementar la producción de dos compuestos aromáticos de importancia como acetoína y diacetilo se confirmó en los dos modelos ensayados; en los quesos en particular este impacto fue detectado únicamente al utilizar la mayor dosis del cultivo deshidratado. La inclusión de una etapa de preincubación del fermento deshidratado en leche antes de la adición a la tina de elaboración podría incrementar la influencia del fermento en los compuestos volátiles y mejorar otras características tecnológicas del cultivo, tales como velocidad de crecimiento y fermentación de galactosa, lo que será evaluado en próximos trabajos.

BIBLIOGRAFÍA

Bradley RL, Arnold E, Barbano DM, Semerad RG, Smith DE, Vines BK 1993. Chemical and physical methods. En: Marshall R, editor. Standard methods for the examination of dairy product. Washington: American Public Health Association. pag 433-531.

Carunchia Whetstine ME, Drake MA, Broadbent JR, McMahon D, 2006. Enhanced nutty flavor formation in cheddar cheese made with a malty *Lactococcus lactis* adjunct culture. Journal of Dairy Science 89: 3277-3284.

Ciocia F, McSweeney PLH, Piraino P, Parente E, 2013. Use of dairy and non-dairy *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus pentosus* strains as adjuncts in Cheddar cheese. Dairy Science and Technology, 93: 623-643.

FIL-IDF (1993). Dried milk and dried cream. Determination of water content. International Dairy Federation Standard 26A. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.

FIL-IDF 1982. Formaggio e formaggio fuso. Determinazione della materia seca. Metodo di riferimento. Nº 4:A. Bruselas: International Dairy Federation. pag 184-188.

FIL-IDF 1993. Latte. determinazione del tenore in azoto. Metodo di riferimento. Nº 20:B. Bruselas: International Dairy Federation. pag 74-107.

FIL-IDF 1997. Lait et produits laitiers. Détermination de la teneur en matière grasse. Guide de directives generales apliquées aux methodes butyrometriques. Norme FIL Internationale 152:A 1997, Bruselas, Bélgica: International Dairy Federation.

Gobbetti M, De Angelis, M, Di Cagno R, Mancini L, Fox, PF. 2015. Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. Trends in Food Science & Technology, 45: 167-178.

Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. Palaeontolia Electronica, 4: 1-9.

Johnson, JAC, Etzel MR. 1995. Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 attenuated by spray-drying, freeze-drying or freezing. Journal of Dairy Science, 78: 761-768.

Lavari L, Páez T, Cuatrin A, Reinheimer J, Vinderola, G. 2014. Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli. Journal of Dairy Research. 81, 267-274.

Milesi, MM, McSweeney PLH, Hynes E. 2008. Viability and contribution to proteolysis of an adjunct culture of *Lactobacillus plantarum* in two model cheese systems: Cheddar cheese-type and soft-cheese type. Journal of Applied Microbiology, 105: 884-892.
Milesi, MM, Vinderola, G, Sabbag, N, Meinardi, CA, Hynes E. 2009. Influence on cheese proteolysis and sensory characteristics of non-starter lactobacilli strains with probiotic potential. Food Research International, 42: 1186-1196
Milesi, MM, Wolf, IV, Bergamini, CV, Hynes, ER. 2010. Two strains of nonstarter lactobacilli increased the production of flavor compounds in soft cheeses. Journal of Dairy Science, 93: 5020-5031.
Páez R, Lavari L, Vinderola G, Audero G, Cuatrin A, Zariztky N, Reinheimer J. 2012. Effect of spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. Food Research International, 48: 748-754.
Parente E, Cogan TM. 2004. Starter Cultures: General Aspects. En: Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP, editores. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology: General Aspects. London: Elsevier Academic Press. pag 123-148.
Peralta GH, Bergamini CV, Hynes ER. 2016a. Aminotransferase and glutamate dehydrogenase activities in lactobacilli and streptococci. Brazilian Journal of Microbiology, 47: 741-748.
Peralta GH, Wolf IV, Bergamini CV, Perotti MC, Hynes ER. 2014. Evaluation of volatile compounds produced by *Lactobacillus paracasei* I90 in a hard-cooked cheese model using solid-phase microextraction. Dairy Science and Technology, 94: 73-81.
Peralta GH, Wolf IV, Perotti MC, Bergamini CV, Hynes ER. 2016b. Formation of volatile compounds, peptidolysis and carbohydrate fermentation by mesophilic lactobacilli and streptoccocci cultures in a cheese extract. Dairy Science and Technology, 96: 603-621.
Randazzo CL, Pitino I, De Luca S, Scifo GO, Caggia C, 2008. Effect of wild strains used as starter cultures and adjunct cultures on the volatile compounds of the Pecorino Siciliano cheese. International Journal of Food Microbiology, 122: 269-278.
Santivarangkna C, Kulozik U, Foerst P. 2007. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. Biotechnology Progress, 23: 302-315.
Settanni L, Franciosi E, Cavazza A, Cocconcelli PS, Poznanski E. 2011. Extension of Tosèla cheese shelf-life using non-starter lactic acid bacteria. Food Microbiology, 28: 883-890.
Silva J, Freixo R, Gibbs P, Teixeira P. 2011. Spray-drying for the production of dried cultures. International Journal of Dairy Technology, 64: 321-335.
Teixeira PC, Castro MH, Malcata FX, Kirby RM. 1995. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray-drying. Journal of Dairy Science, 78: 1025-1031.
To, BCS, Etzel, MR. 1997. Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria species. Journal of Food Science, 62: 576-578.
Wouters JTM, Ayad EHE, Hugenholtz J, Smit G, 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. International Dairy Journal, 12: 91-109.

Uso de flavanonas cítricas para la reducción de contaminación por aflatoxinas en maíz a distintas a_w

Pok P.S. (1), Vicente S. (2,3), García Londoño V.A. (1,2,4), Resnik S.L. (1,3), Pacin A.M. (2)

(1) Departamentos Química Orgánica e Industrias, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, CABA, Argentina.
(2) Fundación de Investigaciones Científicas Teresa Benedicta de la Cruz, Luján, Argentina.
(3) Comisión de Investigaciones Científicas de Buenos Aires, Argentina.
(4) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina.
Dirección de e-mail: paulasolpok@gmail.com

RESUMEN

Las aflatoxinas son micotoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus*, siendo las más relevantes B1, B2, G1 y G2, halladas como contaminantes naturales de cereales y oleaginosas. Por otro lado, se han obtenido a bajo costo diversos flavonoides como subproductos de la industria citrícola, en particular las flavanonas estudiadas: naringina (NAR), hesperidina (HES) y neohesperidina (NEO). Estudios previos permitieron encontrar mezclas óptimas de dichas flavanonas para la inhibición total de la producción de aflatoxinas, siendo las mismas HES-NAR: 0,206-0,037 mM, HES-NEO:0,156-0,283 mM y NAR-NEO:0,035-0,195 mM. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de dichas mezclas para prevenir la acumulación de aflatoxinas por *A. parasiticus* en granos de maíz, a actividades de agua de 0,91, 0,95 y 0,98. La inhibición de aflatoxinas por parte de las mezclas fue dependiente de la a_w, siendo significativamente más efectivas las mezclas aplicadas a a_w=0,98. Los mejores resultados se lograron con HES-NEO: 0,156-0,283 mmol/kg y NAR-NEO: 0,035-0,195 mmol/kg a a_w=0,98 con las que se alcanzó entre 90 y 95% de inhibición para todas las aflatoxinas estudiadas.

Palabras clave: Aflatoxinas, *Aspergillus parasiticus*, subproductos citrícolas, flavanonas.

ABSTRACT

Aflatoxins are mycotoxins produced by fungi of the genus *Aspergillus*, being B1, B2, G1 and G2 the most outstanding. They are natural contaminants of cereals and oilseeds. On the other hand, several flavonoids have been economically obtained as byproduct of citrus industries, particularly the studied flavanones naringin (NAR), hesperidin (HES) and neohesperidin (NEO). Previous studies allowed to find optimal mixtures of these flavanones in order to totally inhibit aflatoxins accumulation, which were HES-NAR: 0,206-0,037 mM, HES-NEO: 0,156-0,283 mM and NAR-NEO: 0,035-0,195 mM. The aim of this study was to use these mixtures to prevent aflatoxin accumulation by *A. parasiticus* in maize at different water activities: 0,91, 0,95 and 0,98. Aflatoxins inhibition due to these mixtures depended on a_w, being significantly more effective at a_w=0,98. Best results were obtained with HES-NEO: 0,156-0,283 mmol/kg and NAR-NEO: 0,035-0,195 mmol/kg at a_w=0,98, achieving from 90 to 95% inhibition of all aflatoxins studied.

Keywords: Aflatoxins, *Aspergillus parasiticus*, citrus industry byproducts, flavanones.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por mohos comúnmente hallados en alimentos y piensos. Estudiarlas es de interés debido a los efectos que implican en la salud humana, en la productividad animal y en el comercio internacional (Groopman y Wogan 2016). Las aflatoxinas (AFs) son micotoxinas que pueden ser encontradas en una variedad de cereales, oleaginosas y alimentos, entre los que se destacan maní, maíz, semillas de algodón,arroz, girasol, soja, frutos secos e higos. Las AFs son metabolitos secundarios producidos por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius* (Iqbal et al. 2013). Se han descripto más de veinte aflatoxinas, aunque las que se encuentran reguladas son B_1 (AFB1), B_2 (AFB2), G_1 (AFG1) y G_2 (AFG2) (JECFA 2007). Estas micotoxinas tienen efectos mutagénicos, carcinogénicos, hepatotóxicos, teratogénicos e inmunosupresores, actuando también como inhibidores de varios sistemas metabólicos. La Organización Mundial de la Salud las ha incluido en la lista de productos químicos que contribuyen a la carga producida por enfermedades alimentarias. Es interesante destacar que estas enfermedades son las que más afectan la salud pública en términos de años de vida perdidos (WHO 2016). La aflatoxina B1 se ha clasificado como Grupo 1 (carcinógeno para los seres humanos) por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC 2012). La estructura química de AFB1 se puede ver en la **figura 1**. Las regulaciones correspondientes a aflatoxinas en cereales y otros alimentos varían entre 1 y 12 µg/kg para AFB_1, 4 y 15 µg/kg para AFB_2, con un límite de 15 µg/kg para AFs totales (MERCOSUR 2002, FAO 2004, EC 2010) .

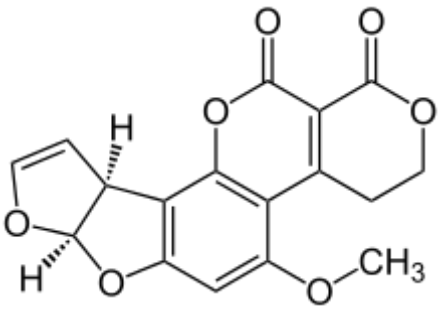
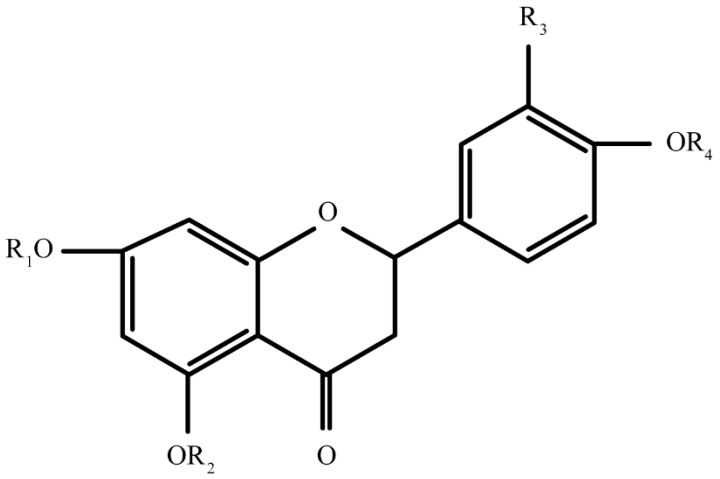


Figura 1. estructura química de Aflatoxina B1

Basado en lo mencionado, es crucial reducir al mínimo la acumulación de estas en los productos alimentarios (Pitt et al. 2012), aplicando distintas tecnologías (IARC 2015).La creciente preocupación de los consumidores hacia la seguridad alimentaria y la resistencia desarrollada por los microorganismos han empujado a la búsqueda de sustancias naturales que reemplacen los aditivos sintéticos tradicionalmente utilizados. Su sustitución por aditivos naturales es visto como un beneficio desde el punto de vista de la calidad, así como de la seguridad e inocuidad de los alimentos (Viuda-Martos et al. 2008).

Los flavonoides son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Su estructura está compuesta por dos anillos aromáticos, conectados a través de un anillo de piranona o hidropiranona (Tapas et al. 2008). Se clasifican de acuerdo con el nivel de oxidación de su esqueleto central. Los flavonoides que se encuentan en *Citrus* sp. se pueden clasificar en los siguientes grupos: flavanonas, flavonas, flavonoles y antocianinas (Benavente-García y Castillo 2008). Estos compuestos tienen capacidad antioxidante y podrían presentar efectos benéficos en la salud humana actuando en la prevención de cáncer y aterosclerosis, entre otras enfermedades (Tripoli et al. 2007). Las flavanonas se encuentran en los cítricos como glucósidos (Khan et al. 2014). Los glucósidos de flavanona provenientes de cítricos que predominan son HES que se encuentra en las naranjas, limones y otros cítricos; NAR en pomelos y naranjas amargas y NEO en naranjas amargas (**figura 2**).



NAR R_1: -Ramnosa, R_2: -H, R_3: -H, R_4: -OH
NEO R_1: -Ramnosa, R_2: -H, R_3: -OH, R_4: -OCH_3
HES R_1: -Rutinosa, R_2: -H, R_3: -OH, R_4: -OCH_3

Figura 2. Estructura básica de una flavanona, con los sustituyentes correspondientes a naringina, hesperidina y neohesperidina.

Estos compuestos se encuentran principalmente en la cáscara de las frutas mencionadas, compuesta por el albedo y el flavedo (Zhang et al. 2011, Wang et al. 2016) que son considerados subproductos de la industria procesadora de jugos cítricos y representan aproximadamente el 50% en peso de la materia prima inicial (Marín et al. 2007, Russo et al. 2014). La extracción de compuestos bioactivos de los mismos, entre los cuales se encuentran las flavanonas, puede ser realizada a bajo costo (Petruccioli et al. 2011).

La metodología de superficies de respuesta (RSM) es útil para el modelado y análisis de situaciones en las que una respuesta de interés está influenciada por varias variables, llevando a cabo ensayos menos laboriosos y que consumen menor tiempo (González-Gómez et al. 2014). Utilizando esta metodología se lograron obtener mezclas óptimas para la reducción total de acumulación de AFB1 y AFB2 en medio de cultivo agar extracto de malta por parte de *A. flavus*(Salas et al. 2016). El objetivo de este estudio fue analizar la capacidad de estas mezclas de inhibir la acumulación de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 en maíz, a distintas actividades de agua, por parte de una cepa de *A. parasiticus* considerada de alta producción de dichas micotoxinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Solventes y reactivos

Se utilizaron solventes orgánicos grado HPLC. El acetonitrilo (ACN), etanol y metanol (MeOH) fueron adquiridos de Sintorgan (Buenos Aires, Argentina); el ácido trifluoroacético (TFA) y el hexano de J. T. Baker (Estado de México, México). Se utilizó agua de calidad HPLC preparada con un sistema Milli-Q Waters (Waters Asociated, MA, EE.UU.). Los estándares de AFs utilizados los proveyó Sigma (MO, EE.UU.) y se prepararon según el "Método 990.33" (AOAC 2012).

Para la preparación de los inóculos se utilizó agar extracto de malta, MEA (Britania, Argentina), glicerol (Anedra, Argentina) y Tween 80 adquirido de Biokar Diagnostics, Francia.

Flavanonas

Las flavanonas NAR, HES y NEO se obtuvieron en el "Instituto de Investigaciones para la Industria Química", de la Universidad Nacional de Salta, Argentina, a partir de residuos de la industria de cítricos local, de acuerdo a trabajos anteriormente publicados (Geronazzo et al. 2000, Macoritto et al. 2001, Macoritto et al. 2004). Brevemente, el procedimiento de obtención de las flavanonas consiste en moler las frutas descartadas o los residuos del proceso de jugo, a un tamaño medio de 2 mm de diámetro para luego llevar a cabo una extracción en columna de lecho fijo. Para obtener NAR, la extracción se realizó con agua destilada a 80°C, para HES se

utilizó una solución acuosa a un pH de 10,0 a 10,5 a 70°C y NEO se obtuvo con etanol: agua 25:50 (v/v) a 25°C. En los tres procesos se enfrió el extracto obtenido, lo cual lleva a la cristalización de las flavanonas. El precipitado fue filtrado, lavado y finalmente el sólido fue secado en estufa a 50°C. Este proceso de extracción se considera simple y económico.

Cepas fúngicas

La cepa de *A. parasiticus* Nº MICA 401 utilizada fue identificada molecularmente por INTA e ingresada al cepario MICA de este grupo de trabajo. Luego de ensayos de capacidad toxicogénica fue considerada de alta producción de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2.

El inóculo de *A. parasiticus* se realizó incubando una estría en MEA durante 7 días, a la que luego se le agregó 10 ml de Tween 80 0,01%, se ajustó la a_w del inóculo agregando la cantidad necesaria de glicerol y se agitó en vortex durante 30 segundos para resuspender los conidios. Se midió la concentración de esporas utilizando una cámara de Neubauer y se ajustó el inóculo a 1.10^6 UFC/mL, del cual se inocularon 50 µL en el medio maíz ya preparado (Salas et al. 2011, Passone et al. 2013).

Preparación del medio de cultivo

El ensayo en maíz se llevó a cabo por triplicado en Erlenmeyers conteniendo 25 g de maíz Flint esterilizados en autoclave a 121ºC por 15 minutos. La a_w de los mismos fue ajustada agregando la cantidad de agua necesaria mediante el uso de isotermas de sorción de maíz (Boente et al. 1996, Galati et al. 2011) y luego confirmada en un equipo Aqualab (Decagon Devices, WA, EE.UU.).

Las concentraciones óptimas de flavanonas estudiadas son las que pueden verse en la **tabla 1**.

Tabla 1: Mezclas óptimas utilizadas (mmol/kg).

	Naringina	Hesperidina	Neohesperidina
Mezcla 1	0,037	0,206	-
Mezcla 2	-	0,156	0,283
Mezcla 3	0,035	-	0,195

Se prepararon disolviendo las flavanonas en agua:etanol 95:5 (v/v) a 50ºC en una concentración tal de manera de obtener las mezclas óptimas en el medio maíz en mmol/kg maíz en base tal cual, luego de agregar 5 ml al mismo. Se utilizaron controles sin flavanonas y blanco sin inocular, con el agregado de las soluciones correspondientes. Una vez preparados los medios de cultivo, se los inoculó con la suspensión de conidios mencionada en *2.3* y se los incubó a 25ºC durante 14 días (Montani et al. 1988, Samapundo et al. 2007), en bolsas de polietileno conteniendo soluciones de glicerol a fin de mantener la a_w constante (Chirife y Resnik 1988), con 32% m/m glicerol en agua para lograr a_w=0.91, 20% m/m para a_w=0.95 y 10% m/m para a_w=0.98. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a analizar el contenido de AFs en las distintas matrices.

Análisis de aflatoxinas

El método analítico para Aflatoxinas se basa en el "Método 990.33" (AOAC 2012), descripto brevemente:

Extracción

La extracción se realiza en 25 g de medio de maíz se agregó 100 mL de ACN:agua 84:16 (v/v). Se licuó durante 3 minutos a alta velocidad en una licuadora (Österizer, Argentina) y se filtraron por papel Whatman nº 4. Se pasaron 5 ml del sobrenadante por una columna MycoSep 224 AflaZon (Romer Labs InC, EE.UU.). Se obtuvieron 2 alícuotas de 1 ml (0,25 g) y se evaporaron a sequedad en vacío a 60ºC.

Derivatización

El extracto evaporado se resuspendió en 200 µl de hexano, y se derivatizó con 50 µL de ácido trifluoroacético agitándolo por 30 segundos. Luego de 5 minutos se neutralizó la reacción con 950 µL de ACN:agua 1:9 (v/v) y se separó la fase acuosa.

Análisis cuantitativo

La cuantificación se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detector de fluorescencia. El equipo de HPLC utilizado (Agilent, serie 1100, USA) cuenta con un módulo degasificador (G1322A), un auto sampler (G1313A), un detector de fluorescencia (G1321A), una bomba cuaternaria (G1311 A) y un controlador de temperatura (G1316A).

Se utilizó una columna de fase reversa C18 Microsorb-MV 100 de 150 x 4,6 mm y 5 µm de tamaño de partícula (Agilent technologies, EEUU). La fase móvil fue

agua:ACN:MeOH (70:15:15 v/v/v) y el flujo 1 mL/min. Se ajustó la longitud de onda de excitación y emisión de fluorescencia en 360 nm y 440 nm respectivamente, y el termostato a 40°C.
Los límites de detección y cuantificación fueron 0,2 µg/kg y 0,3 µg/kg para AFB1 y AFG1; 0,3µg/kg y 0,5 µg/kg para AFB2, y AFG2, respectivamente.

Cálculo del porcentaje de inhibición

El porcentaje de inhibición de acumulación de AFs respecto al control se calculó siguiendo la ecuación 1:

$$\%Inhibición=100(1-Cmz/Cct) \quad (1)$$

En la que Cmz representa la concentración media de cada aflatoxina para cada tratamiento y Cct representa la concentración media de cada aflatoxina en el control respectivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de inhibición de la acumulación de cada aflatoxina para las diversas a_w se observa en la **figura 3**. Para a_w=0,91, descripto en la **figura 3 (a)**, el máximo porcentaje de inhibición (49,2%) fue alcanzado para AFG2 utilizando la mezcla 1, la cual dio los mejores resultados también para AFB1, AFB2 y AFG1 a dicha a_w. Las mezclas 2 y 3 inhibieron la producción de AFG2 en 25,6% y 24,2% respectivamente, aunque para las restantes aflatoxinas no superaron el 20%.
Similares trabajos han señalado que extractos de *Citrus* sp., que contendrían algunas de las flavanonas estudiadas en este trabajo, tienen actividad inhibidora de la acumulación de aflatoxinas. Bejarano Rodríguez y Centeno Briceño (2009) demostraron que 20 µg/g de extracto de *Citrus limon* en los piensos de aves de corral contaminado inicialmente con 45 µg/kg de aflatoxinas, alcanzado casi el 74% de reducción después de 1 hora de tratamiento. Según dos Santos Oliveira y Badiale Furlong (2008) los extractos fenólicos de cáscara de naranja inhibieron en ensayos *in vitro* la producción de aflatoxina B1 y B2 a una concentración de 250 mg/mL.
La mezcla 1, en los cultivos desarrollados con actividad de agua 0,95 (**figura 3 b**), promovió la producción de todas las AFs estudiadas; asimismo la mezcla 3 suscitó la producción de AFB2 en un 19,6%. Sin embargo, esta mezcla utilizada en las otras a_w, causó efecto inhibitorio. El mayor porcentaje de inhibición obtenido a a_w=0,95 fue de 23,8% para AFG2 utilizando la mezcla 2. Estos resultados son coincidentes con Tapas et al. (2008) que refieren que en un estudio de inhibición del crecimiento de *Deuterophoma tracheiphila* se encontró que HES podría estimular el crecimiento de este moho. Esto pone en evidencia la alta dependencia de la actividad de estos compuestos con las condiciones de aplicación.
En la **figura 3 (c)** se observa que la mezcla 1, a a_w=0,98 dio resultados inferiores a los obtenidos con las mezclas 2 y 3, por lo que si bien las tres mezclas fueron seleccionadas como óptimas por el método de RSM, sólo estas últimas demostraron tener la mejor capacidad inhibitoria bajo las condiciones del presente estudio. Las mayores inhibiciones se lograron con HES-NEO: 0,156-0,283 mmol/kg y NAR-NEO: 0,035-0,195 mmol/kg a a_w=0,98 con las que se alcanzó entre 90 y 95% de inhibición para todas las aflatoxinas aunque no se logró llegar a la inhibición total de la acumulación de las mismas. Los resultados muestran que la inhibición de aflatoxinas por parte de las mezclas es dependiente de la a_w, siendo significativamente más inhibitorias las mezclas 2 y 3 aplicadas a a_w=0,98.

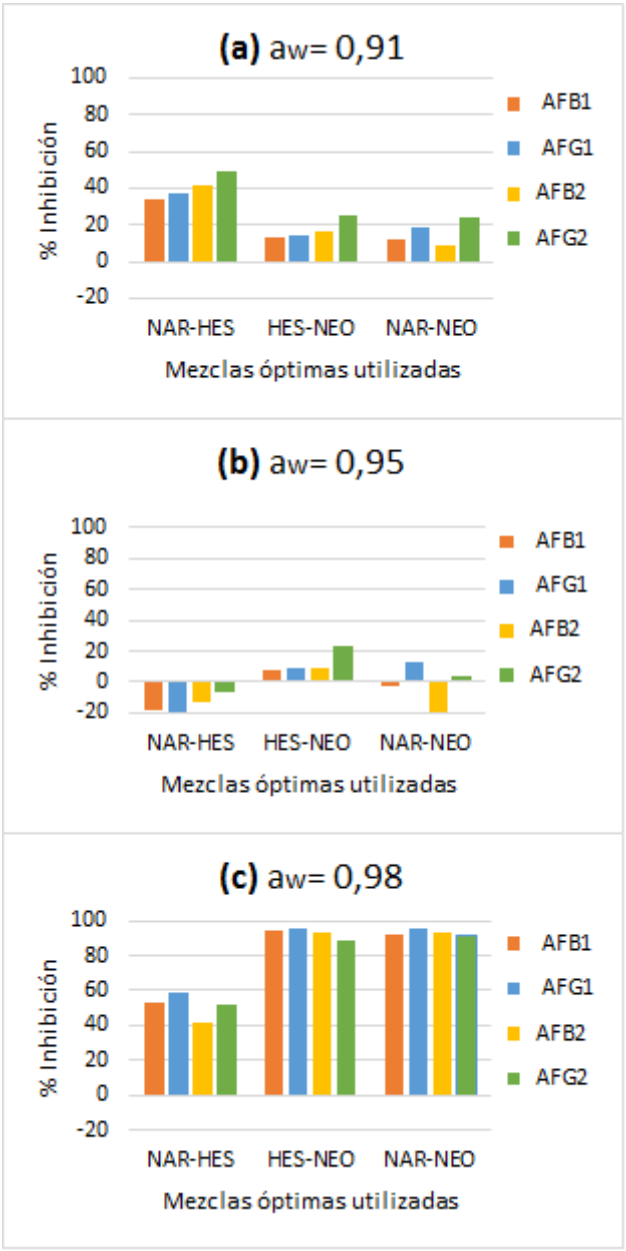


Figura 3. Porcentajes de inhibición de la acumulación de cada aflatoxina para (a) a_w= 0,91, (b) a_w=0,95 y (c) a_w=0,98.

Otras publicaciones se refieren a las flavanonas cítricas debido a sus propiedades antifúngicas y antimicotóxicas (Pistelli y Giorgi 2012). Al utilizar extractos de cítricos conteniendo las mismas en jugos de ananá, se incrementó el efecto de la homogeneización en la inactivación de esporas de *Fusarium oxysporum*(Bevilacqua et al. 2012). NAR y HES redujeron el crecimiento radial de *Penicillium digitatum* en un 38 y 25% respectivamente, al ser agregadas en una concentración de 8 mM al medio de cultivo agar papa dextrosa (Ortuño et al. 2006). Por otra parte NAR, NEO y HES a 0,25 mM redujeron la velocidad de crecimiento radial de *A. parasiticus* y otros mohos en medio de cultivo MEA (Salas et al. 2011). A su vez, dichas flavanonas redujeron entre 95 y 99% la acumulación de patulina por parte de *P. expansum* y *Byssochlamys fulva* en ensayos realizados en MEA (Salas et al. 2012).
Se muestran en la **figura 4**, la desviación estándar relativa porcentual (%RSD) de los ensayos realizados por triplicado.

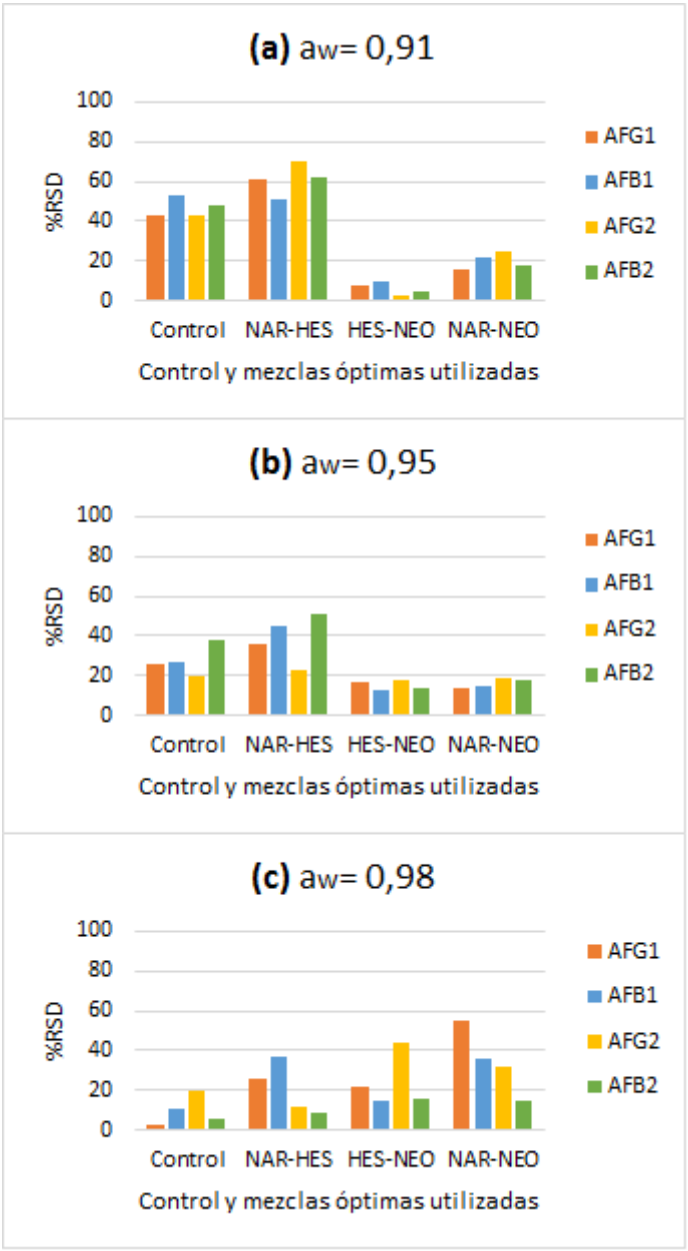


Figura 4. Desviación estándar relativa porcentual obtenida para todas las mezclas y respectivos controles para (a) a_w= 0,91, (b) a_w=0,95 y (c) a_w=0,98.

En la **figura 4 (a)** correspondiente a a_w= 0,91 los resultados correspondientes a la mezcla 2 presentan los menores desvíos. Por el contrario los resultados correspondientes a mezcla 1 tienen valores de dispersión similares al control. A a_w= 0,98 se encontraron los mayores porcentajes de inhibición dados por las mezclas 2 y 3. Al analizar el %RSD de las mismas, la mezcla 2 presenta menor dispersión, **Figura 4 (c)**.

CONCLUSIONES

Analizando las mezclas, la presencia de la flavanona neohesperidina sería determinante para la reducción de la acumulación de aflatoxinas por *Aspergillus parasiticus*.

Estos resultados impulsan a continuar ensayando estas flavanonas para evaluar sus efectos sobre la producción de AFs, diseñando las pruebas que reproduzcan las condiciones en la se encuentran las distintas matrices alimentarias, incluyendo el parámetro aw.

BIBLIOGRAFÍA

AOAC. 2012. Aflatoxins in Corn and Peanut Butter. Official Methods of Analysis. Rockville, Estados Unidos, AOAC International. pag 2190.

Bejarano Rodríguez RJ y Centeno Briceño SJ. 2009. Extracto de *Citrus limon* para el control de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en alimentos concentrados para pollos de engorde producidos en Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 29: 57-61.

Benavente-García O y Castillo J. 2008. Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory a
ctivity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 6185-6205.

Bevilacqua A, Campaniello D, Sinigaglia M, Ciccarone C y Corbo MR. 2012. Sodium-benzoate and citrus extract increase the effect of homogenization towards spores of *Fusarium oxysporum* in pineapple juice. Food Control, 28: 199-204.

Boente G, Gonzalez HHL, Martınez E, Pollio ML y Resnik SL. 1996. Sorption isotherms of corn – study of mathematical models. Journal of Food Engineering, 29: 115-128.

Chirife J y Resnik S. 1988. Proposed theoretical water activity values at various temperatures for selected solutions to be used as reference sources in the range of microbial growth. Journal of Food Protection, 51: 419-423.

dos Santos Oliveira M y Badiale Furlong E. 2008. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. World Mycotoxin Journal, 1: 139-146.

EC. 2010. European Commission. Commission Regulation No 165/2010. Amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. Official Journal of the European Union, L 50/8.

FAO. 2004. Food and agriculture organization. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition papers 81.

Galati S, Giannuzzi L y Giner SA. 2011. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth of *Aspergillus parasiticus* on irradiated Argentinian flint maize. Journal of Stored Products Research, 47: 1-7.

Geronazzo H, Robin J, Blanco S, Cuevas C y Ellenrieder G. 2000. Aprovechamiento integral de residuos de producción y procesamiento de pomelos. Un proyecto de innovación tecnológica. En: Anales del VIII Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Buenos Aires, Argentina: Asociación de Tecnólogos Alimentarios. pag 119.

González-Gómez D, Cardoso V, Bohoyo D, Ayuso MC y Delgado-Adamez J. 2014. Application of experimental design and response surface methodology to optimize the procedure to obtain a bactericide and highly antioxidant aqueous extract from orange peels. Food Control, 35: 252-259.

Groopman JD y Wogan GN. 2016. Aflatoxin: A Global Public Health Problem. En: Encyclopedia of Food and Health. Oxford: Academic Press. pag 68-72.

IARC. 2012. A review of human carcinogens. Part F: Chemical agents and related occupations. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2009: Lyon, France), 100F.

IARC. 2015. Mycotoxin control in low- and middle-income countries. International Agency for Research on Cancer Working Group Reports 9. Lyon, Francia, International Agency for Research on Cancer. pag 54.

Iqbal SZ, Asi MR y Ariño A. 2013. Aflatoxins A2 - Maloy, Stanley. En: Hughes K. Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition). San Diego: Academic Press. pag 43-47.

JECFA. 2007. Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO technical report series, 947.

Khan MK, Zill EH y Dangles O. 2014. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. Journal of Food Composition and Analysis, 33: 85-104.

Macoritto A, Geronazzo H y Ellenrieder G. 2001. Obtención de hesperidina a partir de naranjas de derrame. Información Tecnológica, 12: 3-8.

Macoritto A, Robin J, Blanco S y Geronazzo H. 2004. Obtención de flavonoides de frutas inmaduras de *Citrus aurantium*. Innovación, 16: 39-43.

Marín FR, Soler-Rivas C, Benavente-García O, Castillo J y Pérez-Alvarez JA. 2007. By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. Food Chemistry, 100: 736-741.

MERCOSUR. 2002. Reglamento técnico MERCOSUR sobre límites máximos de
aflatoxinas admisibles en leche, maní y maíz. MERCOSUR/GMC/RES. N 25/02.

Montani ML, Vaamonde G, Resnik SL y Buera P. 1988. Water activity influence on aflatoxin accumulation in corn. International Journal of Food Microbiology, 6: 349-353.
Ortuño A, Báidez A, Gómez P, Arcas MC, Porras I, García-Lidón A y Río JAD. 2006. *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. Food Chemistry, 98: 351-358.
Passone MA, Girardi NS y Etcheverry M. 2013. Antifungal and antiaflatoxigenic activity by vapor contact of three essential oils, and effects of environmental factors on their efficacy. LWT - Food Science and Technology, 53: 434-444.
Petruccioli M, Raviv M, Di Silvestro R y Dinelli G. 2011. Agriculture and agro-industrial wastes, byproducts, and wastewaters: origin, characteristics, and potential in bio-based-compounds production. En: Moo-Young M. Comprehensive Biotechnology (Second Edition). Burlington: Academic Press. pag 531-545.
Pistelli L y Giorgi I. 2012. Antimicrobial properties of flavonoids. En: Patra AK. Dietary Phytochemicals and Microbes. Netherlands: Springer. pag 33-91.
Pitt J, Wild C, Baan R, Gelderblom W, Miller J, Riley R y Wu F. 2012. Improving public health through mycotoxin control. IARC Scientific Publications Series, No. 158. Lyon, France, World Health Organization. pag 165.
Russo M, Bonaccorsi I, Torre G, Sarò M, Dugo P y Mondello L. 2014. Underestimated sources of flavonoids, limonoids and dietary fibre: Availability in lemon's by-products. Journal of Functional Foods, 9: 18-26.
Salas MP, Céliz G, Geronazzo H, Daz M y Resnik SL. 2011. Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from citrus species. Food Chemistry, 124: 1411-1415.
Salas MP, Pok PS, Resnik SL, Pacin A y Munitz M. 2016. Use of citrus flavanones to prevent aflatoxin contamination using response surface methodology. Food Control, 60: 533-537.
Salas MP, Reynoso CM, Céliz G, Daz M y Resnik SL. 2012. Efficacy of flavanones obtained from citrus residues to prevent patulin contamination. Food Research International, 48: 930-934.
Samapundo S, De Meulenaer B, Osei-Nimoh D, Lamboni Y, Debevere J y Devlieghere F. 2007. Can phenolic compounds be used for the protection of corn from fungal invasion and mycotoxin contamination during storage? Food Microbiology, 24: 465-473.
Tapas AR, Sakarkar DM y Kakde RB. 2008. Flavonoids as nutraceuticals: A Review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 7: 1089-1099.
Tripoli E, LaGuardia M, Giammanco S, DiMajo D y Giammanco M. 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. Food Chemistry, 104: 466-479.
Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-López J y Perez-ÁLvarez J. 2008. Antibacterial activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils. Journal of Food Safety, 28: 567-576.
Wang S, Tu H, Wan J, Chen W, Liu X, Luo J, Xu J y Zhang H. 2016. Spatio-temporal distribution and natural variation of metabolites in citrus fruits. Food Chemistry, 199: 8-17.
WHO. 2016. World Health Organization estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. World Health Organization. pag 252.
Zhang M, Duan C, Zang Y, Huang Z y Liu G. 2011. The flavonoid composition of flavedo and juice from the pummelo cultivar (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and the grapefruit cultivar (*Citrus paradisi*) from China. Food Chemistry, 129: 1530-1536.

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen el apoyo financiero de: Comisión de Investigaciones Científicas de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Fundación de Investigaciones Científicas Teresa Benedicta de la Cruz y Universidad de Buenos Aires.

Estudio enzimático de viscozyme® l. Sobre collets de girasol: determinación de parámetros cinéticos.

Rodríguez, L.M.; Fernández M.B.(1);Pérez, E.E.; Crapiste, G.H.

PLAPIQUI-UNS-CONICET, Bahía Blanca 8000, Argentina
(1)Grupo TECSE, Facultad de ingeniería, UNCPBA, Olavarría 7400, Argentina.
Dirección de e-mail: lurodriguez@plapiqui.edu.ar

RESUMEN

El uso de enzimas en tecnología de alimentos ha encontrado amplias aplicaciones en el procesamiento y la producción de una extensa gama de productos alimenticios. La temperatura, el pH, la fuerza iónica y las concentraciones apropiadas de componentes como sustrato y enzima, son los principales factores que deben ser considerados en el empleo de enzimas. La estandarización de estos parámetros es deseable, pero la diversidad de características de diferentes enzimas y sustratos evita la unificación de las condiciones de los ensayos. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la cinética enzimática de Viscozyme® L, sobre *collets* de girasol. Los experimentos se llevaron a cabo en un sistema batch, con agitación constante. Las condiciones de reacción fueron:T=50ºC, pH=5, fuerza iónica 0,1M y tiempo de reacción de 1 hora. Se utilizó una concentración de Viscozyme® L. de 0,06% v/v. La velocidad de reacción enzimática se ajustó a través de la ecuación propuesta por Michaelis–Menten (p=0,0004). Los parámetros K_m y V_{max} estimadas para este modelo fueron 0,1249 g/mL y 0,5274 mg/mL*min, respectivamente. Estos fueron comparados con los obtenidos a partir de las ecuaciones lineales de Lineweaver-Burk, Hanes-Wolff y Eadie-Hofstee, obteniéndose menores desvíos con la ecuación de Hanes-Wolff.

Palabras Clave: Cinética enzimática, *collets* de girasol, Viscozyme® L, Michaelis-Menten.

ABSTRACT

The use of enzymes in food technology has found widespread applications in processing and production of all kind of food products. The main factors, which must be considered for enzyme assays, are temperature, pH, ionic strength and the proper concentrations of the essential components like substrates and enzymes. Standardization of these parameters would be desirable, but the diversity of the features of different enzymes prevents unification of assay conditions. The aim of this study was to evaluate the Viscozyme® L. enzyme kinetics in sunflower collets. Experiments were performed in a stirring batch system. The reaction conditions were T=50ºC, pH 5, ionic strength 0.1 M and the reaction time 1 hour. A Viscozyme® L. concentration of 0.06% v/v was used.The enzymatic reaction rate was adjusted by theMichaelis-Menten equation (p=0.0004).K_m and V_{max} estimated for this model were 0.1249 g/mL y 0.5274 mg/mL*min, respectively (p=0.0004).The K_m and V_{max} parameters were compared with those obtained from the linear equationsof Lineweaver-Burk, Hanes-Wolff and Eadie-Hofstee, obtaining minor deviations with the Hanes-Wolff equation.

Keywords: Enzyme kinetics, sunflower collets, Viscozyme® L.,Michaelis-Menten.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas pueden modificar y mejorar las propiedades funcionales, nutricionales y organolépticas de ingredientes y productos y, por lo tanto, las enzimas han encontrado amplias aplicaciones en el procesamiento y la producción de todo tipo de productos alimenticios.

El proceso de recuperación de aceite de las semillas de girasol se realiza normalmente por prensado mecánico convencional o a través de prensas mecánicas, obteniéndose así la torta o expeller, que posee alrededor de un 15% de aceite para ser extraído posteriormente con solventes orgánicos, generalmente hexano (Danso-Boateng 2011). Aunque este proceso se caracteriza por la alta eficiencia de extracción y el bajo costo, el uso de solventes orgánicos volátiles a menudo resulta en contaminación ambiental, mientras que los problemas de seguridad, debido a la inflamabilidad de dichos solventes, también son un tema de preocupación (Nikiforidis et al. 2009). Si bien a partir de los años 50 surgió la idea de emplear agua como solvente, su uso estuvo restringido por el

bajo rendimiento de aceite obtenido. La aplicación de enzimas en el proceso extractivo se ha convertido en la propuesta tecnológica destinada a reducir al mínimo el contenido de aceite de la materia prima (Ramadan et al. 2007; Rosenthal et al. 1996). El uso de diferentes enzimas como celulasa, hemicelulasas, pectinasas, amilasas y proteasas en granos oleaginosos ha sido reportado por varios autores (Aparna et al. 2002; Jiang et al. 2010; Man et al. 1996; Moreau et al. 2004; Sineiro et al. 1998; Zhang et al. 2006). La extracción acuosa-enzimática de aceite es, sin duda, una tecnología emergente en la extracción de grasas y aceites a nivel industrial, ya que ofrece ventajas en comparación con la extracción convencional, por ejemplo, la eliminación de consumo de solventes, lo cual podría disminuir los costos de inversión de los requerimientos energéticos. También permite la recuperación simultánea de aceite y proteínas de la mayoría de las oleaginosas, obteniendo productos de mejor calidad (Nyam et al. 2009).

El tipo de enzimas adheridas depende de la composición celular y de la estructura del material oleaginoso (Mat Yusoff et al. 2015). De acuerdo con Rosenthal et al. (2001), el uso de Alcalase 2.4L (una proteasa) incrementó el rendimiento de aceite en harina de soja tratada térmicamente, comparado con celulasa, hemicelulasa y pectinasas. Para colza, la pectina es el componente mayoritario en la pared celular, por lo tanto el uso de pectinasas aumentó el rendimiento de la extracción acuosa (Zhang et al. 2006).

Viscozyme® L. fue utilizada en varios granos como soja, semillas de melón, semillas enteras de sésamo, semillas de girasol enteras o molidas (0,75mm-1mm), harina de mostaza, entre otros; en todos los casos se han obtenidos mayores rendimientos que con la extracción acuosa simplemente (Mat Yusoff et al. 2015).

Si bien existen estudios sobre el uso de enzimas sobre muestras de girasol, aun no se han utilizado sobre *collets*, como reemplazo delaextracción con solventes luego del prensado.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la cinética enzimática de Viscozyme® L. sobre *collets* de girasol, utilizados como sustrato de la enzima, para su implementación en la extracción acuosa enzimática (AEE) de aceite.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima- sustrato

Se empleó como sustrato (s) de la enzima, c*ollets*de girasol (material poroso cilíndrico obtenido luego de la extracción por prensado) provistos por una empresa local. Los mismos fueron almacenados en envases de polietileno a 4ºC hasta su uso en los ensayos de hidrólisis. Las muestras fueron caracterizadas mediante un análisis proximal, según su contenido de humedad (método 1.121), contenido de aceite (método 1.122) (Paquot et al. 1992), proteínas (Nx6.25) (método Macro Kjeldhal) y fibras estructurales: fibra detergente neutra (FDN); fibra detergente ácida (FDA) y lignina (Van Soest et al. 1991)

La fibra detergente ácida (FDA), la fibra detergente neutra (FDN) y lignina fueron determinadas por el método secuencial, usando α-amilasa sin sulfito de sodio, de acuerdo al procedimiento descripto por Van Soest (1991) sistema batch (AnkomTeechnologyCorp, Fairpoint, NY, USA). La celulosa fue calculada como la diferencia entre FDA y lignina, mientras que hemicelulosa se calculó como la diferencia entre FDN y FDA.

Enzima

La enzima utilizada para los ensayos cinéticos fue un complejo multienzimático (VISCOZYME® L, Novozymes) producida por una cepa seleccionada de *Aspergillus Aculeatus.* Contiene una amplia gama de carbohidratasas (arabinasa, celulasa, beta-glucanasa, hemicelulasa y xilanasa) con una actividad enzimática de 112 FBGU g^{-1} (unidades betaglucanasa).Las condiciones la reacciónrecomendadas por el proveedor de pH y temperatura son3,3-5,8 y 45-55ºC, respectivamente.

Capacidad de absorción de agua

La capacidad de absorción de agua (CAb) se determinó según el método 88-04 propuesto por la AACC (1984). En primer lugar, se determinó la CAb aproximada. Para ello se pesaron 2g de muestra (b.s.), se adicionó agua destilada hasta la saturación, se centrifugó a 2000xg durante 10 min, para retirar el exceso de agua y pesar. Se calcularon los gramos de agua absorbidos en cada tubo para obtener un promedio. La CAb de la muestra se calculó de la siguiente manera:

$$CAb = \frac{promedio\ agua\ absorbida\ (g)}{peso\ muestra\ (g)} \qquad (1)$$

Determinación de la condición de saturación de la enzima

Los ensayos para definir la concentración de enzima a utilizar en los experimentos posteriores se llevaron a cabo en un sistema batch, agitado constantemente a 50ºC. El tiempo de reacción fue de 1 hora, de acuerdo a experiencias previas realizadas (Rodríguez et al. 2015). Para la incubación se utilizó buffer citrato con pH 5 y una fuerza iónica de 0,1M (Bisswanger 2014). Cumplido el tiempo preestablecido, se inactivó la enzima elevando la temperatura (95ºC por 2 minutos) y luego se centrifugó (a 5600 rpm) para separar el sólido del sobrenadante.

La fracción líquida contiene, además de los azúcares liberados por hidrólisis enzimática, otros componentes mayoritarios como aceite y proteínas. El aceite fue separado del sobrenadante con hexano, por decantación. Las proteínas fueron extraídas del líquido por precipitación con acetato de sodio saturado (AOAC, 1990).

Se determinó la condición de saturación de la enzima por el sustrato. Para ello se estableció en qué intervalo se cumple la proporcionalidad entre la Unidades Enzimáticas por mL (UE/mL), que representa la cantidad de enzima necesaria para liberar un µmol de producto a un tiempo definido (min), y la concentración de enzima [E].

La relación Sólido:Líquido, se determinó por los ensayos de capacidad de absorción de agua del sustrato. La relación Enzima:Sustrato se varió entre 1:3 y 1:200 (m/m) manteniendo los demás parámetros constantes.

Ensayo de actividad hidrolítica

Los experimentos de actividad hidrolítica se realizaron a las mismas condiciones de reacción utilizadas para determinar las condiciones de saturación de la enzima por el sustrato. La concentración de enzima utilizada fue determinada por los ensayos realizados previamente. Las concentraciones iniciales de sustrato variaron en un intervalo de 4,5 a 25% m/v.

Determinación de azúcares

La cantidad de azúcares reductores liberados en la fracción líquida fue considerada como producto de la hidrólisis del sustrato por acción de la enzima, para los diferentes ensayos. Los azúcares reductores se determinaron según el método de Nelson-Somogyi mediante espectrofotometría (λ= 540 nm).Se realizó una curva de calibrado con un estándar de glucosa.

Determinación de los parámetros cinéticos

El modelo de Michaelis-Menten (Ecuación 2)se aplicó para ajustar los datos experimentales de velocidad inicial a diferentes concentraciones de sustrato, usando regresión no lineal (SIGMAPLOT for Windows Version11, 2008).

$$v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \qquad v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \qquad v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \qquad v = \frac{V_{max} \times [S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_m}{[S]}} \qquad (2)$$

En esta ecuación v es la velocidadinicial de reacción (mg/mL*min), K_m representa la constante de Michaelis-Menten(g/mL), V_{max} es la velocidad máxima (mg/mL*min) y [S] indica la concentración de sustrato (g/mL).

El modelo de regresión de Michaelis-Menten fue comparado a través de sus parámetros de ajuste con los obtenidos por sus ecuaciones linealizadas de Lineweaver-Burk, HanesWolff y Eadie-Hofstee (**Tabla 1**).

Tabla 1: Ecuaciones linealizadas del modelo de Michaelis-Menten

Método gráfico	Ecuacioneslinealizadas
Lineweaver-Burk	$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}\right) + \frac{K_m}{V_{max}}\frac{1}{v}$ $= \left(\frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}\right) + \frac{K_m}{V_{max}}\frac{1}{v}$ $= \left(\frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}\right) + \frac{K_m}{V_{max}}$
Hanes-Wolff	$\frac{[S]}{v} = [S] \times \left(\frac{1}{V_{max}}\right) + \frac{K_m}{V_{max}}\frac{[S]}{v}$ $= [S] \times \left(\frac{1}{V_{max}}\right) + \frac{K_m}{V_{max}}$
Eadie-Hofstee	$v = V_{max} - K_m \times \left(\frac{v}{[S]}\right)_v$ $= V_{max} - K_m \times \left(\frac{v}{[S]}\right)$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición aproximada de los *collets* de girasol utilizados en los experimentos, expresada como porcentaje en base seca, se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Composición proximal y de fibras estructurales

Composición	% (b.s.)
Humedad	7,13±0,1
Aceite	20,83±0,08
Proteína (N x 6,25)	40,92±0,37
Celulosa	20,37±0,05
Hemicelulosa	11,64±0,45
Lignina	6,03±0,16

La selección de la relación Sólido:Líquido se estableció considerando la capacidad de absorción de agua y datos reportados en bibliografía que garanticen la movilidad de la enzima. La mínima relación estaría sujeta a la capacidad de absorción, que para los ensayos realizados fuede 3,00±0,46 g/g (gramos de agua absorbida/gramo de muestra). Latifet al.(2009) reportaron que una relación Sólido:Líquido de 1:10 (m/v)puede aumentar la viscosidad de la mezcla y valores considerablemente inferiores a ésta pueden evitar el movimiento de la enzima en el medio.Por lo tanto, se fijó la realización de los ensayos con esta última relación para garantizar una agitación adecuada y movilidad de la enzima.

La concentración de enzima en los experimentos estuvo condicionadapor el estadosaturante del sustrato; ya que si dejase de serlo, el aumento de actividad no sería proporcional y la velocidad no sería máxima(Copeland2002; Mat Yusoff et al. 2015; Jiang 2010). La **Figura 1** muestra la actividad de la enzima en Unidades Enzimáticas/mL (UE/mL) versus la concentración de enzima ([E] %v/v), en ella se puede observar que en el intervalo

de estudio se mantuvo la condición de concentraciones saturantes del sustrato, determinado por el comportamiento lineal de los datos experimentales (R^2=0,9963; p<0,0001). Algunos autores recomiendan el uso de enzima en concentraciones (Relación E:S) de alrededorde 0,1% a 3% m/m (Rosenthal*et. al.* 2001; Danso-Boateng 2011; Latif*et. al.* 2009).En base a estas mediciones se estableció una concentración de enzima de 0,06% v/v (equivalente a una relación E:S de 0.6% m/m) para realizar los ensayos de actividad hidrolíticaasegurando que el sustrato se encuentra en la condición de saturación con respecto a la enzima.

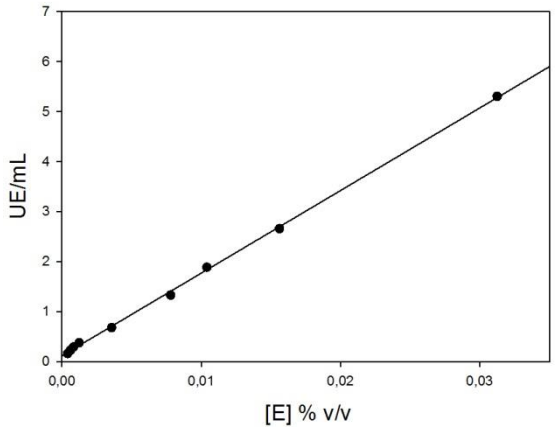


Figura 1: Actividad enzimática a diferentes concentraciones de enzima.

En la **Figura 2** se muestran los datos experimentales de velocidad inicial en función dela concentración de sustrato inicial y la correlación con la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 2). En dicha figura se observa que la reacción enzimática se ajusta al modelo (p=0,0004), es decir que el complejo multienzimático Viscozyme® L. sigue un comportamientoMichaeliano, como muchas de las enzimas utilizadas en alimentos. Este enfoque supone una aproximación del estado cuasi-estacionario donde la concentración del complejo Sustrato-Enzima (S-E) es constante en el tiempo y produce una relación hiperbólica independiente del tiempo entre ambas variables. En este momento la formación del complejo es exactamente igual a la velocidad de liberación de la enzima y los productos.

En la **Figura 3** se representan los datos experimentales y la linealización de la ecuación de Michaelis-Menten según los métodos de análisis de Lineweaver-Burk, Eadie-Hoftee y Hanes-Wolff (**Tabla 1**). La **Tabla 2** muestra los valores de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} para el modelo de Michaelis-Mentenobtenidos por regresión no lineal y por las transformaciones lineales.

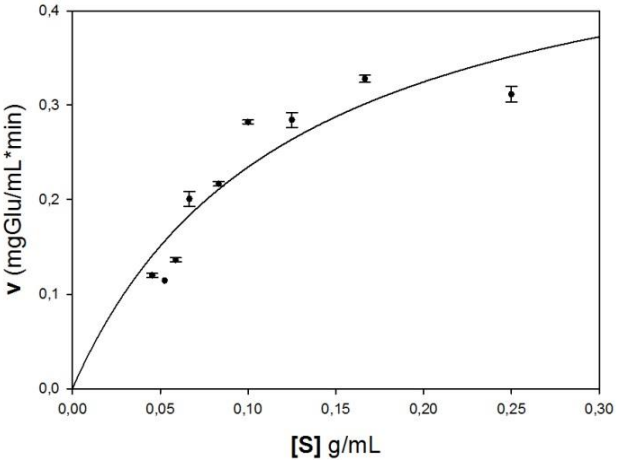


Figura 2: Datos experimentales de la velocidad de reacción enzimática a diferentes concentraciones de sustrato y predichos con la ecuación de Michaelis-Menten.

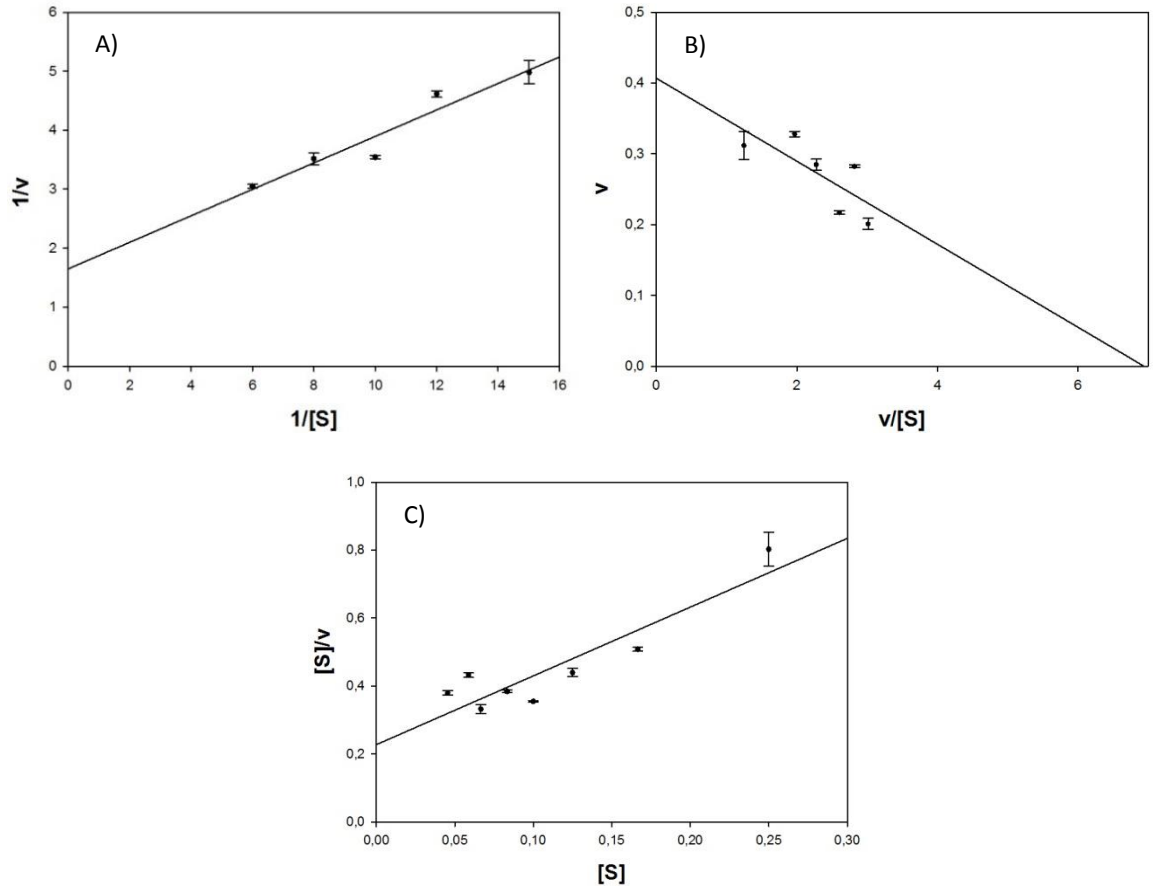


Figura 3. Representación de los datos experimentales y la linealización de la ecuación de Michaelis-Mentensegún A) Lineweaver-Burk, B) Eadie-Hoftee, C) Hanes-Wolff.

Tabla 2. Valores estimados de las constantes cinéticas K_m y V_{max} con los diferentes métodos de regresión.

	K_m[g/mL]	V_{max} [mg/mL min]
Michaelis-Menten	0,1249	0,5274
Lineweaver-Burk*	0,1361±0,0079	0,6058±0,055
Eadie-Hofstee	0,0586±0,0066	0,4070±0,085
Hanes-Wolff	0,1156±0,0469	0,5004±0,019

*considerando solo los valores experimentales con [S] más altos

El ajuste de los datos representados según el método gráfico de Lineweaver-Burk, utilizando todos los datos experimentales, estimóvalores de los parámetros K_m y V_{max}de 0,3997 g/mLy 1,1447 mg/mL*min, respectivamente (p=0,0091). Se observó que el mayor porcentaje de error, se obtiene a mayores valores de 1/V que corresponden a menores concentraciones de sustrato (0,045g/mL a 0,059 g/mL). Las desviaciones observadas a concentraciones de sustrato bajas pueden influir en la adaptación de la línea de regresión. Las contantes K_m y V_{max} estimadas considerando solo los valores experimentales con concentraciones de sustrato más altos (rango= 0,250-0,067 g/mL) resultan valores más fiables y representan un mejor ajuste (p=0,0004) (**Figura 3-A**). Sin embargo, con el método de análisis no lineal de la ecuación de M-M la parte de la curva con menores concentraciones de sustrato es la más significativa. Por lo tanto, la estimación de las constantes cinéticas no es totalmente adecuada, incluso cuando el error experimental resulta pequeño.

El método lineal de Eadie-Hofstee (**Figura 3-B**), si bien es fácilmente aplicable, requiere transformaciones de los ejes que distorsionan los datos y el ajuste es no significativo(p=0,0913). Los límites de error se extienden desde el centro hacia los extremos de menor y mayor concentraciones de sustrato. Por otro lado, las variables no están separadas, ya que ambos ejes están afectados por la concentración de sustrato.

Los datos experimentales presentan un buen ajuste lineal (p=0,0003)utilizando la transformación de Hanes-Wolff (**Figura 3-C**). Si bien una desventaja de este método es que la concentración de sustrato afecta a ambos ejes del gráfico, comparado con Michaelis-Menten, el error del método es menor a 0,7% tanto para K_m como para V_{max}.

CONCLUSIONES

Se estudió la actividad hidrolítica de Viscozyme® L. utilizando *collets* de girasol como sustrato, para su utilización en la extracción acuosa enzimática de aceite. Se analizó el efecto de la concentración de enzima y la relación Enzima:Sustrato, definiéndose una concentración de Viscozyme® L. de 0,06% v/v con una relación E:S de 1:174 (0,576% m/m).

Se observó que la cinética enzimática, definida como velocidad inicial de reacción de función de la concentración de sustrato, puede ser representada por el modelo de Michaelis-Menten. Se determinaron los parámetros del modelo por regresión no lineal obteniéndose K_m = 0,1249 g/mL y V_{max} = 0,5274 mg/mL min.Estos parámetros fueron comparados con los calculados a partir de linealizaciones de la ecuación deMichaelis-Menten, obteniéndose menores desvíos y un mejor ajuste con la ecuación de Hanes-Wolff. Si bien hay error de dispersión de los datos experimentales con el ajuste del modelo, la fiabilidad del método no lineal es mayor comparada con los métodos lineales, debido a que se obtiene directamente los valores de las contantes y el error sin distorsión en el cálculo.

BIBLIOGRAFÍA

Aparna, S, Khare, SK, & Gupta, MN. (2002). Enzyme-assisted aqueous extraction of peanut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 79*(3), 215-218

Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science, 1*(1-6), 41-55

Copeland, R. A. (2002). Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. 2da Edición. New York. Wiley-VCH.

Danso-Boateng, E. (2011). Effect of enzyme and heat pretreatment on sunflower oil recovery using aqueous and hexane extractions. *World Academy of Science, Engineering and Technology, 5*,8-24

Jiang, L, Hua, D, Wang, Z, & Xu, S. (2010). Aqueous enzymatic extraction of peanut oil and protein hydrolysates. *Food and Bioproducts Processing, 88*(2-3), 233-238

Latif, S, & Anwar, F. (2009). Effect of aqueous enzymatic processes on sunflower oil quality. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 86*(4), 393-400

Man, YC, Asbi, A, Azudin, M, & Wei, L. (1996). Aqueous enzymatic extraction of coconut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 73*(6), 683-686

Mat Yusoff, M, Gordon, MH, & Niranjan, K. (2015). Aqueous enzyme assisted oil extraction from oilseeds and emulsion de-emulsifying methods: A review. *Trends in Food Science & Technology, 41*(1), 60-82

Moreau, RA, Johnston, DB, Powell, MJ, & Hicks, KB. (2004). A Comparison of commercial enzymes for the aqueous enzymatic extraction of corn oil from corn germ. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 81*(11), 1071-1075

Nikiforidis, CV, & Kiosseoglou, V. (2009). Aqueous extraction of oil bodies from maize germ (Zea mays) and characterization of the resulting natural oil-in-water emulsion. *Journalof Agriculturaland Food Chemistry, 57*(12), 5591-5596

Nyam, KL, Tan, CP, Lai, OM, Long, K, & Man, YBC. (2009). Enzyme-assisted aqueous extraction of Kalahari melon seed oil: Optimization using response surface methodology. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 86*(12), 1235-1240

Novozymes Switzerland AG. Enzymatic oil extraction from olive pomace. Recuperado: http://www.theolivecentre.com/core/media/media.nl?id=1086&c=1040663&h=68399d014c5a2ea694ec&id=1086&_xt=.pdf&_xd=T&e=T.

Paquot, C, & Hautfenne, A. (1992). Section 1: Oleaginous seeds and fruits *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives 7 a ed. London: Blackwell Scientific* (pp. 13-16): International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).

Ramadan, MF, Sitohy, MZ, & Moersel, J-T. (2007). Solvent and enzyme-aided aqueous extraction of goldenberry (Physalis peruviana L.) pomace oil: impact of

processing on composition and quality of oil and meal. *European Food Research and Technology, 226*(6), 1445-1458.
Rodríguez, LM, Perez, E, Fernández, MB, & Crapiste, GH. (2015). Metodología Tagüchi para determinar condiciones óptimas de operación en extracción acuosa-enzimática aplicada a "collet" de girasol.Paper presented at the World Congress on Oils and Fat and 31st ISF Lectureship Series, Rosario, Argentina.
Rosenthal, A, Pyle, DL, & Niranjan, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology, 19*, 402-420
Rosenthal, A, Pyleb, DL, Niranjanb, K, Gilmourc, S, & Trincad, L. (2001). Combined effect of operational variables and enzyme activity on aqueous enzymatic extraction of oil and protein from soybean. *Enzyme and Microbial Technology, 28*, 499–509
SIGMAPLOT for Windows Version 11, Copyright_ 2008. Systat Software Inc.
Sineiro, J, Dominguez, H, Nuñez, MJ, & Lema, JM. (1998). Optimization of the enzymatic treatment during aqueous oil extraction from sunflower seeds. *Food Chemistry,61*(4), 467-474
Van Soest, P, Robertson, J, & Lewis, B. (1991). Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *Journal of Dairy Science, 74*(10), 3583-3597
Zhang, SB, Wang, Z, & Xu, SY. (2006). Optimization of the aqueous enzymatic extraction of rapeseed oil and protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society, 84*(1), 97-105

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen el financiamiento del trabajo al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET; a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, ANPCyT (PICT 2014-1649) y a la Universidad Nacional del Sur, UNS (PGI 24/M132).

Caracterización de polimorfismos de genes relacionados a calidad de la carne porcina.

Rodriguez V (1), Schlegeld D (1), Lagadari M (1) (2)

(1)Facultad de Ciencias de la Alimentación, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina. (2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).
Dirección de e-mail: rodriguezv@fcal.uner.edu.ar

RESUMEN

Dado el impulso que está experimentando la producción y el consumo de carne porcina, particularmente en la provincia de Entre Ríos, resulta de suma trascendencia elaborar estrategias que favorezcan una mejora en la calidad de estas carnes. Estrategias factibles de ser implementadas pero de escasa accesibilidad para pequeños y medianos productores locales permitirán brindar al mercado carnes jugosas, de buen color y con buena textura para satisfacer la demanda de carne fresca de los consumidores.En este contexto, el uso de técnicas de biología molecular permite la detección directa de mutaciones en genes con efectos perjudicialessobre la calidad de carne como los genes Halontano y Rendement Napole. En este trabajo se evalúa la condición genética de cerdos de pequeños y medianos establecimientos del noreste entrerriano mediante el uso de PCR-RFLP a partir de muestras de pelo. Los resultados evidencian una alta incidencia de los alelos perjudiciales encontrándose mayormente representados en genotipos heterocigotas. A partir de estos resultados se aconseja a los productores plantear cruzamientos entre animales que aporten los alelos normales de manera de lograr la eliminación de individuos portadores de los alelos desfavorables del plantel reproductivo y así lograr mejoras en la calidad de carne porcina de su descendencia.

Palabras Clave: calidad de carne, cerdo, marcadores moleculares, Halotano, Rendement Napole.

ABSTRACT

The improvement of pork meat quality has received much attention of the Argentinean meat industry in recent years, in particular that aiming at satisfying consumer demand and preferences. Thus, improving meat quality has implications for animal breeding programs. The identification of genes or genetic markers associated with pig meat quality could have a great economic impact on pork production. DNA marker technology is a highly efficient molecular biology technique that can be harnessed for the improvement of pork meat quality. Even within breeds, there is considerable genetic variation in important meat quality traits, which is partly caused by major genes like the Halotane or *ryanodine receptors 1 (RYR1)* and the *Rendement Napole (RN).* Using *PCR-RFLP,* in this study we performed a genetic characterization of animal hair samples obtained from small and medium producers at the northwest of Entre Ríos (Argentina). We performed PCR-RFLP analysis to determine the genetic and allelic frequencies of HAL and RN genes. Results show a high incidence of unfavorable alleles. Hence, using this latest technique we can provide consistently high quality data to the swine meat producers in order to increase the production quality by breeding genetically tested and selected animals.

Keywords: meat quality, pork, genetic markers, Halotane, Rendement Napole.

INTRODUCCIÓN

La actividad porcina es considerada de gran importancia en Argentina y actualmente presenta un escenario favorable con un gran potencial de crecimiento. En los últimos años se ha incrementado el número de productores y los muchos preexistentes fueron capaces de aumentar su escala en el 2015 (datos extraídos de www.elsitioporcino.com.ar). Los sistemas de producción de pequeña y mediana escala productiva (10 a 200 madres) son los que prevalecen en el país. Según datos brindados por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), la faena de cerdos en Argentina durante el año 2015 superó los 5 millones de cabezas. En cuanto a la producción, el SENASA da cuenta que el sector porcino en Argentina alcanzó las 450.000 toneladas de res con hueso, reflejando un incremento del 10 por ciento en relación al año 2014.

Dada la importancia del incremento de la producción y del consumo de la carne porcina en favor del desarrollo social y económico del país, este estudio busca contribuir a este sector acercando estrategias que favorezcan una mejora en la calidad de estas carnes.

La definición de calidad de carne depende de percepciones subjetivas del consumidor quien no solamente está exigiendo un alto contenido magro en las canales porcinas y en especial en las piezas más costosas como los lomos y perniles (jamones), sino también que el producto reúna una serie de características que permitan producir una calidad superior con el mejor rendimiento. Además, el concepto calidad está relacionado a componentes sensoriales, nutricionales, higiénicos, tecnológicos y genéticos como así también a factores del metabolismo celular que influyen en los atributos de la carne. Por lo tanto, ante las mayores exigencias del mercado, la industria de la carne de cerdo debe abarcar todos los puntos que constituyen la cadena de producción (Chan *et al*. 1997, Suman *et al*. 2007, Faustman *et al*. 1998, Chan *et al*. 1998, Vestergaard *et al*. 2000).

La elección de las líneas de cerdos a ser utilizadas en programas de cruzamiento es clave para aprovechar los efectos de la complementariedad y heterosis derivados de los polimorfismos genéticos de las distintas poblaciones. Las diferentes combinaciones permiten alternativas productivas dependiendo se priorice la cantidad o producción industrial o bien, la calidad de la carne dirigida a mercados diferenciados que cada vez presentan mayor demanda por los consumidores. Es así que la carga genética de los animales de granjas porcinas es un factor fundamental que condiciona la eficiencia técnica y económica, incide en las características cuantitativas como el contenido magro (canales) y en los caracteres físico-químicos y sensoriales de la carne, es decir en los atributos de la calidad. A través de herramientas propias de la genética y biología molecular, se han detectado genes que poseen efectos directos sobre el contenido magro y otros caracteres de calidad. Estos genes son utilizados como marcadores moleculares. Entre ellos se encuentra el gen de Halontano (Hal), gen ubicado en el cromosoma 6 porcino que codifica para el receptor de liberación de calcio en el musculo esquelético, también denominado RYR1 (Bastos et al, 2001). El gen Hal tiene efectos pleiotrópicos sobre diferentes caracteres de producción. La presencia de este gen fue ampliamente utilizada en Argentina por sus efectos deseables sobre el magro y la apariencia hipermusculada de los cerdos. Sin embrago, este gen es muy conocido también por las acciones perjudiciales que causa sobre los distintos caracteres de calidad de carne. Una mutación puntual en el nucleótido 1843 del gen de Hal donde se reemplaza una citosina por una timina (C1843T) produce carnes PSE (Fujii et al. 1991, Shen et al. 1992). Las carnes PSE (de sus siglas en ingles pale, soft, exudative) son carnes pálidas, blandas y exudativas consideradas de menor calidad y de menor valor para procesos industriales (Schilling et al. 2003, Cassens 1999). El gen Hal se encuentra relacionado con el incremento en el metabolismo causado por el estrés, las carnes tienen una tasa rápida de glucolisis post-mortem que da lugar además a una disminución muy rápida del pH (por debajo de 5.5-5.8) en la primera hora luego del sacrificio (Guardia et al. 2004). El descenso en el pH junto a la elevada temperatura muscular se traduce en la desnaturalización de proteínas que produce un aumento en la pérdida de agua y palidez. Además, otra consecuencia de carnes PSE es la condición bicolor de los jamones, músculos claros y oscuros, que los desvalorizan para su industrialización. El desencadenamiento de carnes PSE está afectado también por factores ambientales-temperatura, humedad, tiempo de transporte, ayuno, densidad, etc., cuando los animales son sometidos a factores estresantes antes de su sacrificio (Bastos et al. 2001, Marini et al. 2012). La mutación puntual en el gen Hal es causa del Síndrome de Estrés Porcino (SEP). Este síndrome fue descubierto en la década de los 70s donde la selección por caracteres observables era la que prevalecía. Se detectó que los resultados de esa selección iban unidos a una alta tasa de mortalidad por estrés (Calvo et al.1997, Otsu et al. 1992). Razas como Pietrain, Poland China y Landrace con características magras y con gran

desarrollo muscular, implicaban animales portadores del SEP. EL SEP se ha descrito como una enfermedad hereditaria autosómica recesiva (Christian 1972). Cuando los cerdos homocigotas recesivos (tt) son expuestos a situaciones de estrés, como situaciones traumáticas durante el manejo de los animales o previas a la faena, puede desencadenarse la muerte súbita del animal y la generación de carnes PSE (Harrison 1981).A pesar de presentar una disminución de la grasa dorsal y mayor porcentaje de carne magra, los animales heterocigotas (Ct) también producen carnes de menor calidad. La baja capacidad de retención de agua y la palidez de las carnes en cerdos portadores de la mutación, consecuencias de un bajo pH y elevada temperatura muscular, exteriorizan un fenotipo intermedio entre el homocigota para la mutación y el homocigota portador de alelos normales (Silveira et al. 2011). Se ha descrito también otro gen que tiene un efecto negativo en la calidad de la carne que se denomina Rendement Napole (RN) o efecto Hampshire. El gen RN (Naveau et al. 1986) se asocia con la acidez de la carne de cerdo y fue llamado Rendimiento Napole debido a que causa una disminución en el rendimiento tecnológico de la carne (Fernández & Monin 1994). Este gen que se ubica en el cromosoma 15 del cerdo, codifica para la subunidad gama de la PRKAG3, Proteína Quinasa activada por AMP (Milán et al. 1995). Se han descripto dos mutaciones en este gen: una sustitución de una arginina (R) por una glutamina (Q) en la posición número 200 de la secuencia de dicha proteína (R200Q) que se ha detectado en cerdos con algún componente de la raza Hampshire (Milan et al. 2000) y una sustitución de valina (V) por una isoleucina (I) generándose la mutación V199I encontrada en cerdos de diferentes razas (Ciobanu et al. 2001). Con estas dos mutaciones se presentantres alelos para el gen RN: RN^{-} (199V/200Q), rn+ (199V/200R) y rn* (199I/200R) y observan seis posibles genotipos RN-/RN-, RN-/rn+,RN-/rn*, rn+/rn+, rn+/rn* y rn*/rn*(Josell et al. 2003, Lindhal et al 2004).Los tres alelos resultantes de la combinación de las mutaciones V199I y R200Q en el locus RN afectan parámetros de calidad de carne importantes para su industrialización. El alelo dominante del gen RN- es responsable del menor valor tecnológico debido a una menor concentración proteica de la carne y a un mayor contenido de glucógeno en músculo (>70% que el contenido normal). Este alto potencial glucolítico resulta en un pH final muy bajo. La menor concentración proteica junto a la desnaturalización por pH resulta en carne con muy poca capacidad de retención de agua aunque el color y la terneza puedan ser las adecuadas (Ellis et al. 1997). Sin embargo, hembras el alelo rn* manifiestan un bajo contenido de glucógeno y cuando este último conforma genotipos que no acarrean RN-, es responsable de un alto pH final de la carne (Josell et al 2003, Lindhal et al 2004).

Debido a que la producción porcina de Argentina se desarrolla en un nuevo escenario de oportunidades y desafíos fundamentado en un mercado internocon una plena disposición a la carne de cerdo como carne sustituta y dado el creciente reconocimiento de la industria respecto a la importancia de la palatabilidad de la carne resulta invaluable implementar tácticas que favorezcan una mejora en la calidad de modo tal de aprovechar esta oportunidad. Se necesitará para esto, seguir informando sobre las características y bondades de la carne de cerdo y a su vez satisfacer la demanda de los consumidores con carnes de mejor calidad y mayor valor nutritivo. Surge así la necesidad de capacitar e informar a los pequeños y medianos productores tradicionales sobre estos efectos genéticos para poder obtener mejores carnes y mejores productos. Provincias como Córdoba, Santa Fe, Chaco y Tucumán presentan una tasa de incidencia de carnes PSE alrededor de un 25% (Marini et al. 2012) donde no solo está en juego el efecto genético sino también hay un gran aporte del manejo pre-faena (factor ambiental). Esta elevada incidencia del gen de Hal se debe en gran medida a que los productores desconocen muchas veces la presencia del gen y sus efectos negativos. Existen estrategias, factibles de ser implementadas pero de escasa accesibilidad para pequeños y medianos productores locales, que permitirán brindar al mercado carnes jugosas, de buen color y con buena textura para satisfacer la demanda de los consumidores.

En este contexto, el uso de técnicas de biología molecular facilitará la detección directa de genes con efectos perjudicialessobre la calidad de carne porcina como el gen Halontano (Hal o RYR1), el gen Rendement Napole (RN) contribuyendo así a evitar el deterioro en los componentes fisicoquímicos y organolépticos de la carne porcina y se favorecerá a nivel productivo una selección directa mediante la eliminación de los individuos portadores de los alelos desfavorables, evitando pérdidas económicas como por ejemplo las causadas por muertes súbitas resultantes del síndrome de hipertermia maligna o síndrome de estrés porcino. De esta manera los productores tendrán conocimiento de la constitución alélica de sus animales para ser tenida en cuanto al momento de planificar los cruzamientos. La aplicación de la selección asistida por marcadores moleculares contribuirá a disminuir la incidencia de alelos perjudiciales para llegar al mercado con carnes de mejor calidad.

En el presente trabajo se plantea como objetivo general implementar la biología molecular como herramienta de selección a través de la búsqueda de relaciones entre marcadores nucleicos y caracteres relacionados a la calidad de la carne porcina. Para alcanzar este objetivo, se plantea en primera instancia caracterizar poblaciones de cerdos de productores locales, en cuanto a la diversidad genética de genes candidatos, particularmente los genes Halontano y Rendement Napole asociados a características productivas y de calidad de producto porcinos mediante el uso de marcadores moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para determinar las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes RYR1 y PRKAG3 en este trabajo se utilizaron 150 cerdos de la región del noreste entrerriano producidos en diferentes criaderos.

Extracción de ADN

La obtención de ADN genómico se realizó a partir de bulbos de pelos extraídos de los cerdos y conservados a temperatura ambiente y oscuridad hasta el momento de su extracción en el laboratorio. La extracción se basó en el método del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) (Murray & Thompson, 1980 y Sambrook et al. 1994). Inicialmente se incubaron 9 bulbos en buffer TE, 10% SDS y proteninasa K (1mg/ml) por 15 minutos a 37°C. Luego, se adicionó NaCl 5M y CTAB (0,7M NaCl, 10% CTAB, Genbiotech) y se incubó a 65°C por 10 minutos. Posteriormente se transfirió la solución a un nuevo tubo evitando acarrear restos de pelo y se adicionó cloroformo: alcohol isoamílico en una proporción 24:1, se centrifugó a 13000 rpm por 12 minutos y la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo. Para precipitar el ADN se adicionó isopropanol frío, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13000 rpm 6 minutos. Finalmente, se realizaron dos lavados del *pellet* con de etanol 70%, se dejó secar a temperatura ambientey se resuspendió en 15 µl de *buffer* TE.

PCR-RFLP

La amplificación específica de un fragmento del gen Ryr1 y del gen RN que contiene las mutaciones se obtuvo mediante la técnica de PCR. Posteriormente se realizó una digestión con enzimas de restricción y se visualizan los resultados mediante electroforesis en gel de agarosa, diferenciándose claramente los genotipos para cada gen. Para amplificar los fragmentos de interés se llevaron cabo las reacciones de PCR en un volumen final de 25µl conteniendo 1mM de cada dNTP (Promega), 5X Buffer PCR (Promega), 0,5 µM de cada primer (Genbiotech), 1 U de Taq polimerasa (Promega) y 150 ng de ADN genómico. Los primers utilizados fueron Ryr1 5`-GTGCTGGATGTCCTGTGTTCCCT-3'R, 5'-CTGGTGACATAGTTGATGAGGTTTG-3'F (Brening & Brem 1992) y RN 5`-GGAACGATTCACCCTCAACT-3'R 5'-AGCTCTGCTTCTTGCTGTCC-3'F y 5`-GGAACGATTCACCCTCAACT-3', 5'-AGCTCTGCTTCTTGCTGTCC-3' (Ciobanu et al., 2001) para Halotano y RN respectivamente.Los pasos de PCR fueron llevados a cabo en un termociclador (LONGGENE MG96G) con el siguiente programa de ciclado: 5 minutos a 94ºC, 38 ciclos de 30 segundos a 94ºC., 30 segundos a temperatura de annelling y 30 segundos a 72ºC, y una extensión final de 10 minutos a 72ºC . Las temperaturas de annelling fueron para ambos casos de 52ºC. Posteriormente, una alícuota de 10 µl de los productos de PCR fueron digeridos con 1 U de la enzima de restricción correspondiente. Se utilizó la enzima HhaI (ThermoScientific) durante 16 horas a 37ºC para digerir el fragmento del gen de Hal y para RN las enzimas empleadas fueron Mbi 1 (ThermoScientific) para la mutación R200Q (16 h a 37°C) y HSp921 (Promega) para la mutación I199V durante 4h a 37°C.

Electroforesis

Los productos ya digeridos fueron sometidos a electroforesis (ENDURO Gel XL Labnet International Inc., USA) en gel de agarosa al 3% con 0,1 µg/ml de Bromuro de Etidio (Biopack), visualizados con Transiluminador UV de 302 nm Labnet International, Inc (USA), y fotografiados utilizando cono fotográfico Biodynamic (Argentina) y cámara Kodak Z981.

Cálculo de las frecuencias

Sobre el total de animales analizados de los diferentes establecimientos de la región de Salto Grande de la provincia de Entre Ríos, se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas. Las frecuencias alélicas se calcularon según la siguiente formula: frecuencia genotipo A + ½ frecuencia genotipo AB.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los alelos de RyR1 fueron identificados por el método de PCR-RFLP. Se pudieron distinguir los dos alelos para este gen: C representa el alelo normal donde se encuentra una citosina en la posición1843 y t representa el alelo mutado donde se encuentra una timina en la posición 1843. De 166 animales analizados, 65,06% fueron CC, 34,94 fueron Ct, y ninguno presentó el genotipo tt. El número y porcentaje de animales con diferentes genotipos del gen Hal se muestran en la **Tabla 1**. Estos datos concuerdan con los observados por el grupo de Marini para estudios realizados en otras provincias argentinas (Córdoba, Santa Fe, Chaco y Tucumán) (Marini et al. 2012). Si bien no se han encontrado genotipos homocigotas tt, la incidencia intermedia del genotipo heterocigota evidencia la aún alta presencia del alelo mutado.

Tabla 1. Frecuencias genotípicas y alélicas del gen Hal

Frecuencias genotípicas	N	%
CC	108	65,06
Ct	58	34,94
tt	0	0
Total	166	100
Frecuencias alélicas	N	%
C	138	82,64
T	29	17,36

N= Número y porcentaje (%) de animales

Teniendo en cuenta las pérdidas económicas asociadas a la mortalidad y menor calidad de la carne, la presencia del alelo t en el plantel reproductor debe ser evitado. La determinación del genotipo de los animales por el método de PCR-RFLP que se describe en este trabajo es conveniente ya que utiliza el pelo como fuente de ADN que permite un rápido *screening* del plantel sin someterlos a técnicas invasivas que generen estrés.

Para el gen PRKAG3 fueron identificadas tres variantes alélicas: RN^- (199V-200Q), rn+ (199V-200R) y rn* (199I-200R) y los cerdos estudiados muestran los siguientes genotipos: RN^-/RN^-, RN^-/rn+, RN^-/rn*, rn+/rn+, rn+/rn* o rn*/rn* (**Tabla 2**). No se observó supremacía del alelo RN^- como se encuentra descripto en la literatura (Josell et al, 2003, Lindahl et al 2004) sino en una proporción semejante al alelo rn* en la población en estudio. Sin embargo, al igual que estos autores, se encontró que el genotipo RN-/rn* fue el predominante, con 88 animales. No habiéndose encontrado trabajos publicados sobre la incidencia de estos alelos en Argentina, resulta de interés intensificar el estudio de este gen para tener un panorama completo de su comportamiento genotípico a lo largo del país.

Tabla 2. Frecuencias genotípicas y alélicas del gen RN

Frecuencias genotípicas	N	%
RN-/RN-	1	0,6
RN-/rn+	28	16,87
RN-/rn*	88	53,01
rn+/rn+	10	6,02
rn+/rn*	27	16,27
rn*/rn*	12	7,23
Total	166	100
Frecuencias alélicas	N	%
RN-	69	41,56
rn*	69,5	41,87
rn+	27,5	16,57

N= Número y porcentaje (%) de animales

CONCLUSIONES

Actualmente la producción de carne porcina debe abarcar todos los eslabones que constituyen la cadena de la carne, desde la concepción hasta el consumo. La mejor estrategia para mejorar la calidad de la carne porcina consiste en hacerlo desde la genética de manera de reducir la frecuencia de genes con efectos perjudiciales para la calidad. Los consumidores desean carne de cerdo sin exceso de grasa, con buen color, con buena capacidad de retención de agua, con buen sabor y buen aroma. El objetivo de este trabajo es poder llevar a cabo un programa de mejoramiento genético que contemple la vigilancia de la mutación del gen Ryr1, del gen de RN y muchos otros en los que también nos encontramos trabajando para ingresar en mercados diferenciados con carnes que atraigan a los consumidores.Los resultados obtenidos hasta el momento nos permiten proporcionar datos consistentes a los productores de carne de cerdo con el fin de aumentar la calidad de la producción por cruza de animales analizados y seleccionados genéticamente.

BIBLIOGRAFÍA

Bastos RG, Federizzi J, Deschamps JC, Cardellino RA, Dellagostin OA (2001). Efeito do Gene do Estresse Suíno sobre Características de Quantidade e Qualidade de Carcaça. *Rev Bras Zootec* 30(1):37-40.

Brenig B, Brem G (1992). Genomic organization and analysis of the 5' end of the porcine ryanodine receptor gene (ryr1). FEBS Lett. 24;298(2-3):277-9

Calvo JH, Osta R, Garcia-Muro E, Zaragoza P (1997). Síndrome de estrés porcino: aplicación y ventajas de la PCR para su diagnóstico. Med. Vet.14. 2: 110-113.

Cassens RG (1999). New Developments in guaranteeing the optimal sensory quality of meat. Ed. F.Toldrá y D.J. Troy. Fundación Vaquero, Spain. pp: 1-8

Chan WKM, Faustman C, Decker EA (1997). Oxymyoglobin oxidation as affected by oxidation products of phosphatidylcholine liposomes. J Food Sci 62: 709-712.

Chan WK, Faustman C, Velasquez-Pereira J, McDowell LR, Batra TR (1998). Effects of alpha-tocopherol on metmyoglobin formation and reduction in beef from cattle fed soybean or cottonseed meal diets. J Anim Sci 76: 1421-6.

Christian L L. (1972). A review of the role of genetics in animal estress susceptibility and meat quality. Proceedings of the quality symposium, Wisconsin University, Madison 91 -115.

Ciobanu D, Bastiaansen J, Malek M, Helm J, Wollard J, Plastow G, Rothschild M (2001). Evidence for new alleles for the protein kinase adenosine monophosphate-activated3-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality. Genetics 159: 1151-1162.

Ellis M, Mckeith, FK & Sutton, DS (1997). Pork Quality Summit. Ed. NPPC. Des Moines, Iowa.pp: 49-57.

Faustman C, Chan WK, Schaefer DM, Havens A (1998). Beef Color Update: The Role for Vitamin E. J Anim Sci 76:1019-26.
Fernández X, Monin G (1994). A major gene affecting pork quality: The RN gene. Meat Focus Int. 3(8):332-334.
Fujii J, Otsu K, Zorzato F, de Leon S, Khanna VK, Weiler JE, O'Brien PJ,MacLennan DH (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. Science. 26; 253(5018):448-51.
Guárdia MD, Estany J, Balasch S, Oliver MA, Gispert M (2004). Risk assessment of PSE condition due to pre-slaughter conditions and RYR1 gene in pigs. Meat Science; 67, pp:471-478.
Gunilla L, Enfalt A, Seth GV, Josell A, Hedebro-Velander I, Andersen HJ, Braunschweig M, Anderson L, Lundstrom K (2004). A second mutant allele (V199I) at the PRKAG3 (RN) locus -I.Effect on technological meat quality of pork loin. Meat Sci. 66: 609-619.
Harrison G (1981). The malignant hiperthermia porcine. Int Anesthesiol Clin17 (4): 19-47.
Josell A, Enfalt AN, Seth GV, Lindahl G, Velander IH, Andersson L, Lundstrom K (2003). The influence of RN genotype, including the new V199I allele, on the eating quality of pork loin. Meat Sci. 65: 1341-1351.
Lindahl G, Enfält AC, von Seth G, Josell A, Hedebro-Velander I, Andersen HJ, Braunschweig M, Andersson L, Lundström K (2004). A second mutant allele (V199I) at the PRKAG3 (RN) locus- I. Effect on technological meat quality of pork loin. Meat Sci. 66(3):609-19
Marini SJ,Vanzetti, L S; Borelli V,Villareal A, Denegri, G, Cottura, G, Panichelli D, Silva P, Campagna, D, Brunori J, Spiner N, Franco R (2012). RYR1 gene variability and effect on meat pH in Argentinean hybrids swines. InVet Vol. 14 Nº 1.
Milan D, Le Roy P, Woloszin N, Caritez JC, Elsen JM, Sellier P, Gellin J (1995) The RN locus for meat quality maps to pig chromosome 15. Genet. Sel. Evol. 27:195-199.
Milan D, Jeon JT, Looft C, Amarger V, Robic A, Thelander M, Rogel-Gaillard C, Paul S, Lannuccelli N, Rask L, Ronne H, Lundstrom K, Reinsch N, Gellin J, Kalm E, Leroy P, Chardon P, Andersson L (2000). A mutation in PRKAG3 associated with excess glycogen content in pig skeletal muscle. Science 288:1248-1251.
Naveau J (1986). Contribution á l'étude du determinisme genetique de la qualité de la viande porcine. Heritabilité du rendement technologique Napole. J. Rech. Porcine en France. 18: 265-276.
Otsu K, Phillips MS, Khanna VK, Leon S, Mac Lennan, DH (1992). Refinement of diagnostic assays for a probable causal mutation of porcine and human malignant hyperthermia. Genomics13: 835.
Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1994). Molecular Cloning: A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor. 3v.
Schilling MW, Mink LE, Gochenour PS, Marriott NG, Alvarado CZ (2003). Utilization of pork collagen for functionality improvement of boneless cured ham manufactured from pale, soft, and exudative pork. Meat Sci. 65(1):547-53.
Shen H, Lahucky R, Kovac L, O' Brien PJ (1992). Comparison of Hal gene status with PNMR-determined muscle metabolites and with Ca sequestration activity of anoxia -challenged muscle from pigs homozygous and heterozigous for porcine stress syndrome. Pig News and Information. 13: 105-109.
Silveira ACP, Freitas ASM, Cesar RC, Antunes EC, Guimaraes DFA, Batista D, Torido LC (2011). Influence of the halotane gene (HAL) on pork quality in two comercial crossbreeds. Genetics and Molecular Research 10 (3): 1479-1489FA
Suman SP, Faustman C, Stamer SL, Liebler DC (2007). Proteomics of lipid oxidation-induced oxidation of porcine and bovine oxymyoglobins. Proteomics 7: 628-640.
Vestergaard M, Oksberg N, Henckel P (2000). Influence of feeding intensity, grazing and finishing feeding on muscle fibre characteristics and meat colour of semitendinosus, longissimus dorsi and supraspinatus muscles of young bulls. Meat Science 54: 177-185.

Hydrolysis reaction using Ricinus communis powder as biocatalyst: lipase activity optimization.

Salaberría F. (1), Palla C. (1), Carrín M.E. (1)

(1) PLAPIQUI (UNS-CONICET), DIQ, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.
Dirección de e-mail: fsalaberria@plapiqui.edu.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad lipásica en polvos de semillas de ricino. El medio de reacción empleado contiene 5 mL de buffer de acetato (pH 4.4) y 5 mL de una emulsión de aceite de girasol alto oleico (sustrato) y agua. Se empleó un diseño factorial de 3 niveles con un total de 24 experimentos con 4 réplicas en el punto central. Los parámetros elegidos y sus rangos fueron: cantidad de aceite (0.5-1 g Aceite/g Agua en emulsión) y cantidad de polvo enzimático (0.005-0.05 g). La temperatura de reacción fue 37ºC y el tiempo de reacción 1.5 h. La actividad enzimática (variable de respuesta) fue determinada mediante GC, previa extracción de los subproductos con solventes. Si bien la superficie de respuesta se adapta bien a los datos numéricos (falta de ajuste no fue significativa), el modelo cuadrático obtenido no fue significativo (p=0.17). Esto significa que si bien las actividades obtenidas fueron mayores o iguales al punto de actividad máxima de un diseño experimental previo, no se pudieron encontrar diferencias entre las mismas dentro de la zona estudiada. Al mismo tiempo, comprueba que la enzima puede funcionar eficientemente dentro de la misma.

Palabras clave: lipasa de ricino, hidrólisis, superficie de respuesta, optimización, actividad lipásica.

ABSTRACT

The aim of this work was to study lipase activity in castor bean powders. Reaction medium contained 5 mL of acetate buffer (pH 4.4) and 5 ml of an emulsion of high oleic sunflower oil and water. A factorial design with 3 levels and a total of 24 experiments with 4 replicates at the central point was used. The chosen parameters and their respective ranges were: amount of oil (0.5-1 g oil / g Water in emulsion) and enzyme (0.005 to 0.05 g). The reaction temperature was 37°C and reaction time 1.5 h. Enzymatic activity (response variable) was determined by GC after solvent extraction of the by-products. Results were analyzed using Design-Expert 7.0.0 software. Although the response surface adjusted well to numerical data (lack of fit was not significant), the quadratic model obtained was not significant (p = 0.17). This means that although the activities obtained were higher than or equal to the point of maximum activity of a previous experimental design, differences between them could not be found within the studied area. At the same time, this means that the enzyme can operate efficiently within these parameter's ranges.

Keywords: castor bean lipase, hydrolysis, response surface, optimization, lipase activity.

INTRODUCCIÓN

Las lipasas son un grupo importante de biocatalizadores que actúan naturalmente en la hidrólisis de los triglicéridos, liberando los ácidos grasos y el glicerol (en caso que se produzca la reacción completa). La importancia y aplicación de las lipasas en reacciones de síntesis ha aumentado notablemente en la última década, por lo que las mismas se han convertido en un recurso muy útil para la modificación de grasas y aceites, y para la obtención de subproductos de la industria oleoquímica. Las lipasas han sido purificadas y caracterizadas desde diversas fuentes (animal, microbiana y plantas), siendo las lipasas microbianas las más estudiadas y aplicadas en trabajos de investigación hasta el momento. Sin embargo, actualmente existe un interés creciente en las lipasas obtenidas de plantas, debido a que serían económicas y muy versátiles. Las lipasas producidas a partir de plantas se presentan con ciertas ventajas respecto a las animales y las microbianas debido a su disponibilidad y fácil obtención. Sin embargo, existen muy pocas lipasas vegetales disponibles a nivel comercial. Más

aún, no existe producción comercial nacional de lipasas de ningún tipo. En la bibliografía científica internacional se encuentran numerosos trabajos de obtención de sustratos con actividad lipásica a partir de distintas plantas o frutos, como de papaya, ananá (Mukherjee et al. 1996, 1998), E. characias (Caro et al. 2000), arroz (Prabhu et al. 1999) y semillas de laurel (Isbilir et al. 2008). Lipasas obtenidas desde latex y semillas de plantas oleaginosas han sido utilizadas en biotransformaciones de aceites y grasas (Villeneuve 2003, Barros et al. 2010). En algunos casos, se ha reportado que la actividad lipásica estaría ausente en semillas sin germinar (o inactivas) y la misma aumentaría rápidamente cuando comienza la germinación (Villeneuve 2003, Eastmond 2004, Barros et al. 2010, Gu et al. 2011). Sin embargo dicha actividad también ha sido encontrada en las semillas inactivas (Villeneuve 2003, Eastmond 2004, Barros et al. 2010, Avelar et al. 2013, Santos et al. 2013). Si bien se encuentran numerosas publicaciones reportando la utilización de lipasas vegetales, su aplicación en reacciones de biotransformación como la producción de ácidos grasos concentrados a partir de aceites vegetales, es aún escasa.

El objetivo este trabajo fue evaluar la actividad lipásica de polvos obtenidos a partir de semillas de ricino, caracterizando a la misma a través de reacciones de hidrólisis de aceite de girasol. Los resultados de un diseño experimental previo (Palla et al. 2016) realizado con las mismas semillas fueron considerados para definir los parámetros y rangos del nuevo diseño experimental planteado en el presente trabajo. En el primer diseño experimetal (DE_1) se evaluaron los efectos de tres parámetros (concentración de surfactante= 0-2.5%, aceite= 7-12% y polvo enzimático= 0.05-0.15 g) sobre la variable de respuesta R, actividad lipásica (mmol AGL / g aceite • h • g polvo enzimático, AGL: ácidos grasos libres). Los resultados obtenidos mostraron un incremento de R al emplear altas concentraciones de aceite y bajas concentraciones de enzima y surfactante. La R máxima obtenida fue 2219 mmol AGL / g aceite • h • g polvo enzimático en ausencia de surfactante, empleando el límite inferior de concentración de enzima y superior de aceite. Ningún máximo local fue encontrado dentro del área estudiada por lo que el objetivo específico del presente trabajo es ampliar el área de estudio para evaluar el comportamiento de R y la posible existencia de un máximo local.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Todos los polvos analizados fueron obtenidos a partir de semillas de ricino ornamental. Durante el periodo de estudio las semillas fueron almacenadas a 3ºC y en ausencia de luz.

Otros reactivos empleados fueron: mezcla de ácido palmítico y esteárico, pureza 49-54% y 40-51% respectivamente (Fluka), estándares (1,2,3-trihexadecenoil-G, 1,2,3-trioctadecenoil-G, 1,2,3-tridecanoilo-G, 1,3-ipalmitoil-rac-G, 1-monopalmitoil-rac-G, ácido octadecenoico, y tetradecano, pureza mayor a 98%) y N-metil -N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA, Fluka) proporcionados por Sigma-Aldrich (EE.UU.). El aceite de girasol alto oleico marca Ecoop se adquirió en un comercio local (Cooperativa Obrera Lda. De Consumo y Vivienda, Bahía Blanca, Argentina). Se empleó piridina marca J.T. Baker (Philipsburg, EE.UU.) y glicerol marca Anedra. Se utilizaron gases y solventes de grado analítico o cromatográfico.

Acondicionamiento de las semillas: en todos los casos se realizó una selección minuciosa de las semillas descartando aquellas que presentaron signos de deterioro. Las semillas fueron peladas manualmente y la cubierta de las semillas fue retirada.

Preparación de extracto de semilla desgrasada (ESD)

Las semillas peladas (23 g) fueron molidas con una licuadora de mano, en presencia de acetona helada (100 mL) y sobre un baño de hielo durante 5 minutos. La extracción del aceite para la obtención del ESD se realizó con acetona empleando una relación de 5 mL de solvente por cada 1 g de semilla molida (Santos et al. 2013). La mezcla se colocó a 2±1ºC con agitación constante durante 16 h, se filtró en un embudo Büchner con papel de filtro y se realizaron 4 lavados empleando un total de 100 mL de acetona helada adicional. EL material sólido obtenido se colocó de forma disgregada en un recipiente de vidrio de base amplia (destapado) y se mantuvo en heladera hasta el día siguiente con el objetivo de evaporar por completo el solvente (Santos et al. 2013). Luego, se utilizó un mortero para homogenizar el tamaño de partícula y se colocó el polvo dentro de un frasco color caramelo que fue conservado en el freezer hasta su uso.

Diseño experimental (DE_2)

Se empleó un diseño factorial de 3 niveles con un total de 24 reacciones de hidrólisis empleando 4 réplicas en el punto central. Los parámetros elegidos junto con sus respectivos rangos fueron: A, cantidad de aceite (0.5-1 g aceite/ g agua en emulsión) y B, cantidad de enzima (0.005-0.05 g ESD). La actividad enzimática (mmol FFA / g aceite • g ESD • h) fue elegida como variable de respuesta (R). Los resultados fueron analizados mediante el software Design-Expert 7.0.0.

Hidrólisis

Reacciones del DE_2. El medio de reacción empleado (Santos et al. 2013) contiene 5 mL de buffer de acetato (pH 4.4) y 5 mL de una emulsión de aceite de girasol alto oleico (sustrato) y agua. La proporción de aceite y agua dentro de la emulsión fue considerada dentro del diseño experimental al igual que la cantidad de ESD. El tiempo de reacción fue de 1.5 h y la temperatura 37ºC. Para finalizar la reacción, 5 mL de etanol fueron agregados al medio de reacción.

Para los blancos de reacción se siguió la misma metodología descripta en el párrafo anterior pero sin incorporar emulsión al medio de reacción. La emulsión fue agregada junto con el etanol una vez transcurrido el tiempo de reacción deseado. Este blanco al ser comparado con las reacciones que sí contienen emulsión, permite identificar qué proporción de los AGL son verdaderamente productos de hidrólisis del aceite incorporado en el sistema y no por otro tipo de compuestos o mecanismos.

Reacciones complementarias (RC). Se evaluó la actividad enzimática en medios de reacción con concentraciones de aceite mayores a las consideradas en el diseño experimental. Para ello se emplearon medios de reacción con relaciones 1:1 y 3:1 v/v aceite: buffer de acetato pH 4.4 (reacciones RC_1 y RC_2,respectivamente). El volumen de reacción total fue de 5 mL para mejorar las condiciones de mezclado y se utilizó 0.0137 g ESD en cada reacción (equivalente a la concentración de ESD del punto central en el DE_2). Antes de agregar el ESD, los reactivos se colocaron en el frasco de reacción y se incubaron a 37ºC con agitación vigorosa (sin utilizar homogenizador). Las reacciones se realizaron por triplicado (RC_1) y duplicado (RC_2).

Recuperación de productos de hidrólisis para su posterior análisis por GC

La extracción por/con solventes se realizó empleando el procedimiento del método oficial AOCS Ch 3-91 (2009) con modificaciones. Luego de la inactivación enzimática con etanol, el medio de reacción fue transvasado a un tubo de centrífuga. Se añadieron 10 ml de hexano y éter etílico (1:1 v/v) y se agitó vigorosamente por un minuto. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 3 minutos. La fase superior (lípidos) se recolectó en un frasco color caramelo con tapa a rosca. Este procedimiento se realizó dos veces por muestra. Finalmente, los productos recuperados se colocaron bajo una corriente de nitrógeno hasta alcanzar peso constante.

Cuantificación de AGL por GC

Los AGL producidos en la hidrólisis fueron cuantificados mediante GC (Pacheco et al. 2014) empleando un cromatógrafo 4890D (Agilent, Hewlett-Packard) equipado con un FID. Se utilizó una columna capilar metálica (Restek, Bellefonte, EE.UU. MXT-65TG, 30 m x 0.25 mm x 0.1 µm de espesor). El inyector se utilizó en modo split (relación 1:70) y se mantuvo a 360°C. La temperatura del detector fue constante e igual a 380°C. La temperatura del horno se mantuvo a 40°C durante 4 min, luego aumentó a 350°C (15°C / min) y finalmente alcanzó los 360°C (0,2°C/min). Se usó hidrógeno como gas carrier a una velocidad lineal de 33.6 cm/s. El método del estándar interno se utilizó para cuantificar los subproductos, siendo el tetradecano el compuesto de referencia para la cuantificación de AGL. La adquisición de datos e integración de picos se llevaron a cabo utilizando el programa HP 3398A GLC ChemStation.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Fig. 1** se presenta la superficie de respuesta obtenida. Si bien la misma se adapta correctamente a los datos numéricos (la falta de ajuste no fue significativa), el modelo cuadrático obtenido no fue significativo (**Tabla 2**). Esto significa que aunque los experimentos del DE_2 presentaron actividades enzimáticas elevadas, no se encontraron diferencias estadísticas entre las mismas dentro de la zona estudiada y por lo tanto no existe máximo local. A pesar de esto, los valores de actividad enzimática alcanzados en el DE_2 se encuentran entre 1448-3580 mmol FFA / g aceite • g ESD • h, presentando actividades mucho mayores a las alcanzadas en el DE_1 (24-1777 mmol FFA / g

aceite • g ESD • h) (Palla et al. 2016) en el cual solo el 10% de los experimentos superaron los 1000 mmol FFA / g aceite • g ESD • h.

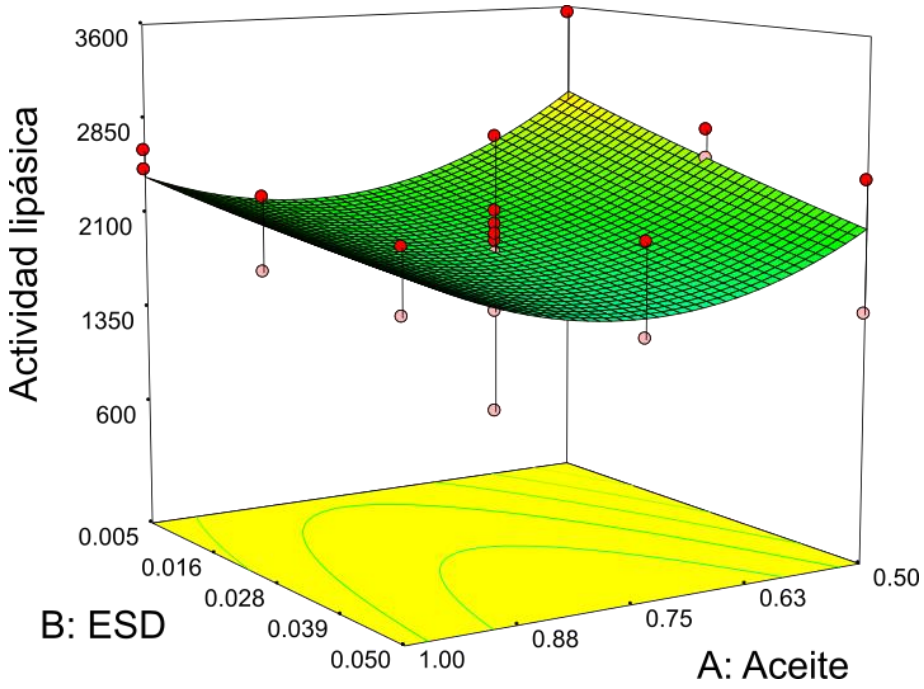


Figura 1. Superficie de respuesta de la actividad enzimática (mmol FFA / g aceite • g ESD • h) en función de la cantidad de aceite (g aceite/ g agua en emulsión) y polvo enzimático ESD (g).

Tabla 1. Análisis de varianza (ANOVA) del modelo.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor F	valor p
Modelo	2.418E+006	5	4.835E+005	1.76	0.1759
A-Aceite	1.687E+005	1	1.687E+005	0.61	0.4446
B-ESD	6.692E+005	1	6.692E+005	2.43	0.1375
AB	1.123E+005	1	1.123E+005	0.41	0.5316
A^2	1.261E+006	1	1.261E+006	4.58	0.0472
B^2	2990.22	1	2990.22	0.011	0.9182
Residual	4.681E+006	17	2.754E+005		
Falta de ajuste	2.368E+006	11	2.152E+005	0.56	0.8097
Error puro	2.314E+006	6	3.856E+005		

Finalmente, el diseño comprueba que el sistema reactivo puede funcionar eficientemente al emplear cantidades de ESD entre 0.005-0.05 g, utilizando emulsiones que contengan entre 0.5-1 g aceite/ g agua en emulsión (en ausencia de surfactante) para las condiciones estudiadas.

La no significancia del modelo matemático del DE_2 (y consecuente ausencia de máximo local) implica que no existen pruebas estadísticas suficientes para localizar regiones de la superficie que presenten pendiente negativa (actividad enzimática decreciente). Esto sugiere expandir la región experimental estudiada para evaluar ciertas modificaciones sobre el medio de reacción que podrían ser beneficiosas desde el punto de vista práctico. En primer lugar y en base a resultados previos, aumentar o disminuir la cantidad de enzima solo modificaría el tiempo de reacción necesario para alcanzar el grado de hidrólisis deseado y dado que el polvo enzimático es realmente barato y fácil de obtener, no se consideró ninguna mejora práctica en dicho parámetro. Por otro lado, al pensar en su potencial uso a nivel industrial, se podría concluir que una disminución en la proporción total de agua presente en el medio de reacción sería beneficiosa ya que la misma debe ser eliminada si se quieren recuperar los productos de reacción. Es por esto que se realizaron reacciones de hidrólisis complementarias. Si bien al comparar RC_1 y RC_2 no se encontraron diferencias significativas entre las mismas ($p=0.20$), se sospecha que la agitación empleada en RC_2 pudo no haber sido suficiente debido a la alta viscosidad del aceite. Por esta razón se eligió la relación definida en RC_1 para futuras investigaciones. Las RC también se compararon con el punto experimental del DE_2 que emplea la cantidad intermedia de ESD y máxima de aceite, equivalente a una relación aproximada de 1:3 aceite:buffer (5 mL buffer de acetato, 0.027g ESD y 5 mL de emulsión conteniendo 1g aceite/ g agua en emulsión). Al hacer las comparaciones entre el punto perteneciente al DE_2 (2212±393 mmol FFA / g aceite • g ESD • h) contra RC_1 y RC_2 (2342±744 y 1404±266 mmol FFA / g aceite • g ESD • h) no se encontraron diferencias significativas ($p>0.8$ y $p>0.14$, respectivamente). Esto demuestra que proporciones de aceite de hasta 1:1 aceite:buffer (v/v) permiten alcanzar actividades enzimáticas cercanas a 2000 mmol FFA / g oil • g lipase • h (bajo las condiciones de reacción impuestas) obteniendo productos de reacción que presentan hasta 20% AGL (m/m) y empleando bajas concentraciones de polvo enzimático.

CONCLUSIONES

Si bien la superficie de respuesta se adapta bien a los datos numéricos (la falta de ajuste no fue significativa), el modelo cuadrático obtenido no fue significativo ($p=0.17$). Esto significa que aunque las actividades enzimáticas fueron mayores a las del diseño anterior, no se encontraron pendientes de crecimiento o decrecimiento de actividad dentro de la superficie así como tampoco se identificaron máximos o mínimos. Al mismo tiempo, el diseño muestra que el polvo enzimático de ricino puede funcionar eficientemente dentro de la región experimental estudiada. Finalmente, con reacciones complementarias se determinó que la lipasa de ricino puede alcanzar niveles satisfactorios de actividad empleando relaciones aceite:buffer de hasta 1:1 (v/v).

BIBLIOGRAFÍA

AOCS. 2009. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist´s Society, 4th edn. The American Oil Chemist's Society, Champaign.

Avelar MHM, Cassimiro DMJ, Santos KC, Domingues RCC, De Castro HF y Mendes A. 2013. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. Industrial Crops and Products, 44, 452–458.

Barros M, Fleuri LF y Macedo G. 2010. Seed lipases: sources, applications and properties - a review. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 27, 15–29.

Caro Y, Villeneuve P, Pina M, Reynes M and Graille J. Lipase activity and fatty acid typoselectivities of plant extracts in hydrolysis and interesterification. JAOCS 77(4):349-354 (2000).

Eastmond PJ. 2004. Cloning and characterization of the acid lipase from castor beans. The Journal of Biological Chemistry, 279, 45540–45545.

Isbilir SS, Ozcan HM y Yagar H. 2008. Some Biochemical Properties of Lipase from Bay Laurel (Laurus nobilis L.) Seeds. Journal of the American Oil Chemists' Society, 85, 227–233.

Mukherjee KD and Kiewitt I. Specificity of Carica papaya Latex as biocatalyst in the esterification of fatty acids with 1-butanol. J Agric Food Chem 44:1948-1952 (1996).

Mukherjee KD and Kiewitt I. Substrate specificity of lipases in protease preparations. J Agric Food Chem 46:2427-2432 (1998).
Pacheco C, Palla C, Crapiste GH y Carrín ME. 2014. Simultaneous Quantitation of FFA, MAG, DAG, and TAG in Enzymatically Modified Vegetable Oils and Fats. Food Anal. Methods. DOI 10.1007/s12161-014-9830-x
Palla C, Salaberría F y Carrín ME. 2016. Response surface modeling looking for maximal lipase activity from Ricinus communis powder in hydrolysis reactions. 14th Euro Fed Lipid Congress, Ghent, BELGIUM. Disponible en https://db.tt/7CdOscAA.
Prabhu A, Tambe S, Gandhi N, Sawant S y Joshi J. 1999. Rice bran lipase: extraction, activity, and stability. Biotechnology Progressrogress, 15, 1083–1089.
Santos KC, Cassimiro DMJ, Avelar MHM, Hirata DB, Castro HF, Fernández-Lafuente R y Mendes A. 2013. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. Industrial Crops and Products, 49, 462–470.
Villeneuve P. 2003. Plant lipases and their applications in oils and fats modification. European Journal of Lipid Science and Technology, 105, 308–317.

AGRADECIMIENTOS
Las autoras agradecen al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), y a la Universidad Nacional del Sur (UNS) en Argentina, por el financiamiento recibido para la realización de este trabajo.

Efecto de la concentración de proteína de soja nativa en la aplicación de ultrasonido de alta intensidad

Sullca Grimaldez L. (1), Martinez K.D. (1)

(1) Universidad de Buenos Aires, Fac. De Ciencias Exactas y Naturales, Int Guiraldez, Ciudad Universitaria, Capital Federal, Buenos Aires, Argentina.
Dirección de e-mail: karinamartinez@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

Los métodos de modificación proteica a nivel industrial se basan principalmente en el uso de calor, enzimas o agentes reductores logrando variadas propiedades funcionales que las hacen adecuadas para ser utilizadas en diversos alimentos. El uso de ultrasonido de alta intensidad (US) ha sido aplicado en diversas operaciones en el procesamiento de alimentos. Se aisló la proteína de soja. Se estudió la solubilidad; el comportamiento de flujo en viscosímetro, la distribución del tamaño de partícula y el potencial Zeta. Se estudió el punto gel mediante reometría dinámica y barridos de frecuencia caracterizando la viscoelasticidad del gel formado. Se trataron las muestras a una frecuencia de 20 Khz y una amplitud de 20%, durante 20 minutos.La solubilidad mostró un gran incremento. Sin embargo, la viscosidad no mostró cambios luego del US; coincidiendo con los resultados obtenidos en el estudio de distribución del tamaño de partículas. El potencial Zeta aumentó (en módulo) considerablemente en todas las muestras. La reducción en la capacidad de gelificación apreciada, estaría relacionada con una modificación estructural impartida por el US.

Palabras Clave: Proteínas de soja, ultrasonido de alta intensidad, nanotecnología.

ABSTRACT

Methods of industrial protein modification are mainly based on the use of heat, enzymes or reducing agents, achieving various functional properties that make them suitable for use in various foods. The use of high intensity ultrasound (HIUS) has been applied in various operations in food processing. Soy protein was isolated without thermal treatment in order to obtain native protein. The solubility, the flow behavior, the size distribution and zeta potential of particle were studied. The gel point and frequency sweeps were analyzed by dynamic rheometry. Samples at a frequency of 20 kHz and amplitude of 20%, were ultrasound treated for 20 minutes. The solubility showed a large increase after HIUS treatment. However, the viscosity did not show changes after HIUS; matching the results obtained in the study with particle size distribution. The zeta potential increased significantly in all samples. The reduction of capacity gelation would be related to a structural modification imparted by the HIUS treatment.

Keywords: Soy protein, high intensity ultrasound, nanotechnology

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de soja nativas si bien poseen muy buena solubilidad pueden no tener un comportamiento adecuado para formar estructuras coloidales en alimentos por lo cual, son sometidas a diferentes procesos de modificaciones de su estructura y funcionalidad para lograr características específicas. Los métodos de modificación a nivel industrial se basan en el uso de calor, enzimas o agentes reductores. De esta forma se logran variadas propiedades funcionales que las hacen adecuadas para ser utilizadas en diversos alimentos.

Las denominadas tecnologías emergentes, basadas en procesos físicos no térmicos, están demostrando ser promisorias para lograr la inactivación de microorganismos contaminantes y patógenos, reduciendo los cambios indeseables en los alimentos. Entre estas tecnologías se encuentran los campos eléctricos pulsantes, la alta presión hidrostática y los ultrasonidos de alta intensidad (US).

El uso de US ha sido aplicado en diversas operaciones en el procesamiento de alimentos. La disipación de la energía de las ondas sonoras puede causar calentamiento, modificación de la textura, destrucción de células y proteínas, aumento de los procesos disfuncionales y otros fenómenos.
La cavitación incluye la formación, crecimiento y colapso violento de pequeñas burbujas en el líquido por acción de las fluctuaciones de presión acústica. Esto produce los cambios moleculares a nivel físico, químico y biológico asociados a su aplicación (Lu et al. 2002).
Las aplicaciones en tecnologías de alimentos son muy numerosas (McClements 1995) e incluye entre otros la destrucción de microrganismos, inactivación de enzimas, mejora de procesos difusionalmente controlados, tiernizado de la carne, emulsificación y aumento de transferencia de masa en el secado.
Gordon et al., (2010) utilizó esta técnica para el control del tamaño y morfología de las partículas de proteínas del suero de leche (WPI) en combinación con diferentes tiempos de tratamiento, temperatura y concentración proteica. Se encontró una reducción en el tamaño de partícula de WPI al 7,5%p/p con el tiempo de aplicación de US, viéndose que esta disminución fue más marcada en los dos primeros minutos de tratamiento.
En el estudio del tratamiento combinado de ultrasonido y temperatura encontraron que para una temperatura de 85-93°C, a la concentración más baja (7,5%p/p), el tamaño de partícula se vio reducido; cuando la concentración fue de 9%p/p no se observaron cambios y al tratarse la muestra más concentrada (12%p/p), se observó un fuerte incremento en el tamaño de partícula, en comparación con la muestra no tratada. Es así que el resultado obtenido para el caso de WPI 7,5%p/p sugirió que el efecto del ultrasonido fue predominante sobre el de la agregación por temperatura que se vio prevalecer en el caso de la muestra al 12%p/p. Para todos estos casos se obtuvieron distribuciones de tamaño polidispersas con un rango muy amplio para el caso de WPI 12%p/p, que se corrobora con la microscopia confocal donde se observa una gran polidispersidad.
Jambrak et al. (2009) han encontrado que el ultrasonido redujo el tamaño de las partículas de las soluciones de un aislado de soja comercial, con una sonda de ultrasonidos (20 kHz) a 15 y 30 minutos.
Gülseren et al. (2007) reportaron cambios estructurales y funcionales en seroalbumina bovina (BSA) por la aplicación de US. Ellos encontraron que la aplicación de ultrasonido de alta intensidad en muestras de BSA causó cambios estructurales que podrían alterar su funcionalidad. Estas proteínas presentaron un aumento en su actividad interfacial al ser sometidas a ultrasonido en comparación con la proteína nativa. La aceleración del aumento de la presión superficial en la fase inicial del proceso de adsorción se hizo más pronunciado a medida que aumentó el tiempo de sonicación, por ejemplo, después de 100 segundos, la presión superficial fue de 3,2; 7,7; 14,2 y 17,1 mN / m para la proteína nativa, 15, 30 y 45 min de tratamiento con ultrasonidos, respectivamente. Esto sugirió que la aplicación de ultrasonido provoca una adsorción más rápida a la interface aire-agua. También presentaron un aumento de la hidrofobicidad y carga superficial tras la aplicación del tratamiento. Se observó una disminución en la cantidad de grupos sulfhidrilos libres después de 90 minutos de sonicación. El aumento del tamaño de partícula y la disminución de grupos sulfhidrilos libres fueron atribuidos a la formación de agregados proteicos. La magnitud de estos cambios pueden potencialmente ser controlados con el tiempo de aplicación del ultrasonido.El objetivo de presente trabajo fue caracterizar el efecto de la concentración de proteína de soja nativa tras la aplicación de ultrasonido de alta intensidad, con el fin de promover alteraciones proteicas estructurales que llevarían a la mejora de propiedades funcionales (solubilidad, propiedades de flujo, reologia dinámica).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron en el laboratorio aislado proteico de soja nativo (APS) a partir de harina desgrasada de soja (proporcionada por Sanbra S.A., Brazil). Se caracterizó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) para la verificación de su estado estructural.
Las soluciones de APS se prepararon al 2, 4, 6% p/p con agua destilada.

Tratamiento con ultrasonidos de alta intensidad

Se sonicaron las muestras utilizando un procesador ultrasónico Vibra Cell Sonics, modelo VCX 750 (Sonics & Materials INC., Newtown, Estados Unidos) a una frecuencia de 20 Khz y una amplitud de 20%, durante 20 minutos continuos.

Estudio de la solubilidad

Para todos los tratamientos, se llevó la solución proteica al 2% p/p, en agua destilada, se centrifugó por 30 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante con la fracción soluble se liofilizó en un equipo Stokes por 48 hs., se pesó y se calculó la solubilidad según ecuación 1:

$$\%S = \frac{gdesolidossolubles}{gdesolidostotales} x\ 100 \quad (1)$$

Determinación de la viscosidad de las soluciones

Se estudió el comportamiento de flujo de soluciones al 2, 4 y 6%, con un viscosímetro Brookfield LTV con cono y plato a temperatura ambiente (25°C), en el rango de velocidades de 90 – 150 RPM. Se consideró el esfuerzo de corte como promedio de los valores de ascenso y descenso a cada velocidad de deformación. Todas las mediciones se hicieron por duplicado para cada solución proteica.

Determinación del potencial zeta (ζ)

El potencial zeta de la proteína fue determinada usando el Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Worcestershire Inglaterra). El APS (25°C) a diferentes concentraciones (2, 4, 6%) y tratamientos se colocó en celdas capilares de policarbonato de 0,75 ml de volumen. Las muestras fueron previamente filtradas con filtros de 0,45 y 0,22 µm. Los resultados se informaron como promedio y desviación estándar de al menos cinco mediciones.

Distribución del tamaño de partícula: Dispersión dinámica de luz

Los ensayos de dispersión dinámica de la luz se llevaron a cabo en un equipo de dispersión dinámica de luz (Zetasizer Nano-Zs, Malvern instruments, Worcestershire, Inglaterra) provisto con un láser He – Ne (633 nm) y un correlacionador digital, modelo ZEN·3600, en el rango de 0,6 nm a 6 µm. Las muestras se utilizaron luego de ser filtradas con filtro de 0,45 y 0,22 µm y sin filtrar.

Las mediciones para las soluciones de APS se realizaron a 25ºC. Las muestras se colocaron en cubetas descartables de poliestireno de 1 cm de arista dispuestas en el equipo. Las mediciones de tamaño de partículas se informan como el promedio y la desviación estándar de al menos cinco mediciones.

Reometría dinámica

Viscoelasticidad dinámica

Se colocó la muestra en el sistema de medición, el cual se termostatizó a la temperatura inicial de calentamiento (25ºC). El calentamiento se efectuó a una velocidad de 10ºC/min hasta la temperatura deseada de 90ºC. Se mantuvo así durante 15 minutos y luego se hizo descender la temperatura con la misma rampa de velocidad hasta 25ºC.

Se registró la evolución del módulo elástico (G´), el viscoso (G´´), y la tangente del ángulo de desfase (tan □) utilizando una deformación de 0,01% y una frecuencia de 1 Hz. Estas condiciones se evaluaron previamente como la zona de viscoelasticidad lineal de los sistemas.

Las determinaciones se realizaron por duplicado siendo las diferencias menores al 10%.

Barrido de frecuencia

Los módulos G' y G'' fueron registrados en función de la frecuencia de oscilación, f, entre 0 - 5 Hz, con 0,01% de deformación, en condiciones de respuesta del rango viscoelástico lineal. A continuación, el G' en función de f, se obtiene mediante la ecuación 2:

$$\log G` = n \times \log f + K \quad (2)$$

Se analizaron los resultados por duplicado o triplicado, concluyendo efectos estudiados mediante Anova, Statgraphycs, 3.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de calorimetría demostraron que el APS presentó un pico endotérmico, el cual indica cualitativamente la presencia de una fracción nativa, por lo que se concluye que fue exitoso el proceso de extracción.

Solubilidad de APS

Se realizó al 2% en todos los casos como concentración de referencia. Previamente se analizó el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la solubilidad del APS. Los resultados obtenidos mostraron que el APS a temperatura ambiente aumentó su solubilidad desde 16% a 19% a las 24 horas de almacenamiento. A partir de dichos resultados se procedió a realizar todos los tratamientos posteriores con las muestras disueltas durante una semana de almacenamiento.

Es así como se determinó un incremento de la solubilidad por efecto de US desde 19± 0,47 ^{b} a 56 ± 5,66 ^{d} existiendo un considerable incremento del parámetro por efecto del tratamiento.

Determinación de la viscosidad de las soluciones

El comportamiento de las curvas de flujo de soluciones al 2, 4 y 6%, y sus respectivos tratamientos, en el rango de velocidades de 90 – 150 RPM permitió determinar el comportamiento Newtoniano en todas las muestras estudiadas, dada su relación lineal.

Así, los valores obtenidos para su análisis corresponden a la pendiente de la curva Shear Stress (D/Cm2) vs Shear Rate (1/sec), siendo su Viscosidad (cP).

La siguiente **Tabla 1** muestra el efecto de los tratamientos para todas las muestras de APS sobre la viscosidad a temperatura ambiente.

Igual superíndice indica pertenencia al mismo grupo estadístico en el resultado observado de la misma columna.

Tabla 1: Viscosidad (cP) de APS

Tratamientos	**Potencial Zeta (mV)**		
	2%	**4%**	**6%**
Ta	-17,1 ± 8,2 ^{a}	-12,5 ± 8,4 ^{a}	-15,5 ± 4,8 ^{ab}
US Ta	-23,9 ± 5,8 ^{ab}	-26,8 ± 6,0 ^{b}	-23 ± 5,5 ^{abc}

En principio se observó un incremento de la viscosidad conforme aumentó la concentración de APS como resultado esperado. Sin embargo, el efecto del US no mostró diferencias sobre la viscosidad a las distintas concentraciones utilizadas, por lo que no se relacionó con la solubilidad obtenida por efecto del tratamiento.

Esto podría deberse a que los agregados formados en las muestras al 2% no fueron del todo significativos como para apreciarse diferencias en el estudio de viscosidad por su concentración. Sin embargo, se puede concluir que el efecto de US no induce cambios en el comportamiento de flujo en ninguna concentración estudiada, aunque haya un leve incremento de la solubilidad.

Los cambios en la viscosidad durante un tratamiento; muchas veces se relacionan con el cambio en el tamaño molecular de la muestra. En el presente caso, el tratamiento puede dar lugar a un tipo diferente de uniones, lo que favorecería consecuentemente a alterar las propiedades funcionales.

Potencial Zeta (ζ)

La carga superficial de una proteína es debido a la ionización parcial de varios residuos de aminoácidos (Vanapalli y Coupland 2000). Típicamente el potencial Zeta de una proteína es positiva si hay mas aminoácidos presentes cargados positivamente que los aminoácidos cargados negativamente (Bouzid et al. 2008).

En la **Tabla 2** se observan los valores del potencial Zeta (ζ) del APS.

Tabla 2: Potencial Zeta (ζ) de APS, efecto del US

APS (%)	**Ta**	**US**
2	1,5±0,3 ^{a}	1,5±0,2 ^{a}
4	1,8±0,1 ^{a}	1,8±0,2 ^{a}
6	2,3±0,1 ^{a}	2,3±0,2 ^{a}

Podemos apreciar que todas las muestras examinadas arrojaron valores negativos, lo cual indica que las muestras contienen más aminoácidos de carga negativa que aminoácidos de carga positiva. Esto es correcto debido al pH natural de las mismas, dado que se encuentran por encima de su punto isoeléctrico. No se aprecian diferencias significativas, en general, con respecto a la concentración del APS sin tratar y tratados.

En cuanto al APS tratado con US se observa un incremento en módulo en comparación con el APS sin tratar. Es bien conocido que la fuerza electrostática juega un papel importante en la conducción de la proteína a la agregación (Milesi y Añón 2010).

El aumento del potencial Zeta en módulo se debe a la formación de agregados, es decir, que cuando se le aplica US podría incrementar la carga negativa superficial de la proteína, fortaleciendo las repulsiones electrostáticas entre las partículas. En los casos en donde no se observa cambios en tamaño de partícula promedio (como se verá en la siguiente sección), se puede concluir que el US provoca cambios superficiales en los agregados previos, induciendo a la exposición de residuos de carga negativa y aumentando en consecuencia su carga superficial, esto lleva a la mejora de la estabilidad de las dispersiones de proteínas.

Distribución del tamaño de partícula

Se realizó la distribución del tamaño de partícula del APS de todas las concentraciones mediante dispersión dinámica de luz.

En base a los resultados que brinda el software del equipo, se procedió a analizar el volumen %. Este es un indicador cuantitativo de la población por lo que va a describir el porcentaje representativo en cada caso y, aunque se encuentren otros tamaños, la porción mayoritaria es la que determinará esencialmente las propiedades funcionales.

Por tal motivo, decidimos analizar los efectos del tratamiento mediante la descripción del pico/s mayoritario/s en Vol. %

En la **Figura 1** se puede observar el promedio de 18 mediciones de las distribuciones del tamaño del diámetro de partícula (nm) en volumen % del APS para cada una de las concentraciones estudiadas y el efecto de US.

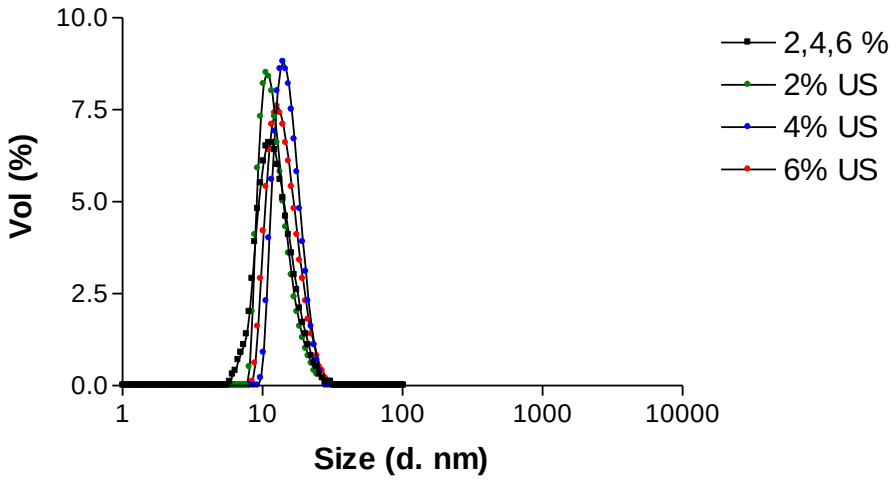


Figura 1: Distribución del tamaño de partícula en diámetro (nm).

Los resultados muestran un pico mayoritario alrededor de 10 nm en el diámetro promedio de la distribución del tamaño de partícula, para el APS sin tratamiento a toda concentración estudiada. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores de nuestro grupo de investigación en proteína de soja desnaturalizada (Morales et al. 2015).

Estudios previos demostraron que, el efecto del US está relacionado con la disminución del tamaño de partícula; mientras que la temperatura tiende a agregarla, aumentando el tamaño de dicho pico mayoritario. Sin embargo, en el caso del APS tratado con US no se observó ninguna diferencia a ninguna de las

concentraciones estudiadas; es decir, no se encontró efecto de US a temperatura ambiente para ninguna concentración, respecto al tamaño de partícula. No obstante, el incremento en la solubilidad (19 a 56% para el 2%p/p) y el potencial zeta (**Tabla 2**), mostrado anteriormente, indica una evidente modificación estructural por efecto del US, que no se traduce directamente en su distribución de tamaño. De la misma manera, el estudio de viscosidad, tampoco mostró cambios luego del tratamiento (**Tabla 1**) y siendo que tiene relación más directa con el tamaño de las partículas, se podría confirmar el nulo efecto del parámetro sobre el APS cuando se trata con US.

Reometria dinámica: Viscoelasticidad y gelificación

Se realizaron estudios de reología dinámica del APS, con una deformación de 0,01% y a una frecuencia fija de 1 Hz; se estudió la evolución del módulo de almacenamiento (G'), el de pérdida (G'') y el ángulo de desfase (tan □) con el tiempo. Estos experimentos se realizaron con un programa de temperatura, ascendiendo desde 25°C hasta 90°C, con una velocidad de 10°/min, manteniendo esta temperatura durante 15 min y luego descendiendo a la misma velocidad hasta 25°C.

En la **Figura 2** se muestra la evolución de las componentes en función del tiempo para el APS al 4% como ejemplo. Se señala el "punto gel" en este caso.

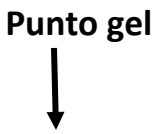


Figura 2: Evolución de componentes de almacenamiento o elástica (G'), de pérdida o viscosa (G''), tan □ y la rampa de temperatura, para APS al 4%.

En este caso, se aprecia una temperatura de gelificación "Tgel" en 3,5 min de 60°C aproximadamente y una posterior evolución de G' > G'' evidenciando la estructura gelificada a partir de ese momento.

En la **Tabla 3** se muestran los tiempos y temperaturas de gelificación, junto al valor de G´ para las muestras de APS en todas las concentraciones estudiadas.

Tabla 3: Punto de gelificación (tiempo, temperatura) y valor correspondiente de G' del APS al 2,4 y 6%. Tiempo gel ± 0,4 min; Temp.gel ±5ºC; G''± 5 Pa

Tratamiento	APS (%)	Tiempo gel (min)	Temp. gel (ºC)	G´ (Pa)
TA	2	---	---	---
	4	3,5	60	1
	6	4	70	1
US TA	2	---	---	---
	4	8	90	3
	6	4	65	1

En la **Tabla 3** se puede ver que las muestras de APS al 2% no llegaron al "punto gel", mostrando una evolución errática de las componentes, sin punto definido de cruce, lo que determina la no gelificación en las condiciones medidas. Es difícil que se encuentre el punto gel por la baja concentración proteica, tal como encontramos en trabajos anteriores con la misma proteína de soja pero desnaturalizada (Arzeni et al. 2012).

Se puede apreciar en general un efecto negativo del US para la gelificación. Si bien se comprobó un incremento de la solubilidad con el tratamiento, al parecer el US generaría cambios moleculares en las proteínas nativas aumentando la afinidad por el agua y al mismo tiempo disminuyendo la afinidad por sí misma, retrasando la gelificación a temperatura ambiente. Esto se evidencia en el caso del APS al 4%, (de 3,5 a 8 min para gelificar a una mayor temperatura), mientras que al 6% no se encontró efecto del tratamiento.

Barrido de frecuencia

Se estudió la variación de las componentes G' y G'' en el rango de frecuencia de 0,05 - 5 Hz a 25ºC con una deformación del 0,01% de las muestras de APS. En la Figura 3 se observa la evolución de las componentes en función de la frecuencia para una muestra como ejemplo.

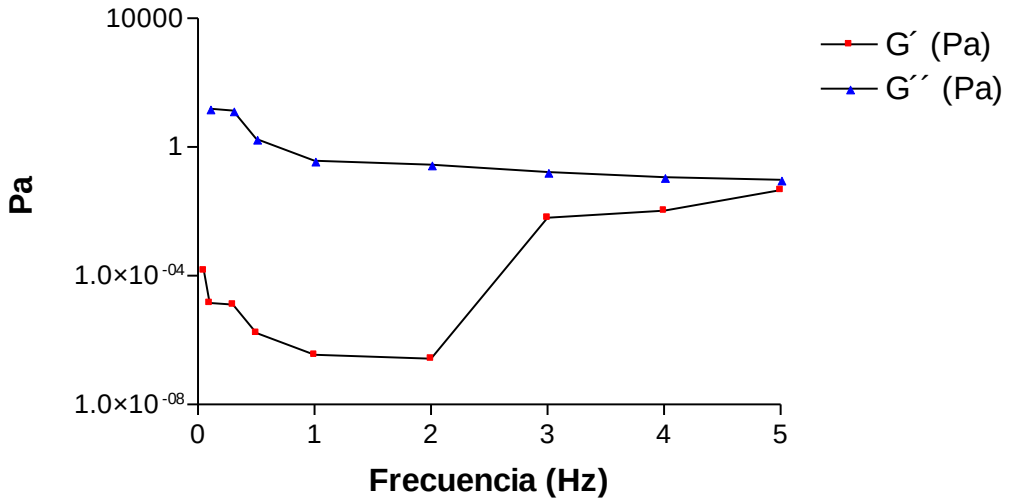


Figura 3: Evolución de componentes sólida (G') y viscosa (G''), con la frecuencia para APS tratado al 6%.

La dependencia de las componentes con la frecuencia y la relación entre ambas va a indicar la existencia y tipo de una red gelificada o solución.

En el presente trabajo se pudo observar que en todos los casos en donde existió el cruce G' y G'', la componente viscosa (G'') fue mayor que la componente sólida (G') en la mayoría del rango de frecuencia estudiada. Esto situación podría corresponder a un "entanglement networks systems" o "enriedo de redes" llamados

también "pseudogeles" Ravanagh et al. (1998). Son sistemas formados por interacciones simples entre cadenas poliméricas, más que uniones verdaderas entre las mismas. Se describe que, a bajas frecuencias, el flujo es similar al de líquidos de alta viscosidad.
Aunque estrictamente no se trate de un gel verdadero, se analizó la dependencia de G´ con la frecuencia mediante la ecuación 2 de la sección Materiales y Métodos, con el fin de diferenciar la viscoelasticidad de los pseudogeles formados.
El valor *n* de la ecuación nombrada nos informa acerca de la naturaleza viscoelástica de los biopolímeros alimentarios (Clark 1987).
Valores de *n* iguales a cero, indican posible existencia de geles covalentes, valores mayores a cero, indican la existencia de geles físicos, es decir, su unión se debe a interacción física sin la participación de uniones covalentes. (Clark and Ross-Murphy 1987).
En la **Tabla 4** se muestran los resultados del ajuste para cada caso en donde se encontró un "punto gel".

Tabla 4: Viscoelasticidad (*n*) de las muestras gelificadas a partir de la ecuación (2)
$n \pm 0{,}5\text{-}1$, $R^2 = 0{,}8$

Tratamiento	APS (%)	*n´*
TA	**4**	**4,0**
TA	**6**	**2,6**
US+TA	**4**	**1,24**
US+TA	**6**	**3,0**

A partir de los resultados obtenidos se puede observar que, el valor *n* de los pseudogeles es superior a cero, siendo más parecidos a las uniones de un gel físico que el de un gel covalente, definiendo el tipo de interacción intermolecular que prevalece en la formación de esas estructuras.
Se encuentró un efecto del US al 4%, el cual generó, geles con menor *n* (4 a 1,24); sin embargo, no hubo diferencia del tratamiento cuando la concentración de APS estudiada fue del 6%.
En conclusión y junto a lo expresado anteriormente, no se vio una significativa influencia del US en cuanto a las propiedades de gelificación respecta de las distintas concentraciones de APS, cuya estructura general podría definirse como pseudogel.

CONCLUSIONES

La estructura de la proteína aislada (APS) conservó fracciones nativas tras el fraccionamiento.
La solubilidad del APS al 2%p/p se incrementó con el tiempo de almacenamiento y con la aplicación del US a temperatura ambiente.
La viscosidad presentó relación con la concentración estudiada y con el tamaño de partícula promedio del APS, el cual no mostró cambios significativos con el tratamiento.
La carga superficial de los agregados, evidenció una modificación del tratamiento, generando estructuras de similar tamaño promedio pero de mayor exposición de residuos proteicos de carga negativa.
La aplicación de US, redujo la capacidad de gelificación de las muestras de APS, presentando una formación de pseudogel lo cual evidencia estructuras con interacciones muy débiles, incluso a altas concentraciones.
Las modificaciones moleculares causadas por el US, podrían alterar algunas propiedades funcionales en forma muy dirigida debido al sutil cambio generado, sin provocar probablemente mayores variaciones en las propiedades básicas buscadas de las proteínas nativas de soja (propiedades de hidratación, interfaciales, por ejemplo espumado y emulsificación). Para investigar las posibles aplicaciones habría que profundizar estos estudios en mayor detalle y en diferentes condiciones de temperatura, pH, fuerza iónica, etc.

BIBLIOGRAFÍA

Arzeni C, Martinez KD, Zema P, Arias A, Perez OE, Pilosof AMR. 2012. Comparative study of intensity ultraound effects on food proteins functionality. Journal of Food Engineering, 108, 463-472.
Bouzid H, Rabiller-Baurdy M, Paugam L, Rousseau F, Derriche Z & Bettahar NE. 2008. Impact of zeta potential and size of caseins as precursors of fouling deposition limiting and critical fluxes in spiral ultrafiltration of modified skim milks. Journal of Membrane Science, 314(1), 67-75.
Clark AH & Ross-Murphy SB. 1987. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. Adv. Polym. Sci., 83, 57-192.
Clark AH, ed. Blanshard JMVand Lillford PJ 1987. Food Structure and Behaviour, Academic Press, London, p. 13.
Gordon L & Pilosof AR. 2010. Application of high intensity ultrasounds to control the size of whey proteins particle. *Food Biophysics, 5,* 203-210.
Gülseren I, Güzey D, Bruce B & Weiss J. 2007. Structural and functional changes in ultrasonicated bovine serum albumin solutions, Ultrasonic sonochemistry, 14,173-183.
Jambrak AR.2009. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. Journal of Food Engineering, 93(2), 386-393.
Lu Y, Riyanto N, Weavers LK. 2002. Sonolysis of synthetic sediment particles: particle characteristics affecting particle dissolution and size reduction. Ultrasonics Sanochemistry, 9(4), 181-188.
McClements DJ .1995. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. Trends in Food Science and Technology, 6(9), 293-299.
Morales R. Martínez KD, Pizones Ruiz-Henestrosa VM. & Pilosof AM R. 2015. Modification of foaming properties of soy protein isolate by high ultrasound intensity: Particle size effect. Ultrasonics Sonochemistry, 26, 48-55.
Ravanagh G y Ross- Murphy S. 1998. Rheological characterization of polymer gels. Prog. Polym. Sci.,Vol. 23, 533-562.
Speroni F, Milesi V, Añón MC, 2010. Interactions between isoflavones and soybean proteins: Applications in soybean-protein–isolate production. *LWT - Food Science and Technology, vol 43, 8,* Pages 1265–1270.
Vanapalli S & Coupland JN. 2000. Characterization of food colloids by phase analysis light scattering. Food Hydrocolloids, 14(4), 315-317.

Efecto de ultrasonido de alta intensidad combinado con temperatura sobre proteína de soja nativa.

Sullca Grimaldez L. (1), Martinez K.D. (1)

(1) Universidad de Buenos Aires, Fac. De Ciencias Exactas y Naturales, Int Guiraldez, Ciudad Universitaria, Capital Federal, Buenos Aires, Argentina.
Dirección de e-mail: karinamartinez@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

La técnica de ultrasonido de alta intensidad (US), mediante la cavitación (formación, crecimiento y colapso violento de pequeñas burbujas en el líquido por acción de las fluctuaciones de presión acústica), produce cambios físicos, químicos y biológicos sobre las proteínas.Se trató la muestra proteica al 2%p/p a una frecuencia de 20 Khz y una amplitud de 20%, durante 20 minutos, (Vibra Cell Sonics, VCX 750), combinándose con temperaturas de 50 y 90°C. Se estudió la solubilidad, el comportamiento de flujo en viscosímetro, la distribución del tamaño de partícula y el potencial Zeta. Se estudió el punto gel mediante reometría dinámica y barridos de frecuencia caracterizando la viscoelasticidad del gel formado. Se concluye que los cambios producidos a 50°C no modifican el tamaño molecular, pero inducen alteraciones en la superficie permitiendo la gelificación a tan reducida concentración. La combinación con US produjo agregados que no gelifican, según mostró la distribución del tamaño de partícula y la viscosidad. El tratamiento a 90°C incrementó el tamaño molecular, sin capacidad de gelificación, y la combinación con US mostró aspectos competitivos en cuando al estudio de distribución del tamaño de partículas.

Palabras Clave: Proteínas de soja, ultrasonido de alta intensidad, nanotecnología.

ABSTRACT

The technique of high intensity ultrasound (HIUS) by cavitation (formation, growth and violent collapse of small bubbles in the liquid by the action of acoustic pressure fluctuations), produces physical, chemical and biological changes on proteins.The protein sample at 2% w/w was treated at 20 Khz; frequency amplitude of 20%, for 20 minutes (Vibra Cell Sonics VCX 750), combined with temperatures: 50 and 90°C.The solubility; the flow behavior, the size distribution particle and zeta potential were studied. The gel point was studied by dynamic rheometry and frequency sweeps to characterize the viscoelasticity of the gel formed. It was concluded that changes produced at 50°C do not alter the molecular size, but induce alterations in the surface allowing gelation at low concentration. HIUS-temperature combination produces aggregates without gel formation, as showed by the distribution of particle size and viscosity studies. The treatment at 90°C increased the molecular size without gelation capacity, and the combination with HIUS showed competitive aspect regarding the particle size distribution study.

Keywords: Soy protein, high intensity ultrasound, nanotechnology

INTRODUCCIÓN

Es de gran interés la utilización de la soja como fuente económica de proteínas de calidad, por ello el desarrollo de nuevos productos como concentrados y aislados de proteína de soja, productos texturizados, etc. (Fukushima 1991). En la fabricación de estos productos las proteínas de soja son sometidas a diferentes tratamientos a fin de conferirle las características funcionales deseadas, pudiendo reemplazar en forma parcial o total a las proteínas de origen animal.

El procesamiento de los alimentos (por ejemplo, tratamientos térmicos excesivos) puede ocasionar una disminución de la digestibilidad, destrucción de aminoácidos esenciales y formación de isopéptidos (que resultan tóxicos para el organismo).De

ahí que resulta tan importante el uso de aislados proteicos nativos, mínimamente procesados con temperaturas elevadas.

El estado nativo de una proteína globular no está claramente definido, pudiendo la misma existir en diversas formas de baja entropía, pero energéticamente equivalentes, estados cuasi–nativos, que no involucran cambios apreciables en la estructura. El tratamiento térmico en agua u otros solventes incrementa la movilidad, ocasionando la ruptura de uniones intra e inter moleculares que estabilizan la estructura nativa (Boye y col. 1997).

Las ventajas de las proteínas de soja son: 1) proporciona un buen equilibrio en la composición de aminoácidos, ya que todos los aminoácidos esenciales ácidos están contenidos, 2) contiene componentes fisiológicamente beneficiosos para reducir el colesterol y reducir el riesgo de la hiperlipidemia y enfermedades cardiovasculares, 3) tiene una excelente capacidad de procesamiento, tales como gelificación, emulsionante y capacidad de retener agua y aceite.

El ultrasonido de alta intensidad (US) ($\leq$ 0.1 MHz, 10 - 100 W cm^{-2}) es una eficiente tecnología en el procesado y preservación de alimentos. La aplicación de ultrasonido con o sin temperatura es cada vez más utilizado en la industria alimentaria, por ejemplo, para acelerar el transporte de masa en procesos de mezclado, secado, extracción de compuestos orgánicos de planta y semillas, desgasificación de alimentos líquidos, ablandamiento de la carne, para la inducción de reacciones de oxidación/reducción, para la extracción de enzimas y proteínas, para la inactivación microbiana y de enzimas, para la inducción de la nucleación en la cristalización y es también uno de los pocos métodos que permiten la preparación de emulsiones submicrónicas (Bhaskaracharya y col. 2009, Camino y col. 2009, Knorr y col. 2004). La mejora en la extracción de compuestos orgánicos se debe a una mayor penetración de solvente y soluto bajo la influencia de los US.

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación señalaron que la aplicación de US sobre proteína de soja nativa permitió la mejora de la capacidad de espumado, mientras que no afectó significativamente la estabilidad de las espumas (Morales et al. 2015). La aplicación de US a temperaturas entre 70 y 85°C presentó un efecto sinérgico, produciendo un aumento aún mayor de la capacidad de espumado. El aumento en la capacidad de espumado presentó una muy buena correlación con la disminución del tamaño de partícula promedio de las muestras del aislado de soja, por lo cual se concluye que dicha disminución producida por los tratamientos aplicados es el principal factor que determinó el aumento en la capacidad de espumado. Finalmente, la falta de variación en la estabilidad de las espumas del aislado de proteína de soja tratada se puede atribuir a la similitud encontrada en las propiedades reológicas interfaciales de las películas superficiales.

Los resultados de este trabajo señalaron la importancia de controlar el tamaño de partícula de las proteínas para mejorar sus propiedades de espumado. A este fin, los US de alta intensidad representaron una buena herramienta.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el efecto de la temperatura sobre la proteína de soja nativa en combinación con el tratamiento de ultrasonido de alta intensidad, con el fin de promover alteraciones proteicas estructurales que llevarían a la mejora de propiedades funcionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvo en el laboratorio aislado proteico de soja nativo (APS) a partir de harina desgrasada de soja proporcionada por Sanbra S.A., Brazil. Las soluciones de APS se prepararon al 2% p/p con agua destilada.

Tratamiento con ultrasonidos de alta intensidad

Se sonicaron las muestras utilizando un procesador ultrasónico Vibra Cell Sonics, modelo VCX 750 (Sonics & Materials INC., Newtown, Estados Unidos) a una frecuencia de 20 Khz y una amplitud de 20%, durante 20 minutos continuos a 50 y 90°C.

Estudio de la solubilidad

La solución proteica al 2% p/p, en agua destilada, fue centrifugada por 30 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante con la fracción soluble se liofilizó en un equipo Stokes por 48 hs., se pesó y se calculó la solubilidad según ecuación 1:

$$\%S = \frac{gdesolidossolubles}{gdesolidostotales} x\ 100 \quad (1)$$

Determinación de la viscosidad de las soluciones

Se estudió el comportamiento de flujo de soluciones al 2%p/p, con un viscosímetro Brookfield LTV con cono y plato a temperatura ambiente (25°C), en el rango de velocidades de 90 – 150 RPM Se consideró el esfuerzo de corte como promedio de los valores de ascenso y descenso a cada velocidad de deformación. Todas las mediciones se hicieron por duplicado para cada solución proteica.

Determinación del potencial zeta (ζ)

El potencial zeta de la proteína fue determinado usando el Zetasizer Nano-Zs (Malvern Instruments, Worcestershire Inglaterra). El APS, 2% (25°C) a diferentes combinaciones de tratamientos (US-temperatura) fue filtrado con filtros de 0,45 y 0,22 µm. Luego, se colocó en celdas capilares de policarbonato de 0,75 ml de volumen. Los resultados se informaron como promedio y desviación estándar de al menos cinco mediciones.

Distribución del tamaño de partícula: Dispersión dinámica de luz

Los ensayos de dispersión dinámica de la luz, se llevaron a cabo en un equipo de dispersión dinámica de luz (Zetasizer Nano-Zs, Malvern instruments, Worcestershire, Inglaterra) provisto con un láser He – Ne (633 nm) y un correlacionador digital, modelo ZEN·3600, en el rango de 0,6 nm a 6 µm. Las muestras se midieron luego de filtrar con filtro de 0,45 y 0,22 µm, y sin filtrar.

Las mediciones para las distintas soluciones de APS se realizaron a 25ºC. Las muestras se colocaron en cubetas descartables de poliestireno de 1 cm de arista dispuestas en el equipo. Las mediciones de tamaño de partículas se informan como el promedio y la desviación estándar de al menos cinco mediciones.

Reometría dinámica

Viscoelasticidad dinámica

Se colocó la muestra en el sistema de medición, el cual se termostatizó a la temperatura inicial de calentamiento (25ºC). El calentamiento se efectuó a una velocidad de 10ºC/min hasta la temperatura deseada de 90ºC. Se mantuvo así durante 15 minutos y luego se hizo descender la temperatura con la misma rampa de velocidad hasta 25ºC.

Se registró la evolución del módulo elástico, el viscoso, y tangente del ángulo de desfase utilizando una deformación de 0,01% y una frecuencia de 1 Hz. Estas condiciones se evaluaron previamente como la zona de viscoelasticidad lineal de los sistemas.

Las determinaciones se realizaron por duplicado siendo las diferencias menores al 10%.

Barrido de frecuencia

Los módulos G’ y G’’ fueron registrados en función de la frecuencia de oscilación, f, es de 0 - 5 Hz, con 0,01% de deformación, en condiciones de respuesta del rango viscoelástico lineal. A continuación, el G’ vs variación f, se obtiene mediante la ecuación 2:

$$\log G` = n \times \log f + K \quad (2)$$

Se analizaron los resultados por duplicado o triplicado, concluyendo efectos estudiados mediante Anova, Statgraphycs, 3.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Solubilidad de APS

Se realizó al 2% en todos los casos como concentración de referencia. Previamente se analizó el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la solubilidad del APS. Los resultados obtenidos mostraron que el APS a temperatura ambiente aumentó su solubilidad desde 16% a 19% a las 24 horas de almacenamiento. A partir de dichos resultados se procedió a realizar todos los tratamientos posteriores con las muestras disueltas durante una semana de almacenamiento.

Es así como se determinó un incremento de la solubilidad por efecto de temperatura + US tal como muestra la **Tabla 1**.

Tabla 1: Solubilidad de APS, efecto de temperatura y combinación con US

Tratamientos APS 2%	
50°C	18 ± 1,41 [b]
90°C	10 ± 1,40 [a]
US+50°C	38 ± 0,71 [c]
US+90°C	16 ± 1,41 [b]

Cuando se combina US + 50°C, el porcentaje de solubilidad alcanzó 38%, mientras que cuando se trató con US + 90°C, la solubilidad descendió a 16%. Si comparamos el efecto de la temperatura, se aprecia que esta es la responsable de esta disminución (18% tratadas a 50°C y 10% tratadas a 90°C) por lo cual, el tratamiento con US siempre aumenta la solubilidad del APS, aún con la formación de agregados previos generados por efecto de la temperatura. Además, las proteínas se desnaturalizan fácilmente bajo algunas condiciones extremas de temperatura. Las proteínas desnaturalizadas aún estarían asociadas en agregados, o incluso precipitados, lo que provoca una reducción en la solubilidad (Campbell et al. 1992, Chan and Ma 1999, Babiker 2000, Calderon et al. 2000, Molina et al. 2001, Wang et al. 2008).

Estos resultados indican en todos los casos un evidente efecto de interacción entre US y la temperatura. En el primer caso, la sonicación a temperatura ambiente refleja solamente el efecto de los US, por lo que claramente se puede observar un incremento de la solubilidad como principal efecto de los mismos. Por otro lado, los tratamientos con US + temperatura aplicada al mismo tiempo (50 y 90°C) van a reflejar, dado los controles, el efecto combinado de US y temperatura. Esto es reflejado en el menor incremento de la solubilidad durante el tratamiento combinado a medida que aumenta la temperatura, es decir, en un menor porcentaje de incremento conforme aumentó esta variable.

Determinación de la viscosidad de las soluciones

El comportamiento de las curvas de flujo de soluciones al 2%, y sus respectivos tratamientos, en el rango de velocidades de 90 – 150 RPM permitió determinar el comportamiento Newtoniano en todas las muestras estudiadas, dada su relación lineal.Así, los valores obtenidos para su análisis corresponden a la pendiente de la curva Shear Stress (D/Cm2) vs Shear Rate (1/sec), siendo su Viscosidad (cP).

La **Tabla 2** muestra el efecto de los tratamientos para todas las muestras de APS sobre la viscosidad a temperatura ambiente.

Igual superíndice indica pertenencia al mismo grupo estadístico en el resultado observado de la misma columna.

Tabla 2: Viscosidad (cP) de APS, efecto de temperatura y combinación con US

Tratamientos APS 2%	
50°C	1,5±0,2 [a]
90°C	2,4±0,2 [b]
US+50°C	2,5±0,2 [b]
US+90°C	2,4±0,2 [b]

El efecto de los tratamientos sobre la viscosidad no se vió directamente relacionado con la solubilidad encontrada tanto en los casos de los tratamientos térmicos como en el efecto de los US en la mayoría de los casos. Esto podría deberse a que los agregados formados en las muestras al 2% no fueron del todo significativos como para apreciarse diferencias en el estudio de viscosidad por su concentración. Recién se apreció esta posible formación de agregados cuando se trataron las muestras a 90°C. Además, puede observarse que prevaleció este efecto también en el tratamiento combinado.

Sin embargo, el tratamiento combinado con 50°C, produjo un significativo aumento de la viscosidad cuando el APS se encontraba al 2%.

Algunos investigadores observaron que la viscosidad aumentó después de la sonicación en ciertas condiciones. Krešic' et al. (2008) estudiaron los efectos del ultrasonido (US: 20 kHz, 15 min) sobre proteína de suero aislado y de la proteína

de suero concentrado. Ellos mostraron que el tratamiento de ultrasonidos en ambas muestras puede aumentar significativamente la viscosidad aparente. Esto podría deberse a que el tratamiento de ultrasonido influye en la estructura de la proteína, con una mayor exposición de zonas hidrofilicas.
El ultrasonido puede causar efectos opuestos sobre las macromoléculas. Por ejemplo, en pectina, almidón o proteína que contiene los sistemas que fueron expuestos a altos valores de sonicación, Se observó una disminución de la viscosidad debido a la despolimerización (Seshadri et al. 2003, Jambrak et al.2009, Zuo et al. 2009). También, se observó un aumento de la viscosidad en los alimentos tales como puré de tomate y yogurt (Vercet et al. 2002, Wu et al. 2008, Anese et al. 2013). Se ha especulado que la reducción del tamaño del polímero liberaría a las macromoléculas y posteriormente la cadena del polímero estaría disponible para la unión (Seshadri et al. 2003).

Potencial Zeta (ζ)

La carga superficial de una proteína es debido a la ionización parcial de varios residuos de aminoácidos (Vanapalli y Coupland 2000). Típicamente el potencial Zeta de una proteína es positiva si hay mas aminoácidos presentes cargados positivamente que los aminoácidos cargados negativamente (Bouzid et al. 2008).
En la **Tabla 3** se observan los valores del potencial Zeta (ζ) del APS y sus tratamientos.

Tabla 3: Potencial Zeta (ζ) de APS, efecto de la temperaturay combinación con US

Tratamientos APS 2%	
50°C	-24 ± 5,0 ^{ab}
90°C	- 30 ± 6,0 ^{b}
US+50°C	-30,3 ± 6,1 ^{b}
US+90°C	-30,1 ± 6,5 ^{b}

En cuanto al APS tratado con US a temperatura ambiente, se observó un incremento en módulo en comparación con el APS sin tratar (varió de -17,1 ± 8,2 ^{a} a -23,9 ± 5,8 ^{ab}). Esto podría deberse a cambios superficiales en los agregados previos, induciendo a la exposición de residuos de carga negativa y aumentando en consecuencia su carga superficial. Los tratamientos térmicos y combinados también produjeron un fuerte incremento del potencial. Como norma general, se apreció un incremento de la carga superficial en módulo como efecto de la temperatura en la mayoría de los casos. Una excepción sería a 6% de APS, tratado a 50°C (ensayo no mostrado), el cual no presentó diferencia en el potencial zeta. En el resto de las concentraciones, la temperatura indujo este pequeño incremento, el cual no se relacionó con un aumento en la solubilidad. De esto se puede concluir que el efecto de la temperatura sobre el potencial zeta sería despreciable frente a otros parámetros.

Según bibliografía, cuando las muestras son sometidas a un calentamiento, el potencial Zeta de una partícula no se ve afectado significativamente, pero el tamaño de partícula se incrementa después del calentamiento, esto indica que el potencial zeta tiene un rol importante en la estabilidad y las propiedades reológicas de esta dispersión (Sağlam et col. 2013).
Cuando se combinaron la temperatura con US, también se observó un incremento dentro de cada sistema, a excepción del tratamiento US-90°C. En este caso no se observó diferencias en el tratamiento combinado.

Distribución del tamaño de partícula

Se realizó la distribución del tamaño de partícula del APS de todas las condiciones mediante dispersión dinámica de luz.
En base a los resultados que brinda el software del equipo, se procedió a analizar el volumen %. Este es un indicador cuantitativo de la población por lo que va a describir el porcentaje representativo en cada caso y, aunque se encuentren otros tamaños, la porción mayoritaria es la que determinará esencialmente las propiedades funcionales.
Por tal motivo, decidimos analizar los efectos del tratamiento mediante la descripción del pico/s mayoritario/s en Vol. %
En la **Figura 1 a-b** se puede observar el promedio de 18 mediciones de las distribuciones del tamaño del diámetro de partícula (nm) en Volumen % del APS para cada una de las condiciones estudiadas.

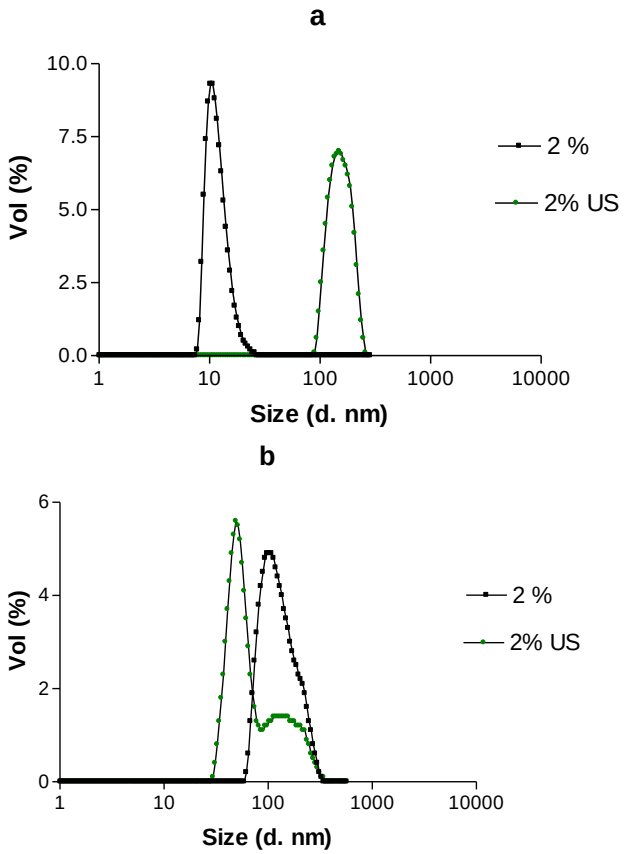


Figura 1: Distribución del tamaño de partícula en diámetro (nm). **(a)** Tratamientos a 50°C **(b)** tratamientos a 90°C.

Teniendo en cuenta que la muestra de APS presentó un tamaño promedio alrededor de 10 nm, se puede observar que el tratamiento a 50°C no causó ningún efecto sobre la distribución promedio de partícula (**Figura 1a**). Estos resultados son coincidentes con la solubilidad (**Tabla 1**) y la viscosidad (**Tabla 2**), no encontrándose cambios tampoco en estos parámetros. Cuando se combinó esta temperatura con US, apareció un pico mayoritario en la distribución de partícula promedio en 100-200 nm., indicando un posible efecto de agregación que claramente se relaciona con el aumento de la viscosidad en esa concentración (**Tabla 2**).

Por otro lado, el tratamiento a 90°C, causó un aumento del tamaño promedio a 100 nm y cuando se realizaron las combinaciones US-90°C, el efecto de la temperatura pareció superar cualquier leve modificación del US en estas condiciones (**Figura 1b**). Los mismos resultados habían arrojado los datos de viscosidad (**Tabla 2**), donde el tratamiento a 90°C, generó un incremento considerable del parámetro, (probablemente por generación de agregados por temperatura), al igual que lo observado en la distribución del tamaño de partícula promedio. Cuando se combinaron los tratamientos (90°C+US) la viscosidad no mostró cambios, con lo que se advierte una buena correlación entre ambas técnicas.

Reometria dinámica: Gelificación y Viscoelasticidad

Se realizaron estudios de reología dinámica del APS, con una deformación de 0,01% y a una frecuencia fija de 1 Hz; se estudió la evolución del módulo de almacenamiento (G') y el de pérdida (G'') con el tiempo, como así también los barridos de frecuencia correspondientes.

Estudios previos demostraron la necesidad de una concentración mayor al 2% de proteína de soja para producir gel en estas condiciones, por lo que en la mayoría de los casos no se observó cruce entre G´ y G´´, tal como sugiere la formación de un

gel. Sin embargo, el tratamiento a 50°C, generó una muestra con capacidad de gelificar al 2%p/p. En la **Tabla 4** se muestran los resultados, tiempo y temperatura de gelificación con el valor de la componente elástica en ese punto.

Tabla 4: Punto de gelificación (tiempo, temperatura) y valor correspondiente de G' del APS al 2 % con los diferentes tratamientos. Tiempo gel ± 0,4 min; Temp.gel ± 5ºC; G''± 5 Pa

Tratamiento APS 2%	Tiempo gel (min)	Temp. gel (ºC)	G´ (Pa)
50ºC	4,5	70	3
90ºC	---	---	---
US+50ºC	---	---	---
US+90ºC	---	---	---

Como se observó anteriormente, el tratamiento a 50°C, no modificó el tamaño molecular promedio (**Figura 1 a**), pero indujo cambios, tal vez superficiales, tal como demostró el potencial zeta superficial (**Tabla 2**) que llevarían a incrementar la tendencia a agregarse para generar un gel. Sin embargo, al combinar con US, esta tendencia desaparece, aunque el tamaño molecular promedio se haya incrementado. Esto indica que para la formación de un gel (cualquiera sea el tipo) no alcanza sólo con un incremento de su tamaño molecular promedio; existen otros requerimientos que tal vez sean mas decisivos que este.

El tratamiento a 90°C, termina de corroborar lo anteriormente dicho. En este caso, aunque la temperatura haya generado un gran incremento del tamaño molecular promedio (**Figura 1b**), los estudios reológicos no mostraron formación de gel en ningún caso, ni tampoco en combinación con US.

Por último, la caracterización viscoelástica obtenida mediante el barrido de frecuencia y utilizando la ecuación 2, determinó un *n* igual a 0,1 cuando se ajustó el barrido correspondiente a la muestra de APS tratada al 50°C. Esto indicaría, en principio, un gel de tipo físico. Sin embargo, al analizar dichos barridos, se observó que la componente viscosa (G´´) fue mayor que la componente elástica (G´) a lo largo de todo el rango de frecuencia estudiada (no mostrado). Esta situación podría corresponder a un "entanglement networks systems" o "enriedo de redes" llamados también "pseudogeles" (Kavanagh et al., 1998).

CONCLUSIONES

La solubilidad del APS al 2% se incrementó con el tiempo de almacenamiento y con la aplicación del US, pero se encontró una reducción considerable con los tratamientos térmicos que se reflejaron en la combinación respectiva temperatura+US.

La viscosidad presentó relación con el tamaño de partícula promedio del APS. Se observó un incremento en el tratamiento combinado 50°C+US, y con 90°C, pudiendo corresponder con la formación de agregados en cada caso en particular.

La carga superficial de los agregados, evidenció una modificación del tratamiento, generando estructuras de similar tamaño promedio pero de mayor exposición de residuos proteicos de carga negativa.

El tratamiento de 50°C indujo gelificación de las muestras de APS en baja concentración, presentando una formación de pseudogel, lo cual evidencia estructuras con capacidad de gelificar aunque muy débilmente.

BIBLIOGRAFÍA

Anese M, Mirolo G, Beraldo P, Lippe G. 2013. Effect of ultrasound treatments on microstructure and lycopene in vitro bioaccessibility of tomato pulp. Food Chemistry 136, 458-463.

Babiker EE.2000. Effect of transglutaminase treatment on the functional properties of native and chymotrysin-digested soy preotein. Food Chemistry 70, 139-145.

Bhaskaracharya R, Kentish SE & Ashokkkumar M. 2009. Selected applications of ultrsonics in food processing. Food Engineering Reviews, 1, 31-49.

Boye JI CY and Harwalker VR. ed. by Damodaram, S. and Paraf. A., 1997. Thermal denaturation and coagulation of preoteins. Food proteins and their applications, Mared Dekker, Ch. 2: 25-56.
Bouzid H, Rabiller-Baurdy M, Paugam L, Rousseau F, Derriche Z & Bettahar NE. 2008. Impact of zeta potential and size of caseins as precursors of fouling deposition limiting and critical fluxes in spiral ultrafiltration of modified skim milks. Journal of Membrane Science, 314(1), 67-75.
Calderon AM, Ruiz-Salazar RA, Jara-Marini ME.2000. Enzymatic hidrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. Journal of Food Science 65, 246-253.
Camino NA, Perez OE & Pilosof AM. 2009. Molecular and functional modification of hydroxypropylmethylcellulose by high.intensity ultrasound. Food Hydrocolloids, 23 (4), 1089-1095.
Campbell NF, Shih FF, Marshall WE. 1992. Enzymatic phosphorylation of soy protein isolate for improved functional properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40, 403-406.
Chan WM, Ma CY.1999. Acid modification of protein from soymilk residue (okara). Food Research International 32, 119-127.
Fukushima D. 1991. Recent progress of soybean protein foods: chemistry, technology and nutrition. Food Review International, 7 (3), 323-351.
Jambrak AR. 2009. Physical properties of ultrasound treated soy proteins. Journal of Food Engineering, 93(2), 386-393.
Knorr D, Zemker M, Heinz V, & Lee D. 2004. Applications and potential of ultrasonics in food processing. Trends in Food Science & Technology, 15 (5), 261-266.
Krešic' G, Lelas V, Jambrak AR, Herceg Z & Brnčić SR. 2008. Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. Journal of Food Engineering, 87(1), 64-73.
Molina E, Papdopoulou A. Ledward DA. 2001. Emulsifying propertiesof high pressure treatedsoy protein isolate and 7S and 11S globulins. Food Hidrocolloids 15, 263-269.
Morales R, Martínez KD. Pizones Ruiz-Henestrosa VM & Pilosof AMR. 2015. Modification of foaming properties of soy protein isolate by high ultrasound intensity: Particle size effect. Ultrasonics Sonochemistry, 26, 48-55.
Ravanagh G y Ross- Murphy S. 1998. Rheological characterization of polymer gels. Prog. Polym. Sci., Vol. 23, 533-562.
Sağlam D, Venema P de Vries R, Shi J, van der Linden E. 2013. Concentrated whey protein particle dispersions: Heat stability and rheological properties. Food Hydrocolloids 30 *(1)*, 100-109.
Seshadri R, Weiss J, Hulbert GJ, Mount J. 2003) "ltrasonic processing influences rheological and optical properties of high-menthoxyl pectin dispersions. Food Hydrocolloids 17, 191-197.
Vercet A, Sanchez C, Burgos J, Montanes L, Lopez-Buesa P. 2002.The effects of manothermosonication on tomato pectin enzymes and tomato paste rheological properties. Journal of food Engineering 53, 273-278.
Vanapalli S & Coupland JN. 2000.Characterization of food colloids by phase analysis light scattering. Food Hydrocolloids, 14(4), 315-317.
Wang XS, Tang CH, Li BS, Li L, Yang XQ, Ma CY.2008. Effects of high pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates. Food Hydrocolloids 22, 560-567.
Wu J, Gamage TV, Vilkhu KS, Simos LK, Mawson R. 2008. Effect of thermosonication on quality improvement of tomate juice. Innovative Food Science and Emerging Technologies 9, 186-195.
Zuo JY, Knoerzer K, Mawson R, Kemtish S, Ashokkumar M. 2009. The pasting properties of sonicated waxy rice starch suspensions. Ultrasound sonochemistry 16, 462-468.

Síntesis enzimática de galactooligosacáridos. Aplicación a la elaboración de un queso funcional.

Vénica C.I., Amuchástegui Beeskow A.F., George G.A., Bergamini C.V., Perotti M.C.

Instituto de Lactología Industrial (INLAIN-UNL/CONICET), Facultad de Ingeniería Química - Santiago del Estero 2829, S3000AOM Santa Fe. Argentina. cvberg@fiq.unl.edu.ar

RESUMEN

Los galactooligosacáridos (GOS) son compuestos bioactivos con rol prebiótico. La actividad transgalactosilasa de las enzimas β-galactosidasas es la responsable de la presencia de GOS en alimentos lácteos deslactosados. El objetivo de este trabajo fue evaluar la síntesis de GOS en un medio lácteo rico en lactosa estudiando el efecto de la concentración de suero en polvo parcialmente desmineralizado (3-17 g/100 mL) y la dosis de enzima β-galactosidasa YNL-2 (0,3-1,7 g/L). Se empleó un diseño central compuesto rotable y se modeló la máxima concentración y rendimiento de GOS con la metodología de superficie de respuesta. Una de las combinaciones más adecuadas se aplicó en elaboraciones de quesos (tipo Cremoso). La máxima concentración y rendimiento de GOS: 2,76 g/100g y 15,49%, respectivamente, se lograron a los 90 min de reacción y partiendo de 17 g/100 mL de suero y 1 g/L enzima. La incorporación de la enzima en la elaboración de quesos produjo ligeros incrementos en los tiempos de acidificación, aunque no se afectó la composición fisicoquímica y los recuentos microbiológicos de los quesos.Se obtuvieron quesos enriquecidos en GOS, con niveles de 0,96 g/100 g, utilizando una leche de elaboración compuesta por 10 g/100 mL de suero y 1 g/L de enzima.

Palabras Clave: galactooligosacáridos, enzima β-galactosidasa, mezclas leche-suero, queso funcional.

ABSTRACT

Galactooligosaccharides (GOS) are bioactive compounds with prebiotic role. The transgalactosilasa activity of β-galactosidase enzyme is responsible for the presence of GOS in delactosed dairy products. The aim of this study was to evaluate the synthesis of GOS in a milk medium rich in lactose studying the effect of the concentration of partially demineralized whey powder (3-17 g/100 mL) and the dose of β-galactosidase enzyme YNL-2 (0.3-1.7 g/L). Response surface methodology by rotatable central composite design was employed. One of the most suitable combinations was applied on cheese making (Cremoso type). The maximum concentration and yield of GOS: 2.76 g/100 g and 15.49%, respectively, were achieved at 90 min of reaction time and using 17 g/100 mL of whey and 1 g/L of enzyme. The incorporation of enzyme in the standard protocol of cheese caused slight increases in acidification times, but the physicochemical and microbiological compositional of cheeses were unaffected. It was feasible to obtain cheeses enriched with GOS at levels of 0.96 g/100 g, employing cheese milk composed by 10 g/100 mL and with 1 g/L of enzyme.

Keywords: galactooligosaccharides, β-galactosidase enzyme, milk-whey mixtures, functional cheese

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha observado una tendencia creciente en la producción y demanda de alimentos funcionales (Ozen et al. 2012) que son aquéllos que producen un efecto beneficioso específico a la salud, más allá de sus propiedades nutricionales básicas. Dentro de esta categoría de alimentos se encuentran los que poseen componentes bioactivos, es decir compuestos químicos que están presentes naturalmente, o que se forman y/o adicionan durante su procesamiento (Korhonen 2009,Saxelin et al. 2003,Shah 2000). Estudios recientes han demostrado la presencia de una variedad de biocomponentes en la leche y los productos lácteos fermentados. En particular, los oligosacáridos de galactosa o galacto-oligosacáridos (GOS) que son reconocidos por su rol de fibra prebiótica, se han encontrado en la leche humana y a nivel de trazas en la leche de rumiantes. Con el fin de imitar la leche materna, se adicionan GOS como ingrediente funcional en las fórmulas infantiles (Playne

2004). También su uso se ha extendido a otros alimentos (bebidas, panificados, helados). Por otro lado, los GOS se han detectado en leches y yogures reducidos en lactosa obtenidos por tratamiento con enzimas β-galactosidasas (EC 3.2.1.23) (Chen et al. 2002,Martins et al. 2011,Ruiz-Matute et al. 2012,Vénica et al. 2015).En efecto, es la actividad transgalactosilasade esta enzaima la responsable de la formación de GOS (Mahoney 1998). Sin embargo, según nuestros conocimientos, no se dispone de estudios relacionados a la formación de GOS en quesos.

Por otra parte, los factores (pH, T, concentración de enzima y sustrato, tipo de enzima, entre otros) que afectan la síntesis de GOS cuando se utilizancomo sustrato soluciones de lactosa y suero, han sido ampliamente estudiados; en algunos de ellos, se ha modelado la reacción con metodología de superficie de respuesta (MSR) (González-Delgado et al. 2016,Lisboa et al. 2012,Martins et al. 2014,Martins et al. 2011,Roy et al. 2002). Sin embargo, el estudio de la formación de GOS en mezclas lácteas que simulan las matrices de yogur y queso con la aplicación de esta herramienta estadística, está escasamente reportado (Martins et al. 2014,Martins et al. 2011). En particular, en la elaboración de algunas variedades de quesos (blandos tipo cremoso) se pueden agregar ingredientes proteicos (leche en polvo, concentrados de proteínas de suero, entre otros) para mejorar el rendimiento quesero (Hinrichs 2001, Oh et al. 2014). Esto también conduciría a una matriz con mayores niveles de lactosa, principal sustrato implicado en la síntesis de GOS.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la síntesis de GOS en un medio lácteo rico en lactosa estudiando los efectos combinados de la concentración de suero y dosis de enzima, mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta. Una de las combinaciones más adecuadas fue aplicada en elaboraciones de quesos blandos (a pequeña escala) con el fin de obtener quesos enriquecidos en GOS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reacción enzimática

Las reacciones enzimáticas para la síntesis de GOS con β-galactosidasaYNL-2 (GODO Shusei Company Limited, Japón) se llevaron a cabo en un medio lácteo compuesto por suero en polvo parcialmente desmineralizado (SPD) (carbohidratos 80%, proteína 11%, grasa 2%, minerales 1,4%) (Tregar S.A., Santa Fe, Argentina) y leche fluida entera UHT (Milkaut S.A., Santa Fe, Argentina). Para ello, una cantidad adecuada de SPD, de acuerdo al ensayo indicado en el diseño experimental (**Tabla 1**), se diluyó con la leche hasta 400 mL en frascos de vidrio con tapa a rosca. Los frascos se colocaron en baño de agua a 60ºC por 5 min de manera de conseguir una correcta hidratación del polvo. Luego se enfriaron a 40°C, se adicionó la enzima β-galactosidasa en la dosis indicada (**Tabla 1**), y se incubaron a 40°C (temperatura óptima de actividad de la enzima) en baño de agua. A intervalos de 10 minutos, se tomaron muestras (10 mL), se colocaron en tubos de ensayo y se sumergieron en un baño de agua a ebullición por 8 min para inactivar la enzima. Las muestras se reservaron en freezer a -20°C hasta el momento del análisis.

Diseño experimental

Se empleó la metodología de superficie de respuesta como estrategia de modelado para estimar las condiciones óptimas de dosis de enzima (E) (g/L mezcla) y cantidad de SPD (g/100 mL mezcla), que conduzcan a producir la mayor concentración y rendimiento de GOS. Se empleó un diseño central compuesto rotable (DCCR) con 2 variables independientes (2^2), 4 ensayos en las condiciones axiales (α=1,414) y 4 réplicas del punto central para conocer el error experimental asociado con las mediciones, lo que arrojó un total de 12 ensayos (**Tabla 1**). Los niveles de las variables independientes fueron seleccionados de acuerdo a experiencias previas. El rendimiento fue calculado según Lisboa et al. (2012), mediante la siguiente ecuación:

$$\textit{Rendimiento (\%)} = GOS / (GOS + Glu + Gal + Lac) \times 100$$

Donde: GOS, Glu, Gal, Lac son las concentraciones (g/100 g) de GOS, glucosa, galactosa y lactosa a cada tiempo de muestreo, respectivamente.

Tabla 1: Diseño experimental, niveles de los factores estudiados (valores codificados y reales), valores máximos de concentración y rendimiento de GOS (experimental y predicho).

Ensayo	Variables independientes o factores				Respuestas			
	E		SPD		Concentración máxima de GOS (g/100 g)		Rendimiento máximo de GOS (%)	
	Código	Valor real (g/L)	Código	Valor real (g/100 mL)	Experimental	Predicho	Experimental	Predicho
1	-1,41	0,29	0	10	1,61	1,62	12,59	12,50
2	1,41	1,71	0	10	1,57	1,52	12,65	12,50
3	0	1	0	10	1,59	1,57	12,61	12,50
4	-1	0,5	-1	5	0,91	0,92	10,10	9,93
5	+1	1,5	+1	15	2,30	2,35	14,76	14,70
6	0	1	0	10	1,58	1,57	12,61	12,50
7	0	1	-1,41	2,93	0,65	0,63	8,77	8,76
8	0	1	+1,41	17,07	2,78	2,76	15,47	15,49
9	-1	0,5	+1	15	2,42	2,42	14,67	14,69
10	0	1	0	10	1,57	1,57	12,29	12,50
11	0	1	0	10	1,55	1,57	12,25	12,50
12	+1	1,5	-1	5	0,82	0,85	9,76	9,93

Elaboración de quesos

Se empleó el protocolo de elaboración de quesos blandos (tipo Cremoso) a pequeña escala (Zalazar et al. 1999). Se utilizó un equipo compuesto por 5 tinas de acero inoxidable de 5 litros de capacidad que trabajan en paralelo. Dos tipos de quesos experimentales (E y Ep) con adición de la enzima (1,0 g/L mezcla) fueron elaborados, que se compararon con un queso control sin enzima (C). Se realizaron tres réplicas de elaboración, en días consecutivos y utilizando la misma leche; en cada réplica se elaboraron por duplicado los quesos experimentales (Ea y Eb, Epa y Epb) y un queso control.

La leche mezcla de elaboración (4 L) se preparó disolviendo SPD 10% (g/100 mL mezcla) con leche cruda (Milkaut S.A., Santa Fe, Argentina). En los quesos Ep, se adicionó la enzima y se incubó por 40 min a 40°C; luego se pasteurizó a 65°C por 20 min, se enfrió a 39°C y se incorporó el fermento *S. thermophilus* M5 (Chr. Hansen, Argentina) a una concentración de 10^6 UFC/mL. En los quesos E, la enzima y el fermento se agregaron simultáneamente a la mezcla de leche pasteurizada y enfriada.

En cada caso, antes del agregado del fermento se adicionó $CaCl_2$ (0,80 g) (Merck, Alemania) disuelto en agua destilada. Transcurridos 15 min, se adicionó el coagulante (Chymax; Chr. Hansen, Argentina) (1,8 mL diluido en agua destilada). Luego de que el coágulo adquirió la firmeza adecuada (35-40 min), se procedió al lirado manual hasta obtener cubos de aprox. 1 cm de lado. Se dejó reposar por 10 min y se procedió a agitar la mezcla en forma suave e intermitente por 20-30 min. La cuajada se colocó en moldes, se mantuvo en cámara a 40°C hasta que el pH alcanzó 5,20 - 5,30, con volteos cada 30 min. Los quesos (aprox. 500 g) se desmoldaron y colocaron en salmuera (20% p/v, pH 5,40, 5°C) durante 30 min. Finalmente, se maduraron por 30 días a 5°C; luego de un período de estabilización de 6 días en el que se consiguió el balance de sal y humedad, se envasaron al vacío. A los 6 y 30 días se analizaron la humedad y el pH, y se realizaron recuentos microbiológicos; también se determinaron los contenidos de grasa, proteínas y perfiles de azúcares a los 6 días.

Tabla 2. Diseño experimental de la elaboración de quesos.

Leche mezcla de elaboración: suero en polvo parcialmente desmineralizado 400 g y leche fluida hasta obtener 4 L de mezcla (4,18 Kg)		
Quesos		**Tratamiento con la enzima**
Experimental	Epa; Epb	4,00 (g/L); 40 min/40 °C
	Ea; Eb	4,00 (g/L); sin incubación
Control	C	----

Determinaciones analíticas

Composición fisicoquímicade los quesos: el pH y contenidos dehumedad, materia grasa y proteínas, se analizaron con métodos normalizados (Bradley et al. 1992, ISO:3433:2008, ISO:5534:2004, ISO:8968-1:2001).

Perfil de carbohidratos: se realizó según Vénica et al. (2015) y Bergamini et al. (2010), utilizando un sistema HPLC de intercambio iónico marca Perkin Elmer (USA). Se utilizó una columna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 mm) y un guardacolumnaAminexCation-H^+ (30 mm x 4,6 mm) (Aminex, BioradLaboratories, USA). Las corridas cromatográficas se realizaron manteniendo la temperatura de la columna a 65°C y el flujo a 0,6 mL/min; la fase móvil consistió de $H_2SO_4$0,01 M. El detector de índice de refracción (IR) (35°C) permitió la detección de los carbohidratos (GOS, lactosa, glucosa y galactosa). Previo a la inyección con un loop de 60 μL, las muestras preparadas se filtraron con membranas de 0,45 μm(Millex, Millipore, Brasil). Los resultados se expresaron en g/100 g utilizando las áreas de los picos y las curvas de calibrado que se hicieron con soluciones estándares para cada compuesto (Sigma Aldrich, USA).

Tratamiento de muestra: una muestra de leche mezcla (2,5 g) se colocó en un matraz de 25 mL, se diluyó con $H_2SO_4$0,01 M, se homogeneizó y centrifugó (15000 g/20 min/4°C). Una muestra de queso (2,5 g) se colocó en un tubo falcon, se diluyó con H_2SO_4 0,01 M (25 mL) y se incubó en baño de agua a 40°C por 15 min. Se procesó en Ultra-Turrax (15000 g/1 min), centrifugó (5000 g/20 min/4 °C) y el sobrenadante se filtró por papel. El sobrenadante y el filtrado se reservaron en freezer a -20°C hasta su análisis.

Análisis estadístico

El diseño experimental y el análisis de variancia (ANOVA) de los modelos de predicción para la concentración y rendimiento de GOS se realizaron con el software Design-Expert versión 7.0.0 (StatEasy Inc., USA). Para los parámetros estudiados en los quesos, se calcularon el promedio y la desviación estándar y se aplicó un ANOVA de una vía para detectar diferencias significativas entre los tratamientos analizados utilizando la aplicación Excel (Microsoft Office, 2007); el nivel de confianza empleado fue del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis de GOS

Una representación típica de la evolución de los carbohidratos durante la incubación de la mezcla leche-suero con la enzima β-galactosidasa se muestra en la **Figura 1** (ensayo 8). Las concentraciones de glucosa y galactosa se incrementaron a medida que avanzó la incubación mientras que la lactosa disminuyó; en todo momento los niveles de glucosa fueron superiores a los de galactosa, hecho que se correlacionó con la condensación de moléculas de galactosa para formar los GOS debido a la actividad transgalactosidasa que posee la enzima. La concentración de GOS aumentó con el tiempo hasta llegar a un máximo (90 min), a partir del cual el nivel alcanzado disminuyó ligeramente debido a procesos hidrolíticos. En los ensayos con los niveles más elevados de enzima (1,0; 1,5 y 1,71 g/L) también se observó la hidrólisis de los GOS luego de alcanzar el punto máximo, mientras que, en los ensayos con los menores niveles de enzima (0,29 y 0,5 g/L) la concentración máxima de GOS se mantuvo constante. El tiempo en alcanzar el máximo nivel de GOS en los diferentes ensayos se muestra en la **Figura 2**; como se puede observar las concentraciones obtenidas y los tiempos dependen de ambos factores estudiados. Los niveles de GOS variaron de 0,64 a 2,78 g/100 g, lo que correspondió a rendimientos de 8,77 y 15,47%, respectivamentente (**Tabla 1**). El mejor rendimiento y concentración de GOS se obtuvo con las condiciones estudiadas en el ensayo 8.

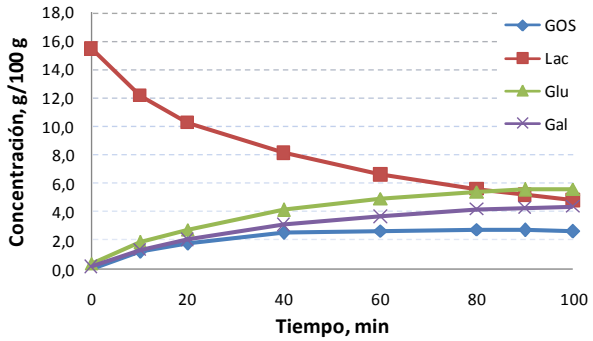


Figura 1. Evolución de la concentración de GOS, lactosa, glucosa y galactosa durante el proceso de hidrólisis/transgalactosilación (ensayo 8).

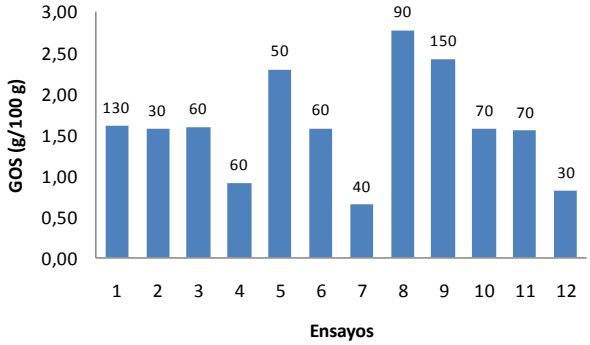


Figura 2. Máxima concentración de GOS obtenida en los diferentes ensayos de incubación. Los valores sobre las barras indican el tiempo de reacción correspondiente (min).

Diseño experimental y análisis de superficie de respuesta para la síntesis de GOS

Se establecieron modelos de segundo orden para la concentración y el rendimiento de GOS. Las ecuaciones polinomiales que describen los valores máximos de la concentración y el rendimiento de GOS como funciones de las variables independientes son:

$$\textit{Concentración máxima de GOS (g/100 g)} = 0{,}3831 - 0{,}0684 \times E + 0{,}1011 \times S + 0{,}0024 \times S^2$$

$$\textit{Rendimiento máximo de GOS (\%)} = 6{,}9912 + 0{,}6261 \times S - 0{,}0075 \times S^2$$

Donde: **E**= enzima (g/L mezcla), **S**= suero en polvo parcialmente desmineralizado (g/100 g mezcla).

Los resultados del ANOVA se muestran en la **Tabla 3**. Los factores S, S^2 y E influyeron significativamente en la concentración de GOS, mientras que S y S^2 significativamente afectaron en el rendimiento. En ambos casos el análisis de regresión revela valores de R^2 superiores a 0,99, indicando que los modelos explican más del 99% de la variabilidad en la concentración y el rendimiento. Además, los valores elevados de R^2_{aj} indican que los modelos presentan una muy buena correlación (ajuste) con los valores experimentales. La precisión mide la relación entre la señal y el ruido, siendo deseable un valor mayor a 4; los valores de precisión de nuestros modelos fueron de 122 y 85, respectivamente, lo que indica una señal adecuada.

En la **Tabla 1** se presentan los máximos valores de concentración y rendimiento de GOS obtenidos experimentalmente y los calculados por la aplicación de los modelos (predichos).

Se calculó la desviación entre el valor experimental y predicho para ambas respuestas (concentración y rendimiento máximos de GOS). En el caso particular del ensayo 8, las desviaciones fueron menores al 1%; para el resto de los ensayos, la desviación fue menor al 3,3%.

Las superficies de respuestas para la concentración y rendimiento de GOS obtenidas se observan en la **Figura 3a** y **3b**, respectivamente. Ambas respuestas se incrementaron notablemente con el agregado de SPD, desde 2,9 hasta 17,1%, y por lo tanto con el aumento en la concentración de lactosa en la mezcla. La dosis de enzima tuvo una influencia mucho menor sobre la concentración de GOS y no afectó en el rendimiento; se observó una ligera disminución de la concentración máxima de GOS a medida que la dosis de enzima se incrementó desde 0,29 hasta 1,71 g/L.

Tabla 3. Análisis de variancia para los modelos polinomiales de segundo orden.

Fuente	Suma de cuadrados		Grados de libertad		Cuadrados medios		Valor F		Valor P	
	C	R	C	R	C	R	C	R	C	R
Modelo	4,54	45,57	3	2	1,51	22,79	1666,68	912,51	<0,0001	<0,0001
Enzima (E)	0,01	--	1	--	0,01	--	10,32	--	0,0124	--
Suero (S)	4,51	45,34	1	1	4,51	45,34	4962,28	1815,64	<0,0001	<0,0001
Suero^2 (S^2)	0,02	0,23	1	1	0,02	0,23	27,45	9,39	0,0008	0,0135
Residuo	0,007	0,225	8	9	0,0009	0,0249				
Falta de ajuste	0,006	0,108	5	6	0,0013	0,0181	4,92	0,47	0,1099	0,8047
Error puro	0,001	0,116	3	3	0,0003	0,0388				
Corridas Totales	4,55	45,80	11	11						

C: concentración de GOS; R^2 = 0,9984; R^2_{aj}= 0,9978; Precisión adecuada= 122,01
R: rendimiento de GOS; R^2 = 0,9951; R^2_{aj}= 0,9940; Precisión adecuada= 85,22

Algunos autores han aplicado la metodología de superficie de respuesta para modelar la síntesis de GOS. Lisboa et al. (2012) utilizaron soluciones de suero en polvo - buffer fosfato y la enzima β-galactosidasaLactozym 3000L. Al igual que nuestros resultados, ellos reportaron que la concentración y el rendimiento de GOS se incrementaron con el aumento de la concentración de suero. Sin embargo, un resultado diferente al obtenido en nuestro estudio fue observado para el efecto de la dosis de enzima; encontraron que el incremento de la dosis de enzima influyó positivamente en la concentración y rendimiento de GOS. González-Delgado et al. (2016) modelaron la concentración y rendimiento de GOS para soluciones de lactosa y empleando un nivel de enzima β-galactosidasaLactozymPure 6500 L, que se estableció en experiencias preliminares. Encontraron que la concentración se incrementó con el aumento de la concentración de lactosa. De manera similar a lo observado en nuestro estudio, estos autores detectaron que la dosis de enzima influyó en el tiempo en lograr el máximo rendimiento de GOS y en el comportamiento observado hasta el final de incubación (disminución o mantenimiento); sin embargo, el máximo rendimiento obtenido fue muy similar para los diferentes niveles de E ensayados. Probablemente las discrepancias observadas puedan ser debidas al tipo y concentración de enzimas empleadas y a la composición del medio de reacción.En efecto, Lisboa et al. (2012) y González-Delgado et al. (2016) utilizaron menores dosis de enzima en relación a las empleadas en el presente trabajo, encontrándose por lo tanto en otra región experimental.

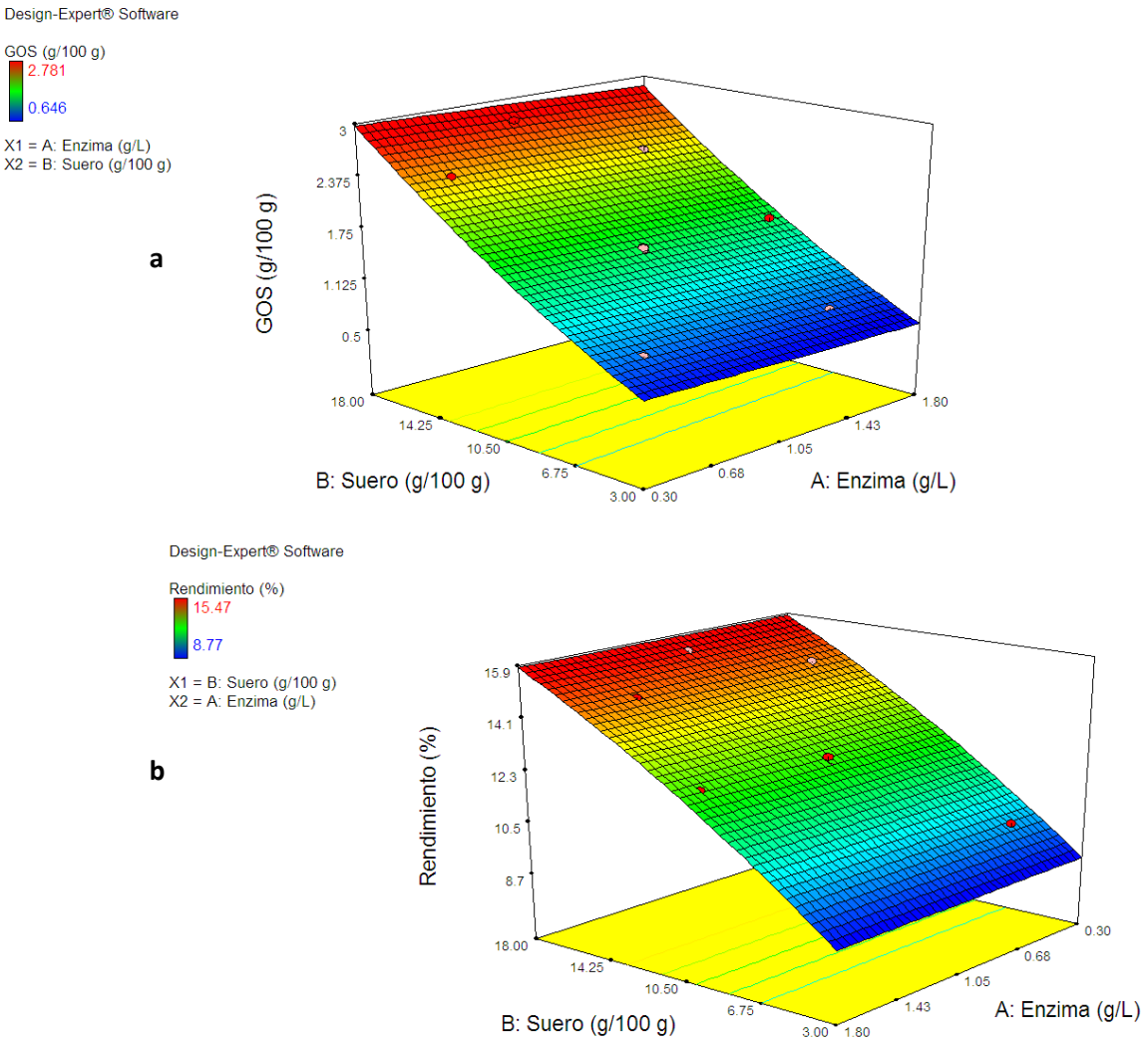


Figura 3. Superficies de respuestas correspondientes a los modelos de segundo orden para los máximos valores de concentración (a) y rendimiento (b) de GOS.

Quesos con GOS

Si bien las condiciones óptimas de reacción para maximizar la concentración y rendimiento de GOS correspondieron a 17,07 g/100 mL de suero y 1 g/L de enzima y 90 min de reacción, las mismas no resultaron adecuadas para obtener un queso con características de textura y sabor aceptables. En efecto, estas condiciones se aplicaron en ensayos de elaboración (resultados no mostrados) y los quesos obtenidos tuvieron una textura granulosa y un sabor demasiado dulce. Por este motivo, se decidió trabajar con menor concentración de suero, seleccionándose las condiciones de reacción del punto central del diseño experimental: 10 g/100 mL de SPD y 1 g/L de E. Para el caso de los quesos Ep, el tiempo de incubación se fijó en 40 min; si bien en las experiencias de incubación se obtuvo el máximo GOS a los 60-70 min, se observó que los niveles están muy próximos a este nivel máximo luego de 40 min. Se consideró un tiempo de incubación aceptable de manera de no extender innecesariamente el tiempo de elaboración y evitar posibles contaminaciones microbianas.

Algunas variaciones fueron detectadas por la inclusión de la enzima en el protocolo de elaboración de esta variedad de queso. Los quesos experimentales tuvieron los tiempos de acidificación ligeramente mayores con respecto al control. A su vez, el momento de adición de la enzima impactó en este parámetro; los quesos E

demoraron más tiempo que los Ep. Los valores de pH y contenidos de humedad, materia grasa y proteínas se muestran en la **Tabla 3**. Resultados similares se encontraron en los quesos experimentales y controles (p>0,05). Los productos obtenidos se enmarcan dentro del Código Alimentario Argentino (CAA) como quesos de muy alta humedad (>55%). El recuento del fermento (9,5 log UFC/g) y de hongos y levaduras (2,1 log UFC/g) estuvieron dentro de los rangos establecidos por el CAA, y se mantuvieron sin cambios durante la maduración. No se vieron diferencias entre los distintos tipos de quesos. Shakeel-Ur-Rehman et al. (2004) tampoco encontraron diferencias en los parámetros composicionales y en los recuentos microbiológicos en quesos Cheddar, al modificar el contenido de lactosa mediante lavado de la cuajada en comparación a quesos tradicionales.

Tabla 3. Composición fisicoquímica de los quesos.

	pH		**Humedad (g/100 g)**		**Materia grasa (g/100 g)**	**Proteínas (g/100 g)**
	6 días	30 días	6 días	30 días	6 días	6 días
Ep	5,45 ± 0,12	5,48 ± 0,10	59,44 ± 1,08	58,14 ± 0,87	15,00 ± 1,19	15,77 ± 0,76
E	5,47 ± 0,08	5,52 ± 0,06	59,15 ± 0,55	57,95 ± 1,12	15,28 ± 1,24	15,66 ± 0,50
C	5,39 ± 0,03	5,47 ± 0,06	58,74 ± 1,17	58,09 ± 0,96	15,78 ± 1,54	15,74 ± 0,48

En todos los quesos experimentales se detectó la formación de GOS; la concentración obtenida fue mayor en los quesos Ep que en los E, 0,96 y 0,57 g/100 g, respectivamente. En los quesos C no se detectaron GOS. Este hecho pone de manifiesto que el fermento utilizado no fue capaz de sintetizar GOS en las condiciones de elaboración empleadas y que los GOS detectados en los quesos experimentales fueron sólo debido a la acción de la enzima exógena. Los contenidos de lactosa en Ep, E y C fueron de 1,28; 0,50 y 3,90 g/100 g, respectivamente. Las menores concentraciones de lactosa y GOS en los quesos E comparativamente a los Ep, fueron probablemente debido a que la enzima permaneció activa durante la elaboración en E, produciendo la hidrólisis de ambos carbohidratos, mientras que en Ep la enzima se desnaturalizó con la pasteurización.

CONCLUSIONES

El diseño experimental y la metodología de superficie de respuesta resultaron efectivos para modelar las condiciones de reacción de producción y rendimiento de GOS a partir de una mezcla de leche y suero. La máxima concentración y rendimiento de GOS: 2,76 g/100g y 15,49%, respectivamente, se lograron a los 90 min de reacción y partiendo de 1,7 g/100mL de suero y 1 g/L enzima. La concentración de suero en polvo desmineralizado fue el factor que más afectó el rendimiento de GOS; la dosis de enzima no influyó sustancialmente en este parámetro, aunque afectó el tiempo en conseguir los máximos valores de rendimiento y concentración de GOS; con las mayores dosis de enzima, los máximos se consiguieron en menor tiempo.

Por otro lado, se evidenció la factibilidad de obtener quesos enriquecidos en GOS. Estos resultados constituyen los primeros estudios, relacionados a la formación *in situ* de fibras prebióticas durante la elaboración de quesos.

BIBLIOGRAFÍA

Bergamini CV, Wolf IV, Perotti MC, Zalazar CA. 2010. Characterisation of biochemicalchangesduringripening in Argentineansheepcheeses. Small RuminantResearch, 94(1–3): 79-89.

Bradley RL, Arnold E, Barbano DM, Semerad RG, Smith DE, Vines BK. 1992. Standard MethodsfortheExamination of DairyProducts. Chemical and physicalmethods, pag433-531.

Chen C-S, Hsu C-K, Chiang B-H. 2002. Optimization of theenzymicprocessformanufacturinglow-lactosemilkcontainingoligosaccharides. ProcessBiochemistry, 38(5): 801-808.

González-Delgado I, López-Muñoz M-J, Morales G, Segura Y. 2016. Optimisation of thesynthesis of highgalacto-oligosaccharides (GOS) fromlactosewith β-galactosidasefromKluyveromyceslactis. International DairyJournal, 61: 211-219.

Hinrichs J, 2001. Incorporation of wheyproteins in cheese. International DairyJournal, 11(4-7): 495-503.

ISO: 3433:2008. Cheese - Determination of fatcontent - Van Gulikmethod.
ISO 5534:2004. Cheese and processedcheese - Determination of the total solidscontent.
ISO 8968-1:2001 (IDF 20-1: 2001). Milk - Determination of nitrogencontent - Part 1: Kjeldahlmethod.
Korhonen H. 2009. Milk-derivedbioactivepeptides: Fromscience to applications. Journal of FunctionalFoods 1(2), 177-187.
Lisboa CR, de SimoniMartinez L, TrindadeRA, de Almeida Costa FA, de MedeirosBurkert JF, Burkert CAV. 2012. Response surfacemethodologyapplied to theenzymaticsynthesis of galacto-oligosaccharidesfromcheesewhey. FoodScience and Biotechnology, 21(6): 1519-1524.
Mahoney RR.1998. Galactosyl-oligosaccharideformationduringlactosehydrolysis: A review. FoodChemistry, 63(2): 147-154.
Martins AR, Manera AP, de MedeirosBurkert JF, VeigaBurkert CA. 2014. Improvinggalacto-oligosaccharidecontent in theproduction of lactose-reduced yogurt. International Journal of EngineeringResearch and Applications, 4(11): 84-89.
Martins AR, Manera AP, Monteiro RL, Burkert JFM, Burkert CAV. 2011. Lactoseconversion and thesynthesis of galactooligosaccharides in a simultaneouslaggedbioprocessusing β-galactosidase and probioticmicroorganisms. BrazilianJournal of FoodTechnology, 14: 130-136.
Oh NS, Lee HA, Myung JH, Joung JY, Lee JY, Shin YK, Baick SC. 2014. Effects of temperature and supplementationwithskimmilkpowderonmicrobial and proteolyticpropertiesduringstorage of cottagecheese. Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(6): 795-802.
Ozen AE, Pons A, Tur JA. 2012. Worldwideconsumption of functionalfoods: A systematicreview. NutritionReviews, 70(8): 472-481.
Playne M. 2004. Galacto-oligosaccharides.En: Roginski H, Fuquay J, Fox P,editores.Encyclopedia of DairyScience, 1er ed. London: AcademicPress.
Roy D, Daoudi L, Azaola A. 2002. Optimization of galacto-oligosaccharide production by Bifidobacteriumin fantis RW-8120 using response surface methodology. Journal of Industrial Microbiology&Biotechnology, 29: 281 -285.
Ruiz-Matute AI, Corzo-Martínez M, Montilla A, Olano A, Copovi P, Corzo N. 2012. Presence of mono-, di- and galactooligosaccharides in commerciallactose-free UHT dairyproducts. Journal of FoodComposition and Analysis, 28(2): 164-169.
Saxelin M, Korpela RA, Mäyrä-Mäkinen A. 2003. FunctionalDairyProducts.En: Smith G,editor.DairyProcessing. Improvingquality. Washington: CRC Press.
Shah NP. 2000. Effects of milk-derivedbioactives: Anoverview. British Journal of Nutrition 84(SUPPL. 1).
ShakeelUrR, Waldron D, Fox PF. 2004. Effect of modifyinglactoseconcentration in cheesecurdonproteolysis and in quality of Cheddar cheese. International DairyJournal, 14(7): 591-597.
Vénica CI, Bergamini CV, Rebechi SR, Perotti MC. 2015. Galacto-oligosaccharidesformationduring manufacture of differentvarieties of yogurt. Stabilitythroughstorage. LWT - FoodScience and Technology, 63(1): 198-205.
Zalazar CA, Meinardi CA, Hynes ER. 1999. Los quesos argentinos.En: Zalazar CA, Meinardi CA, Hynes ER, editores. Quesos típicos argentinos. Una revisión general sobre producción y características. Argentina: Centro de Publicaciones Universidad Nacional del Litoral, pag 20-49.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo realizado con fondos de la Universidad Nacional del Litoral a través de la programación CAI+D 2011, Nro. 5011 201 101 00322 LI.
Los autores agradecen a CONICET por la beca posdoctoral de VénicaCI.Asimismo se agradece el aporte realizado por la empresa Milkaut S.A, Chr. Hansen y TregarS.A. quienes suministraron la materia prima y otros insumos para las experiencias.

Efecto de antimicrobianos naturales sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en sistemas acuosos que modelan salsas ácidas.

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

(1) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Industrias, Buenos Aires, Argentina.
(2) CONICET, Buenos Aires, Argentina.
Dirección de e-mail: aldizalazar@hotmail.com

RESUMEN

Se evaluó el efecto de ε-polilisina y natamicina, sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii* en sistemas acuosos que modelan salsas ácidas. Para ello, se evaluó la mínima concentración inhibitoria (MIC) y la mínima concentración fungicida (MFC) de cada antimicrobiano en caldo Sabouraud a pH 3,50 y 4,50. La MIC se determinó por el método de microdilución en caldo utilizando microplacas de 96 pocillos y la MCF, mediante el recuento de viables en placa de las concentraciones inhibitorias de cada antimicrobiano. Por otra parte, se evaluaron las curvas de crecimiento de concentraciones subinhibitorias mediante el registro de lecturas de absorbancia a 600 nm en un lector automático de microplacas. Posteriormente, se adicionó goma xántica a sistemas conteniendo caldo Sabouraud y distintas concentraciones de los antimicrobianos a pH 3,50. Estos se inocularon con *Z. bailii*, se incubaron a 25ºC y se retiraron alícuotas al tiempo 0, 24 y 48 h, a las que se evaluó la población de la levadura por recuento de viables en placa. Los resultados obtenidos mostraron que las MIC dependieron del antimicrobiano y del pH, siendo más efectiva la natamicina. El agregado de goma xántica al caldo Sabouraud disminuyó el efecto inhibitorio de los antimicrobianos.

Palabras Clave: ε-polilisina, natamicina, *Z.bailii,* goma xántica, salsas ácidas.

ABSTRACT

The present work deals with the evaluation of the effect of ε-polylysine and natamycin on the growth of *Zygosaccharomyces bailii* in aqueous systems that model acid sauces. For that purpose, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of each antimicrobial were evaluated in Sabouraud broth at pH 3.50 and 4.50. The MIC was determined by the broth microdilution method using 96-well microplates and the MCF, by viable plate counting of inhibitory concentrations of each antimicrobial. Furthermore, the growth curves of subinhibitory concentrations were evaluated by recording absorbance readings at 600 nm in an automatic microplate reader. Then, xanthan gum is added to systems containing Sabouraud broth and different concentrations of antimicrobials at pH 3.50. The systems were inoculated with *Z. bailii*, incubated at 25ºC and yeast population was evaluated at initial time and after 24 and 48 h by viable plate counting. The results showed that MIC depended on the antimicrobial used and pH, being more effective natamycin. The addition of xanthan gum to Sabouraud broth decreased the inhibitory effect of antimicrobials.

Keywords: Aflatoxins, *Aspergillus parasiticus*, citrus industry byproducts, flavanones.

INTRODUCCIÓN

Las levaduras son capaces de crecer en los alimentos, inclusive en aquellos con menor actividad de agua y pH, tales como las salsas ácidas, aderezos para ensaladas y jugos de fruta. La contaminación por levaduras deteriorativas provoca una disminución de la vida útil del alimento debido a la producción de gas y olores o sabores indeseables. Las levaduras constituyen el principal microorganismo deteriorativo en los aderezos para ensaladas (Monu et al. 2016). En particular, *Zygosaccharomyces bailii* fue aislada en aderezos para ensaladas y mayonesas

(Couto et al. 1996) esto se debe a que es muy resistente a condiciones medioambientales adversas (Meyer et al. 1989).

En los últimos años se ha incrementado la demanda de alimentos libres de conservantes sintéticos, como consecuencia, la industria está interesada en identificar conservantes naturales para sustituir a los sintéticos utilizados en muchos productos comerciales. La adición de agentes antimicrobianos reduce o impide el crecimiento de microorganismos patógenos y de deterioro (Franssen et al. 2004).

La ε-polilisina es un antimicrobiano de origen natural que se produce a partir de la fermentación bacteriana aeróbica por *Streptomyces albulus*. Químicamente es un homopolímero catiónico de 25-30 residuos de L-lisina con un peso molecular de alrededor de 5000. Presenta un amplio espectro inhibitorio, es estable a altas temperaturas y bajo condiciones ácidas y alcalinas. Además, es soluble en agua, no tóxico y es un aditivo aprobado como un (GRAS) agente reconocido como seguros por la FDA (Chang et al. 2010; Shih et al. 2006). La capacidad antimicrobiana de ε-polilisina depende de su naturaleza catiónica, ya que se adsorbe en las superficies celulares cargadas negativamente de los microorganismos a través de interacciones electrostáticas, lo que promueve la disrupción de la membrana celular (Shima et al. 1984). La ε-Polilisina se encuentra cargada positivamente cuando el pH es inferior a su punto isoeléctrico (pI ≈ 9,0) (Yoshida y Nagasawa 2003), siendo esta la forma en que se encuentra en los alimentos. Sin embargo, la naturaleza catiónica de ε-Polilisina puede causar problemas cuando se utiliza en algunos alimentos y bebidas, debido a que forma precipitados insolubles con los componentes aniónicos en la matriz alimentaria, lo que lleva a un aumento en la turbidez o formación de sedimentos. También puede unirse a biopolímeros aniónicos en la boca, lo que produce astringencia o sensación de amargura. Por lo tanto, los atributos beneficiosos (antimicrobianos) y atributos perjudiciales (formación de precipitado y la sensación de amargura) de ε-Polilisina dependen de sus características eléctricas.

La natamicina se utiliza actualmente como un agente antimicrobiano para prevenir el deterioro superficial de queso. Es producida por *Streptomyces natalensis* y se emplea comúnmente en productos lácteos para evitar la contaminación con hongos y levaduras (El-Diasty et al. 2008). Este antimicrobiano fue aprobado como aditivo alimentario en más de 40 países y es considerado GRAS por la FDA (Koontz et al. 2003) y como un conservante natural por el Unión Europea (EEC Nº 235). Las actividades antifúngicas de natamicina dependen de su unión a los esteroles de la membrana de las células, principalmente ergosterol, el cual es el principal esterol de las membranas fúngicas, lo que las hace permeables (Pedersen 1992). Por lo tanto, es activo frente a los hongos, pero no contra las bacterias. La mayoría de los hongos son inhibidos por niveles de 0,5 a 6 ppm de natamicina, mientras que algunas especies requieren 10-25 ppm. En el caso de las levaduras, se necesita entre 1,0 a 5,0 ppm de natamicina para inhibir su crecimiento (Davidson y Zivanovic, 2003).

En base a lo comentado, el objetivo del presente trabajo fue determinar las MIC de los antimicrobianos naturales mencionados, necesarias para inhibir a *Z. bailii* en caldo y analizar su efecto antimicótico en sistemas que modelan salsas ácidas. Los resultados obtenidos serán utilizados para evaluar una posible aplicación de estos antimicóticos como agentes conservantes en salsas ácidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los medios utilizados para el cultivo, la preparación de los sistemas y el recuento del microorganismo fueron: caldo y agar Sabouraud (Biokar, Francia), goma goma xántica (Cargill, Argentina), que fue de grado alimentario y el ácido cítrico que fue de grado analítico (Anedra, Argentina).

Agentes antimicrobianos

Los antimicrobianos utilizados fueron ε-polilisina y natamicina (Handary, Bélgica). Para determinar las mínimas concentraciones inhibitorias se prepararon soluciones madre de los antimicrobianos estudiados:

a) *ε-polilisina:* Se elaboró una solución madre de 444,44 ppm de ε-polilisina. Para ello, primero se preparó una solución de caldo Sabouraud y se esterilizó en autoclave. Luego, se dispersó la ε-polilisina en forma de lluvia y se ajustó el pH a 3,50 y 4,50 por agregado aséptico de ácido cítrico (25% m/v), el cual se midió con un electrodo de vidrio acoplado a un pHmetro Fisher (USA), previamente calibrado con buffers de pH 4,00 y 7,00. Por último, se esterilizó por

filtración por membrana con una jeringa y un filtro estéril de un poro de 0,2 µm (Minisart, Sartoruis Argentina).
b) *Natamicina:* Se preparó una solución madre de 55,55 ppm de natamicina y se siguió la operatoria antes descripta.

Cepa utilizada y preparación del inóculo

Se utilizó *Zygosaccharomyces bailii* NRRL 7256 para representar la flora deteriorativa usualmente presente en salsas ácidas. Antes de su uso, *Z. bailii* fue inoculada en caldo Sabouraud y almacenada a 25,0 ± 0,5ºC durante 24 horas bajo una leve agitación (40 rpm), proporcionada por un agitador orbital (Vicking, Argentina). Una vez alcanzadas las 24 horas, se realizó un pasaje del inóculo a caldo Sabouraud fresco y se repitió el procedimiento de incubación. De esta manera, se obtuvieron cultivos de más de 10^8 UFC/ml de caldo. El inóculo obtenido se diluyó en agua de peptona hasta alcanzar una turbidez de 0,5 de la escala McFarland, que corresponde a una población de aproximadamente 10^6 UFC/ml. La turbidez fue medida con un turbidímetro (Densichek Biomerieux, Francia).

Determinación de las mínimas concentraciones inhibitorias de ε-polilisina y natamicina de Z. bailii en caldo Sabouraud a distintos valores de pH

Para determinar las MCI se aplicó la técnica de dilución en caldo empleando microplacas estériles de 96 pocillos (Kartell, Italia). Se prepararon diluciones sucesivas de las soluciones madre de los antimicrobianos utilizando como diluyente caldo Sabouraud a pH 3,50 y 4,50, previamente esterilizado. Se utilizó una microplaca por cada antimicrobiano. En cada microplaca, se colocaron por sextuplicado, alícuotas de 180 µl de cada dilución y pH en los pocillos, obteniendo en cada fila concentraciones decrecientes de los antimicrobianos. Luego, se agregaron 20 µl de un inóculo de 10^7 UFC/ml de *Z. bailii*. Las concentraciones de los antimicrobianos fueron corregidas por el agregado de los inóculos, logrando los valores finales que se muestran en la **Tabla 1**. La concentración final de *Z. bailii* en el pocillo fue de 10^6 UFC/ml.

Tabla 1. Rango de concentraciones finales de cada antimicrobiano en las microplacas.

	ε-polilisina (ppm)	**natamicina** (ppm)
Concentración mínima	12,50	1,56
Concentración máxima	400,00	50,00

La microplaca se incubó a 30ºC y se almacenó por 48 hs. Durante el almacenamiento, se midió el crecimiento a través del registro de las lecturas de absorbancia a 600 nm cada 2 h luego de agitar 30 s antes de cada lectura. 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. Se definió la MCI como la mayor dilución a la cual se observó inhibición del crecimiento microbiano después de 48 horas de incubación a 30°C (Espinel-Ingroff 1998, 2001). La misma se determinó comparando visualmente la turbidez de cada pocillo con controles negativos y uno positivo y, a través del registro de las lecturas de absorbancia. Los controles se prepararon en forma paralela, siendo los controles negativos caldo Sabouraud sin inocular a pH 3,50, 4,50 y sin ajustar pH, y el control positivo, caldo Sabouraud inoculado, sin ajustar pH y libre de antimicrobianos.

Cada microplaca se realizó por triplicado, utilizando distintos inóculos, y contuvo 6 réplicas de cada fila.

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

$$Ln\left(\frac{ABSt}{ABS0}\right) = A.exp\left\{-exp\left[1 + \mu_m \frac{e}{A}(\lambda - t)\right]\right\}_{(1)}$$

donde ABS_0 es la absorbancia a tiempo inicial; ABSt es la absorbancia a tiempo t; μ_m 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, Biesta Peters et al. 2010).

Para comprobar el ajuste de las ecuaciones aplicadas se realizó un análisis de la varianza factorial. Se obtuvieron los coeficientes de correlación ajustados (R^2aj) 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 del test de Tukey para la comparación de medias. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Statgraphics® (Statgraphics Centurion para Windows 7, 2005, USA). En todos los casos, la significatividad estadística se evaluó a un nivel del 5% ($p \leq 0,05$).

Determinación de las mínimas concentraciones fungicidas de ε-polilisina y natamicina de Z. bailii en caldo Sabouraud a distintos valores de pH

Para determinar las MCF se tomaron 20µl de cada pocillo donde el crecimiento había sido inhibido y se sembraron en placas con agar Sabouraud libres de antimicrobianos. Las placas se incubaron a 25ºC durante 48 horas. La MCF se definió como la menor concentración donde no se observó crecimiento o crecieron menos de tres colonias (99,9% de muerte) (Espinel Ingroff 1998, 2001).

Efecto de los antimicrobianos sobre el crecimiento de Z. bailii en sistemas acuosos que modelan salsas ácidas

Se formularon sistemas modelo acuosos en caldo Sabouraud, conteniendo 1,818% de goma xántica, con distintas concentraciones de ε-polilisina (0, 300, 600, 1200, 1500, 3000 y 4500 ppm) y natamicina (0, 50 y 100 ppm). Para ello, primero se prepararon soluciones de caldo Sabouraud en agua destilada en frascos de vidrio de base circular, se dispersaron los antimicrobianos en las cantidades correspondientes y se agitó por una hora. Luego, se agregó en forma de lluvia la goma xántica y se dejó en agitación 24 horas para su hidratación. Los sistemas así constituidos fueron sometidos a un tratamiento térmico. Los sistemas con ε-polilisina se esterilizaron a 95°C durante 11 minutos, en estas condiciones solo pierde un 10% de actividad antimicrobiana. Los sistemas con natamicina se esterilizaron a 95°C durante 15 minutos, siguiendo las recomendaciones de proveedor.

El pH fue ajustado a 3,50 por agregado aséptico de una solución de ácido cítrico (25% m/v). Los sistemas modelo fueron inoculados con *Z. bailii*, alcanzando una población inicial de 10^4 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. A tiempo inicial, a las 24 y 48 horas se extrajeron muestras y se determinó el crecimiento de la levadura por recuento en superficie en placas con agar Sabouraud. Las placas se incubaron a 25°C ± 0,5°C y luego de 5 días se llevaron a cabo los recuentos.

Los logaritmos de los recuentos de *Z. bailii* en los distintos sistemas modelo fueron analizados mediante ANOVA y a posteriori por el test de Tukey para la comparación de medias ($p < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de las mínimas concentraciones inhibitorias de ε-polilisina y natamicina de Z. bailii en caldo Sabouraud a distintos valores de pH

Los antimicrobianos estudiados fueron capaces de inhibir el crecimiento de la levadura. Los valores de las MCI variaron, dependiendo del preservador y del pH (**Tabla 2**). El rango de MCI obtenido para los antimicrobianos coincide con valores reportados en trabajos previos para levaduras (Shima et al. 1984, Davidson y Zivanovic 2003, Yoshida y Nagasawa 2003).

La natamicina presentó menores valores de MCI a los dos valores de pH. Esto sugiere que este antimicrobiano es muy efectivo para controlar el desarrollo de *Z. bailii* en medio líquido. La ε-polilisina fue más efectiva a pH 3,50 que a 4,50 presentando una MIC menor. Sin embargo, la natamicina presentó la misma MIC para los dos pH analizados. Arroyo-López et al. (2012) observaron que el ácido cítrico ejerce un efecto antagónico sobre la natamicina frente a la inhibición de las levaduras deteriorativas presentes en aceitunas. La pérdida de actividad podría ser ocasionada por la hidrólisis del antimicrobiano en medio ácido.

Tabla 2. Mínimas concentraciones inhibitorias (MIC) y mínimas concentraciones fungicidas (MFC) obtenidas.

pH	**MIC** (ppm)		**MFC** (ppm)	
	ε-polilisina	Natamicina	ε-polilisina	Natamicina
3,50	50,00	6,25	>400	>100
4,50	100,00	6,25	>400	>100

Las curvas de crecimiento de concentraciones subinhibitorias de los antimicrobianos se modelaron satisfactoriamente con el modelo propuesto (ecuación 1) obteniéndose valores de R^2aj de aproximadamente 0,99 y valores de CME menores que 0,007.

En las **Figuras 1** y **2** se muestran los parámetros de crecimiento de *Z. bailii*, en función del contenido de ε-polilisina, natamicina y del pH. Tanto la concentración de los antimicrobianos como el pH influyeron en la velocidad específica de crecimiento (μ_m) y en el valor asintótico (A) de la levadura.

En el caso de la ε-polilisina, μ_m disminuyó significativamente con respecto al control (sin antimicrobiano) a partir de 25 ppm de ε-polilisina para los dos pH (Figura 1, panel I). Se puede observar que a igual concentración de antimicrobiano, la reducción del pH a 3,50, disminuyó significativamente la μ_m. Esto era lo esperado, ya que, al agregar un factor más de estrés a la levadura, disminuye su desarrollo. Con respecto al parámetro A, este fue más sensible, ya que al agregar menor concentración de ε-polilisina (12,5 ppm) disminuyó significativamente A, para los dos pH, con respecto a los sistemas sin antimicrobiano. Además, se observó la misma tendencia que en μ_m: a igual concentración de ε-polilisina la reducción de pH a 3,50, disminuyó significativamente A (**Figura 1**, Panel II). Cabe destacar que, el sistema control, sin ajuste de pH y sin agregado de ε-polilisina, tuvo valores significativamente mayores de μ_m (0,551 ± 0,038 h^{-1}) y A (3,41 ± 0,16) con respecto al resto de los sistemas (datos no mostrados). La μ_m y A correspondiente al sistema de pH 3,50 no aparece en la **Figura 1** ya que no hubo crecimiento. 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).

La eficacia antimicrobiana de ε-polilisina previamente se ha atribuido a su capacidad de interactuar y alterar las membranas celulares aniónicas, lo que conduce a la liberación de material intracelular (Chang et al. 2012). En trabajos previos se encontró que la modificación química de los grupos α-amino de la ε-polilisina disminuyó la actividad antimicrobiana. El mecanismo propuesto del efecto inhibidor de ε-polilisina en el crecimiento microbiano es su adsorción electrostática sobre la superficie celular de los microorganismos, en base a su propiedad catiónica, dando lugar a separación de la membrana externa y la distribución anormal de citoplasma, como se observa por microscopía electrónica (Shima et al. 1984).

Con respecto a la natamicina, μ_m disminuyó significativamente con respecto al control (sin antimicrobiano) a partir de 1,56 ppm del antimicrobiano para los dos pH (**Figura 2**, panel I). Este antimicrobiano es un potente inhibidor ya que a muy bajas concentraciones disminuye el crecimiento de la levadura. Las actividades antifúngicas de natamicina y otros polienos dependen de su unión a los esteroles de la membrana celular, principalmente ergosterol, el esterol principal de las membranas fúngicas, lo que las hace permeable (Pedersen 1992). Con respecto al efecto del pH, en ausencia de natamicina, la μ_m a pH 4,50 fue significativamente mayor que a pH 3,50. Al agregar una concentración de 1,56 ppm del antimicrobiano no se observaron diferencias significativas entre las μ_m a los dos pH. Sin embargo, esta tendencia se revirtió al aumentar la concentración de natamicina a 3,13 ppm, donde μ_m a pH 3,50 fue significativamente mayor que a pH 4,50. Con respecto al parámetro A, en este caso fue menos sensible que μ_m. Solo se observaron diferencias significativas (disminución de A) a pH 4,50 y 3,13 ppm de natamicina (**Figura 2**, Panel II). Cabe destacar que, el sistema control, sin ajuste de pH y sin agregado de natamicina, tuvo valores significativamente mayores de μ_m (0,481 ± 0,015 h^{-1}) y A (3,37 ± 0,09) con respecto al resto de los sistemas (datos no mostrados). Por lo tanto, la disminución del pH afectó la actividad antimicrobiana de la natamicina. Esta tendencia esta relaciona con lo reportado por Arroyo-López et al. (2012), quien obtuvo en trabajos previos que concentraciones progresivas de ácido cítrico disminuyeron el efecto antimicrobiano de la natamicina, el cual, sólo se observó por debajo de una concentración de ácido cítrico de 0,15% m/v. Según los resultados obtenidos, no sería aconsejable el uso de la natamicina en forma conjunta con ácido cítrico debido a los efectos antagónicos observados entre ambos conservantes.

En relación con la naturaleza del antimicrobiano, la natamicina fue más efectiva que la ε-polilisina en el descenso de la μ_m y A de *Z. bailii* para cada nivel de pH, ya que, a menor concentración logró la inhibición del crecimiento de la levadura.

Determinación de las mínimas concentraciones fungicidas de ε-polilisina y natamicina de Z. bailii en caldo Sabouraud a distintos valores de pH

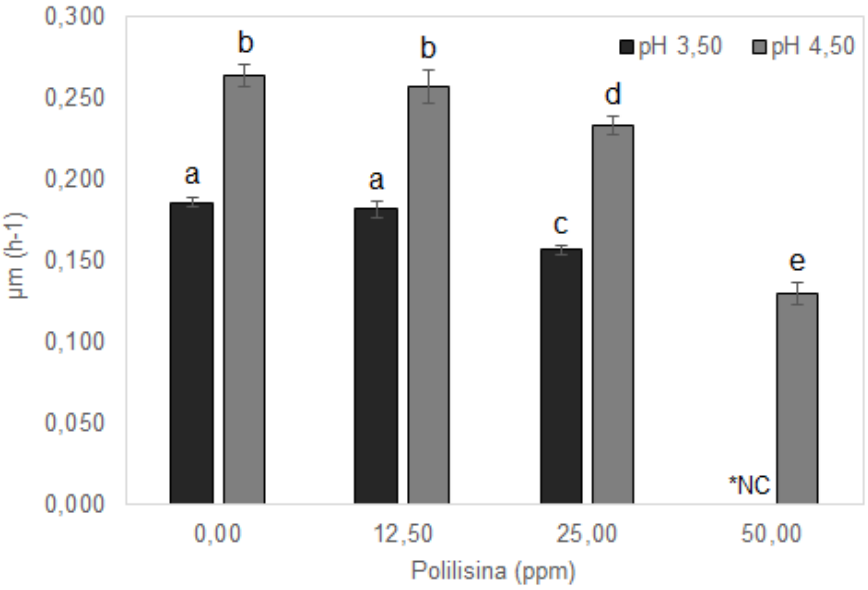
Aunque se habían observado efectos inhibitorios de los antimicrobianos sobre *Z. bailii*, ninguna de las concentraciones ensayadas resultó fungicida (**Tabla 2**). Esta tendencia confirma que los antimicrobianos estudiados no pueden ser utilizados como único método de preservación, sino que deben ser combinados con otros factores de estrés en el marco de la tecnología de barreras.

Efecto de los antimicrobianos sobre el crecimiento de Z. bailii en sistemas acuosos que modelan salsas ácidas

Se analizó el efecto de los antimicrobianos en sistemas modelo que simulan salsas ácidas a través de los logaritmos de los recuentos de *Z. bailii*. Debido a que estos sistemas estaban formulados con goma xántica, la cual según estudios previos puede ser utilizada como fuente de carbono por *Z. bailii* (Zalazar et al. 2016), se ensayaron concentraciones de antimicrobianos mayores a las necesarias para inhibir el crecimiento en medio líquido.

El efecto inhibidor de la ε-polilisina sobre el crecimiento de *Z. bailii* no fue observado en las concentraciones ensayadas (0, 300, 600, 1200 ppm; **Figura 3**, Panel I). Al tiempo inicial no hubo efecto, pero a las 24 hs y 48 hs disminuyó significativamente el crecimiento de la levadura con 600 y 1200 ppm del antimicrobiano (**Figura 3**, Panel I). Sin embargo, estos niveles del antimicrobiano no fueron suficientes para inhibir el crecimiento de *Z. bailii*. A partir de estos resultados, se formularon sistemas con concentraciones mayores de ε-polilisina pero, luego de 24 hs de hidratar la goma xántica, de adicionar el antimicrobiano y ajustar el pH a 3,50, la suspensión se inestabilizó observándose separación de fases y sinéresis. A concentraciones de ε-polilisina mayores a 1500 ppm, los sistemas se volvían menos viscosos y se observaba la formación de un precipitado, por lo cual, no se pudo determinar el crecimiento de la levadura. Estos resultados sugieren que podría haber una interacción entre la goma xántica y la ε-polilisina, debido a que son compuestos con cargas opuestas. Resultados previos (Yoshida y Nagasawa, 2003) indican que la presencia de polímeros aniónicos, tales como ácido metafosfórico, disminuye la actividad antimicrobiana de ε-polilisina, debido a la pérdida de su carga catiónica. Por otra parte, Chang et al. (2014) utilizaron goma arábica como un biopolímero aniónico para interactuar con ε-polilisina y formar complejos electrostáticos y obtuvieron que altos niveles degoma arábica en complejos con polilisina mejoraron la estabilidad física, pero redujeron la actividad antimicrobiana. En consecuencia, la elección y cantidad del agente estabilizante y del antimicrobiano en las salsas ácidas deben ser cuidadosamente seleccionados a fin de optimizar su actividad antimicrobiana, sin afectar negativamente a la apariencia del producto o la estabilidad.

I



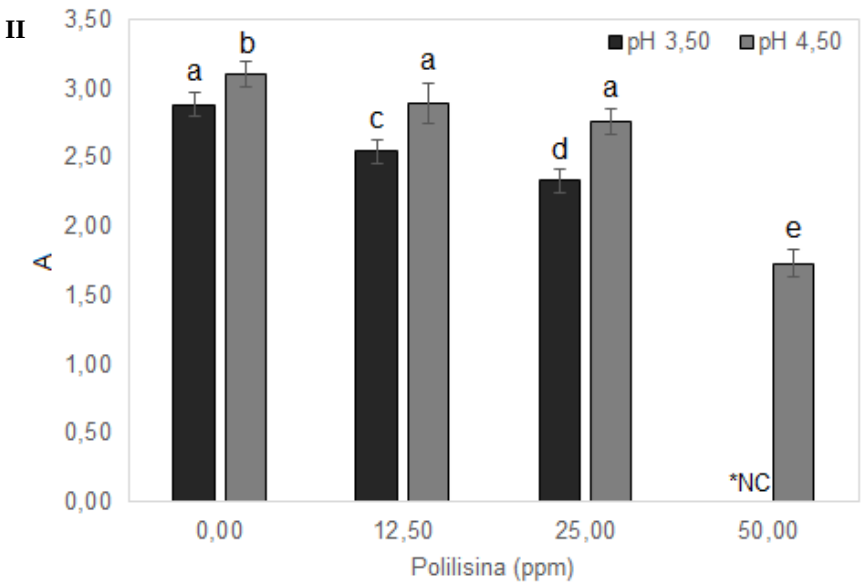


Figura 1. Efecto de la ε-polilisina y del pH sobre los parámetros de crecimiento de *Z. bailii* en caldo Sabouraud. Panel I: velocidad especifica de crecimiento, μ_m (h^{-1}). Panel II: Valor asintótico (A). Dentro de cada panel, las barras marcadas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$; test de Tukey). Las barras verticales representan la desviación estándar de los promedios. NC*: no se detectó crecimiento.

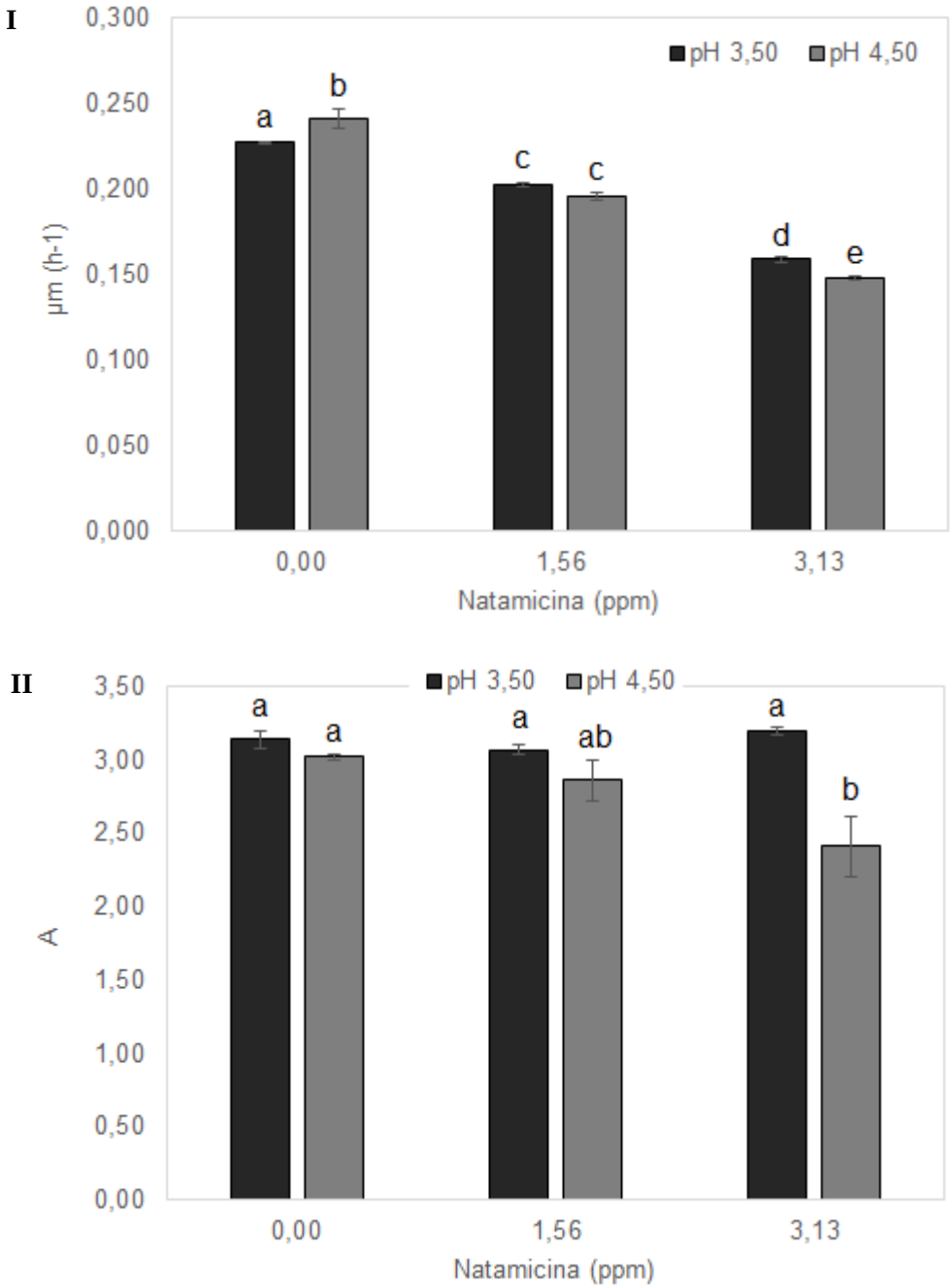


Figura 2. Efecto de la natamicina y el pH sobre los parámetros de crecimiento de *Z. bailii* en caldo Sabouraud. Panel I: velocidad especifica de crecimiento, μ_m (h^{-1}). Panel II: Valor asintótico (A). Dentro de cada panel, las barras marcadas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$; test de Tukey). Las barras verticales representan la desviación estándar de los promedios.

En cuanto al empleo de natamicina, la adición de bajas concentraciones a los sistemas conteniendo goma xántica permitió inhibir el crecimiento de *Z. bailii* (**Figura 3**, Panel II). Al tiempo inicial del ensayo no se obtuvieron diferencias significativas entre los sistemas con 0, 50 y 100 ppp de natamicina, pero a las 24 hs, ya se observó la inhibición en el crecimiento con las dos concentraciones del antimicrobiano ensayadas (**Figura 3**, Panel II). A los distintos tiempos ensayados (0, 24 y 48 hs) no se observaron diferencias significativas en el crecimiento entre los sistemas con 50 y 100 ppm de natamicina. Además, en estos sistemas disminuyó significativamente el crecimiento comparado con el control sin natamicina a las 24 y 48 hs. Por este motivo la natamicina sería un antimicrobiano más adecuado que la ε-polilisina para incorporar a suspensiones conteniendo goma xántica.

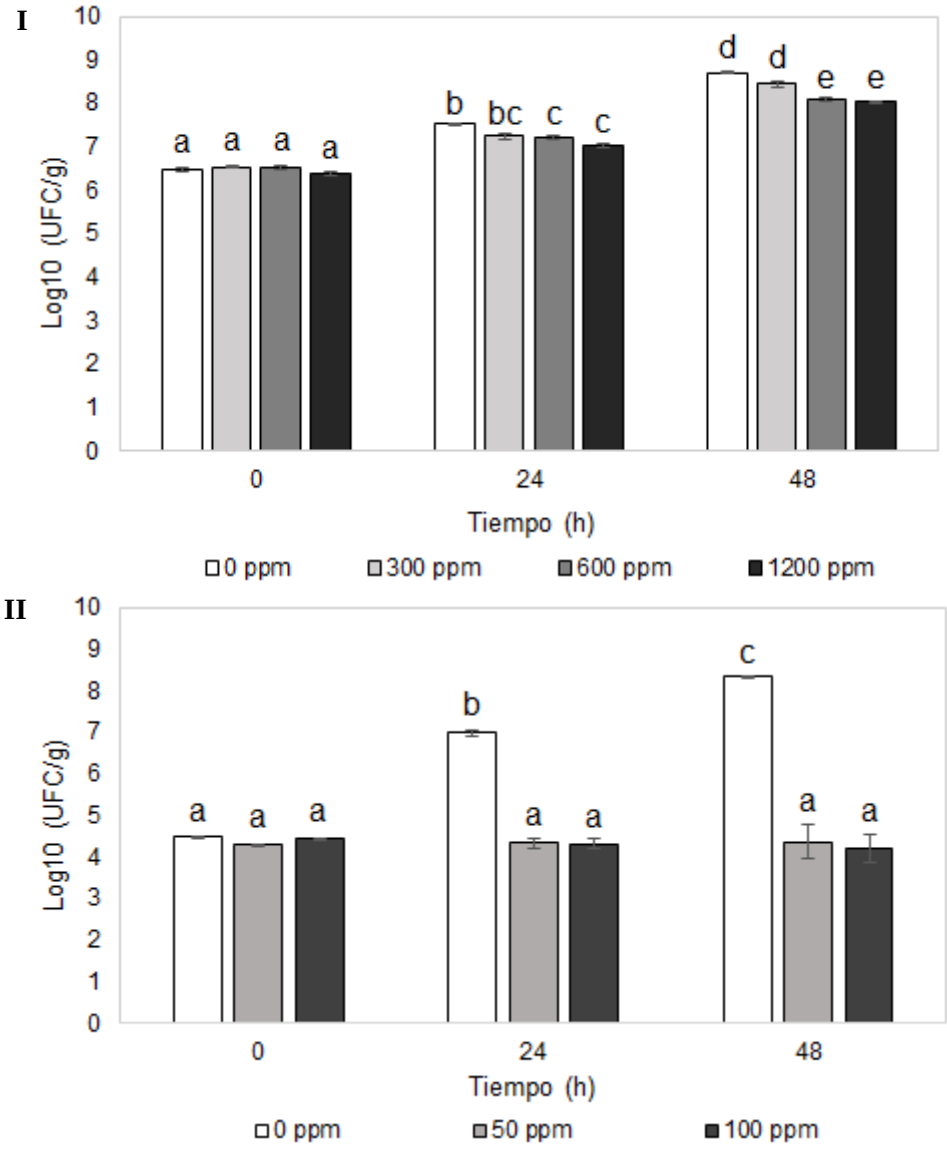


Figure 3. Efecto de los antimicrobianos sobre el crecimiento de *Z. bailii* en sistemas acuosos en el tiempo. Panel I: ε-polilisina (0, 300, 600 y 1200 ppm) y Panel II: natamicina (0, 50 y 100 ppm). Las barras marcadas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$; test de Tukey). Las barras verticales representan la desviación estándar de los promedios.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo podemos destacar que:

- En caldo Sabouraud los dos antimicrobianos utilizados inhibieron el crecimiento de *Z. bailii*, siendo más efectiva la natamicina. Este efecto dependió del pH.
- No es aconsejable el uso de la natamicina en forma conjunta con ácido cítrico debido a los efectos antagónicos observados entre ambos conservantes.
- En sistemas dispersos conteniendo goma xántica, las concentraciones de ε-polilisina utilizadas no fueron efectivas para inhibir el crecimiento de la levadura y mayores concentraciones promovieron la separación de fases en la suspensión. Sin embargo, 50 ppm de natamicina fueron suficientes para inhibir el crecimiento de *Z. bailii.*

Estos resultados muestran la importancia de la correcta selección de los factores de estrés a aplicar para inhibir el desarrollo de *Z. bailii*, principal levadura deteriorativa de las salsas ácidas.

BIBLIOGRAFÍA

Arroyo-López FN, Bautista-Gallego J, Romero-Gil V, Rodríguez-Gómez F, Garrido-Fernández A. 2012. Growth/no growth interfaces of table olive related yeasts for natamycin, citric acid and sodium chloride. International Journal of Food Microbiology, 155: 257–262.

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.

Chang SS, Lu WYW, Park SH, Kang DH. 2010. Control of foodborne pathogens on ready-to-eat roast beef slurry by e-polylysine. Int. J. Food Microbiol, 141: 236-241.

Chang Y, McLandsborough L, McClements DJ. 2012. Cationic Antimicrobial (ε-Polylysine)-Anionic Polysaccharide (Pectin) Interactions: Influence of Polymer Charge on Physical Stability and Antimicrobial Efficacy. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60: 1837-1844.

Chang Y, McLandsborough L, McClements DJ. 2014. Antimicrobial delivery systems based on electrostatic complexes of cationic 3-polylysine and anionic gum Arabic. Food Hydrocolloids. 35: 137-143.

Couto, MMB, Hartog BJ, Veld JHJHI, Hofstra H, van der Vossen, JMBM. 1996. Identification of spoilage yeasts in a food-production chain by microsatellite polymerase 310 chain reaction fingerprinting. Food Microbiology. 13: 59-67.

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.

Davidson PM y Zivanovic S. 2003. The use of natural antimicrobials. En P. Zeuthen y L. Bogh-Sorensen, editores. Food Preservation Techniques. A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. USA. pag 5-30.

Doores S. 2005. Organic Acids. En Davidson PM, Sofos JN, Branen AL, editores. Antimicrobials in Food. 3ª ed. New York. pag 91–142.

El-Diasty E, El-Kaseh R, Salem R. 2008. The effect of natamycin on keeping quality and organoleptic characters of yoghurt. Arab Journal of Biotechnology, 12: 41-48.

Espinel-Ingroff A. 1998. Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. J. Clin. Microbiol, 36:2950–2956.

Espinel-Ingroff A. 2001. In vitro fungicidal activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. J. Clin. Microbiol, 39:954–958.

Franssen L, Rumsey T, Krochta J. 2004. Whey protein film composition effects on potassium sorbate and natamycin diffusion. Journal of Food Science, 69: 347-350.

Koontz J, Marcy J, Barbeau W, Duncan S. 2003. Stability of natamycin and its cyclodextrin inclusion complexes in aqueous solution. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 7111-7114.

Meyer RS, Grant MA, Luedecke LO, Leung HK. 1989. Effects of pH and water activity on microbiological stability of salad dressing. Journal of Food Protection, 52: 477-479.
Monu EA, Techathuvanan C, Wallis A, Critzer FJ, Davidson PM. 2016. Plant essential oils and components on growth of spoilage yeasts in microbiological media and a model salad dressing. Food Control, 65: 73-77.
Ratkowsky DA. 2004. Model fitting and uncertainty. En McKellar RC y Lu X, editores. Modeling Microbial Responses in Foods. CRC Press, Boca Raton, USA. pag 233-242.
Pedersen JC. 1992. Natamycin as a Fungicide in Agar Media. Applied and Environmental Microbiology, 58: 1064-1066.
Piper P, Ortiz Calderon C, Hatzixanthis K, Mollapour M. 2001. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. Microbiology, 147: 2635-2642.
Russell NJ y Gould GW. 1991. Food Preservatives. 2ª ed. Blackie and Son Ltd. Springer US. pag 14-22.
Shima S, Matsuoka H, Iwamoto T, Sakai H. 1984. Antimicrobial action of ε-polyL-lysine. J. Antibiot., 37 (11): 1449-1455.
Shih, IL, Shen MH, Van YT. 2006. Microbial synthesis of poly (-lysine) and its various applications. Bioresource Technology, 97: 1148-1159.
Yoshida T, Nagasawa T. 2003. ε-Poly-l-lysine: microbial production, biodegradation and application potential. Appl Microbiol Biotechnol, 62: 21–26.
Zalazar A.L., Gliemmo M.F., Campos C.A., (2016). Effect of stabilizers, oil level and structure on the growth of *Zygosaccharomyces bailii* and on physical stability of model systems simulating acid sauces, Food Research International, 85: 200-208

AGRADECIMIENTOS
Los autores agradecen el apoyo económico de la Universidad de Buenos Aires, de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina.

Potencialidad de proteínas alimentarias como carriers de ácido fólico

Zema P., Pilosof A.M.R.

CONICET – Universidad de Buenos Aires, Argentina.
Dirección de e-mail: pzema@di.fcen.uba.ar

RESUMEN

La deficiencia de ácido fólico (AF) durante estadios tempranos del embarazo es causante de enfermedades conocidas como defectos del tubo neural. Los folatos, también tienen impacto en la prevención de enfermedades cardiovasculares, Alzheimer y en algunos tipos de cáncer. La fortificación de alimentos con esta vitamina podría contribuir a una mejora de la ingesta en grupos vulnerables. Se ha reportado que algunas proteínas tienen la capacidad de ligar AF, actuando como vehículos y protegiéndolo de factores ambientales y de condiciones del procesamiento. En este contexto, se estudió la potencialidad de la β-lactoglobulina (β-lg) y de una gelatina ácida de origen porcino (GA) de actuar como carriers de AF. Se evaluaron sistemas con concentraciones variables de proteína y AF a pH 7 y 3. Se llevó a cabo la determinación del tamaño de las partículas formadas, mediante técnicas de dispersión de luz. La evaluación del grado de unión de AF a las proteínas se determinó por ultrafiltración, y la cuantificación del bioactivo libre se determinó por espectrofotometría. Se midió el potencial zeta (ζ) de los componentes puros y de los sistemas mixtos y se lo relacionó con la capacidad de unión al AF. Se encontró que la interacción del AF con la β-lg y la GA es de carácter iónico y reversible a pH 7, lo cual resulta de importancia para asegurar la biodisponibilidad de la vitamina.

Palabras Clave: Ácido fólico, β-lactoglobulina, gelatina, tamaño de partículas, potencial zeta.

ABSTRACT

Folic acid (AF) deficiency at pregnancy early stages can cause neural tube defects. In other life phases, folates can prevent cardiovascular diseases, Alzheimer and certain types of cancer. Food fortification with this vitamin could improve its intake in vulnerable groups. The ability of some food proteins to bind FA, acting as carriers and therefore, protecting it from processing conditions has been previously reported. In this work, β-lactoglobulin (β-lg) and an acid gelatin of porcine origin (GA), were evaluated as AF carriers. Variable protein and AF concentration systems were studied at pH 7 and 3. Particle size distribution was determined by dynamic and static light scattering. The percentage of AF bound to each protein was evaluated by ultrafiltration, quantifying the free vitamin spectrophotometrically. It was found to be nearly 100% for pH 3 systems while at pH 7 it was almost 0%. Zeta potential (ζ) was measured and was related to the vitamin binding capacity. AF interaction with β-lg and GA would be electrostatic and reversible at pH 7. This fact is relevant as it would guarantee AF bioavailability.

Keywords: Folic acid, β-lactoglobulin, gelatin, particle size, zeta potential.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas alimentarias ofrecen un gran potencial como materias primas para la preparación de nano y micropartículas que puedan ser vehículos de componentes bioactivos. Entre sus propiedades podemos enumerar su biodegradabilidad, digestibilidad, bajo costo, y su capacidad de interactuar con una gran variedad de compuestos, mediante sus numerosos grupos funcionales (Penalva et al. 2015).En este marco, la β-lg, proteína mayoritaria del suero lácteo, cobra un importante papel debido a sus notables propiedades funcionales y su capacidad de unir ligandos de diversas características, entre los que podemos citar al retinol, ácidos grasos y una variedad de polifenoles (Liang y Subirade 2012; von Staszewski et al. 2014). La gelatina, por su parte, es un producto derivado del colágeno, una proteína fibrosa y principal constituyente de la piel, huesos y tejido conectivo de animales. Es una fuente altamente concentrada de proteínas (>83%), no contiene azúcares, colesterol

u otras grasas. Es altamente digerible y rápidamente absorbida por el organismo, mostrando un bajo comportamiento alergénico (Schrieber y Gareis 2007).

Los folatos son un grupo de compuestos heterocíclicos basados en el esqueleto de ácido 4-((pteridin-6-metil amino) benzoico conjugado con uno o más residuos de ácido L-glutámico. La molécula de ácido fólico, con el anillo de pteridina completamente oxidado, no está presente en la naturaleza en cantidades significativas, aunque es la estructura más estable y, por tanto, la forma sintética utilizada en la elaboración de alimentos enriquecidos. Los folatos intervienen en procesos biológicos fundamentales, como la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, por lo que una ingesta adecuada de estos es muy importante, ya que puede prevenir enfermedades congénitas, como los defectos del tubo neural (Refsum 2001). También se ha reportado el papel del AF en la prevención de enfermedades cardiovasculares, anemia megaloblástica, cáncer colorectal y Alzheimer (Molloy y Scott 2001). A pesar de ser el más estable entre los folatos, el AF presenta una marcada sensibilidad a la luz ultravioleta y al calor, que lo degrada en compuestos sin actividad biológica, (Akhtar et al. 1999; Vora et al. 2002). Y es en este contexto que las proteínas adquieren relevancia como carriers, con la potencialidad de proteger a esta vitamina esencial de los efectos adversos durante el procesado y cocción de los alimentos, así como también mejorando su biodisponibilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se empleó β-lactoglobulina BioPURE en polvo de Davisco Foods International, Inc. (Le Sueur, Minnesota, Estados Unidos) (>97,8 % de proteína b.s.) siendo β–lactoglobulina el 93,6% del total de proteínas, 0,3% de grasa, 1,8% de ceniza y 5,0 % de humedad. La gelatina ácida de origen porcino fue gentilmente donada por Rousselot Argentina S.A. (Hurlingham, Argentina). El punto isoeléctrico de esta muestra es 8,85. El AF de DSM Nutritional Products Argentina S.A. (pureza 99,5%, base seca), fue gentilmente donado por laboratorios Bagó (La Plata, Argentina).

Preparación de las soluciones

La β-lg y el AF en polvo fueron disueltos en forma separada bajo agitación, en agua bidestilada, a temperatura ambiente. Las soluciones de β-lg (0,1 – 10% p/p) se mantuvieron a 4°C, 24 h previo a la medición, lo cual aseguró su completa hidratación. Las soluciones de AF (0,025 – 2,50% p/p) fueron preparadas diariamente, para cada experimento. Las soluciones de gelatina fueron preparadas el mismo día del experimento disolviendo el polvo en agua bidestilada y calentando bajo agitación durante 15 minutos a 80ºC, luego se dejaron enfriar y se mantuvieron a 35ºC para evitar la agregación. Todos los experimentos con GA fueron realizados a 35ºC. En todos los casos, el pH se ajustó a 7 con NaOH. Los sistemas mixtos fueron preparados por mezclado bajo agitación de las soluciones a pH 7 al doble de la concentración final requerida. Un set de estas muestras se llevó a pH 3 con HCl y se mantuvo en agitación por 90 min antes de realizar las determinaciones.

Evaluación del grado de unión de AF

El porcentaje de AF unido a la β-lg se determinó por diferencia entre la cantidad de AF agregada y la no asociada (AF libre), de acuerdo con Arzeni (2014). Esta se determinó por ultrafiltración con filtros de centrifuga de corte molecular de 10K (AmiconR Ultra-15, Millipore, Irlanda). Primero, se centrifugaron 5 ml de las mezclas o del blanco (AF 0,025 - 1,25%, pH 7) en tubos de plástico de 15 ml (12857 x g, 15 min, 20°C). A continuación, se trasvasaron 3 ml del sobrenadante al filtro (previamente tarado), se pesó y se centrifugó (5000 x g, 15 min, 20°C). Se pesó el tubo donde se recuperó el filtrado. Este se diluyó al 50% en DMSO:H2O (50:50) y se realizó la lectura espectrofotométrica de su absorbancia a 365 nm. Se realizó una curva de calibración de AF (Zhang et al. 2011).

La cantidad de AF unido (%AFU) se calculó, considerando la densidad de las soluciones igual a la del agua, de la siguiente manera:

$$\%\mathrm{AFU} = \left[1 - \frac{(M_1 C_1 + F_{ad})}{M_o C_0}\right] x100 \qquad (1)$$

donde, $F_{ad} = M_{0,F}C_{0,F} - M_{1,F}C_{1,F}$ es la cantidad de AF adsorbido en la membrana del filtro; $M_{(X)}$ es la masa y $C_{(X)}$ es la concentración de (X): (0) la solución inicial;

(1) el filtrado; (0,F) la solución del blanco inicial; (1,F) el filtrado del blanco. Se informan los valores de, al menos, dos duplicados por muestra.

Determinación de tamaño de partícula

El impacto del AF en la distribución del tamaño de partícula se determinó mediante las técnicas de dispersión dinámica (DLS) y estática (SLS) de luz, de acuerdo al rango de tamaño en estudio.

Dispersión dinámica de luz: Los sistemas con tamaño de partícula dentro de un rango de 0,6 nm a 6 μm, fueron medidos en un analizador Zetasizer Nano-Zs, de Malvern Instruments (Worcestershire, Reino Unido). El equipo cuenta con un láser He-Ne (633 nm) y un correlador digital Modelo ZEN3600. Las mediciones se realizaron a un ángulo fijo de 173°, a 25ºC, colocando las soluciones dentro de cubetas de poliestireno descartables. A partir de 10 lecturas secuenciales, se determinó el diámetro hidrodinámico promedio y, mediante el método de CONTIN, se obtuvo la distribución de tamaño de partículas/agregados en intensidad. Luego, se utilizó el método de cumulantes para calcular el tamaño promedio (diámetro hidrodinámico promedio o Z-average). Se informa el promedio de, al menos, dos repeticiones por muestra.

*Dispersión estática de luz:*Los diámetros promedio y las curvas de distribución de tamaño de partícula se determinaron también por SLS en un equipo Mastersizer 2000 con una unidad de dispersión Hydro 2000MU provisto con un láser He-Ne (633 nm) (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). El rango de medición del equipo se encuentra entre los 0,1 μm a 1000 μm. La velocidad de la hélice se mantuvo en 1800 rpm. El tamaño de partícula se informa como el diámetro promedio de volumen-superficie o diámetro de Sauter ([D3,2] = Σ ni di3/Σ ni di2) donde ni es el número de partículas de diámetro di (Huang et al. 2001; Leroux et al. 2003). Este parámetro brinda una medida del diámetro promedio en donde se encuentran la mayoría de las partículas. Se informa el promedio de, al menos, dos repeticiones por muestra.

Determinación del potencial zeta (ζ)

La medición del potencial zeta (ζ) también fue llevada a cabo en el equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Éste se evalúa a partir de la movilidad electroforética de las partículas. Las soluciones fueron diluidas 5 veces en agua bidestilada de igual pH y se colocaron en celdas capilares especiales (DTS1061, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

Microscopía láser confocal

Se tomaron imágenes de los sistemas con β-lg con y sin AF mediante un microscopio láser confocal (Modelo FV300, Olympus, Reino Unido), provisto de un láser He–Ne (543 nm). Se usó un objetivo PLAN APO 60X y un zoom digital de 2.5X. Se marcó la proteína de manera no covalente con unas gotas de solución de rodamina B al 10% p/p (λexc= 560 nm; λem max = 625 nm). Se adquirieron imágenes digitales en formato TIFF en 1024 x 1024 píxeles de resolución, a través del programa de adquisición de imágenes FluoView™, de Olympus.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluó el grado de unión del ácido fólico a las proteínas en estudio a pH 7 y 3. En el caso de la β-lg, la concentración utilizada fue de 5% p/p, mientras que la de AF varió entre 0,025 y 1,25% p/p. En todas las relaciones estudiadas, el porcentaje de AF unido fue nulo a pH 7 y del 100% a pH 3, hallándose resultados similares en la bibliografía, para nanopartículas de clara de huevo (Arzeni et al. 2015). La gelatina fue empleada en una concentración de 0,5% p/p y todos los ensayos se realizaron a 35ºC para evitar su agregación y gelificación. Para este ensayo se utilizó la mayor relación de concentraciones (AF/GA = 0,25), siendo la concentración de AF 0,125%. A pH 7 se determinó un porcentaje de unión del 9,8%, mientras que a pH 3, fue del 100%.

A continuación se evaluó el tamaño de partícula de los sistemas mixtos en comparación con el de las proteínas puras, por dispersión de luz, a pH 3. En la **Figura 1** se observa el diámetro promedio, en función del incremento de la concentración de AF, para los sistemas con β-lg. A bajas concentraciones del bioactivo, las partículas se encuentran dentro del rango nanométrico, incrementándose notoriamente su tamaño hasta una concentración de ≈ 0,2%, a partir de la cual se alcanza un tamaño constante cercano a los 30 μm. En estas condiciones, los sistemas se vuelven inestables, con tendencia a la floculación. Se ha reportado que el AF presenta un mínimo de solubilidad en agua a pH 3 (Wu et al. 2010), por lo que se realizaron observaciones de los sistemas mediante

microscopía láser confocal (CSLM, sus siglas en inglés) para determinar si los agregados medidos por dispersión estática y dinámica de luz eran agregados de proteína generados por la interacción con AF, o se trataba de AF autoensamblado.

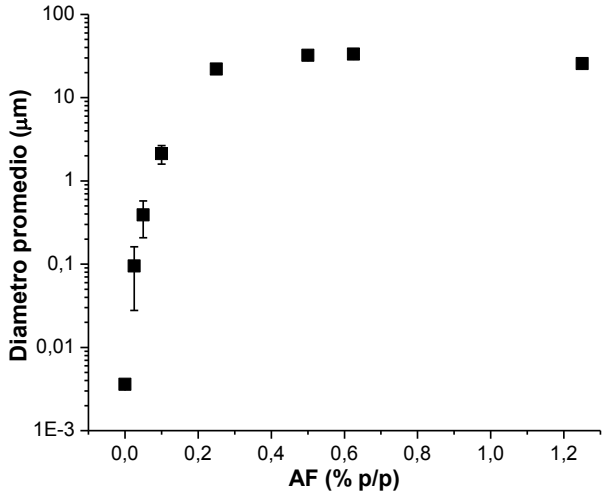


Figura 1. Diámetro promedio de partículas de β-lg (5% p/p) a concentraciones crecientes de AF.

La **Figura 2** muestra en primer lugar los sistemas puros, AF (A) y β-lg (B) con una microestructura homogénea, en el primer caso debido exclusivamente a la presencia de Rodamina, que no posee afinidad por la vitamina y en el caso de la proteína, debido a que al pH estudiado, ésta se encuentra en su forma monomérica (Uhrínová et al. 2000), por lo que se trata de partículas nanométricas, no diferenciables por la técnica. En los sistemas mixtos (C y D) se observan agregados proteicos de tamaños crecientes con el aumento de la concentración del AF. Estas observaciones corroboran los resultados de las medidas realizadas por dispersión de luz.

Con respecto a los sistemas con GA, en la **Tabla 1** se muestran los resultados correspondientes a la mínima y máxima relación de concentraciones. Se observa un incremento del tamaño de partículas con el aumento de la concentración de AF, siendo este, sin embargo, menor al observado para la β-lg.

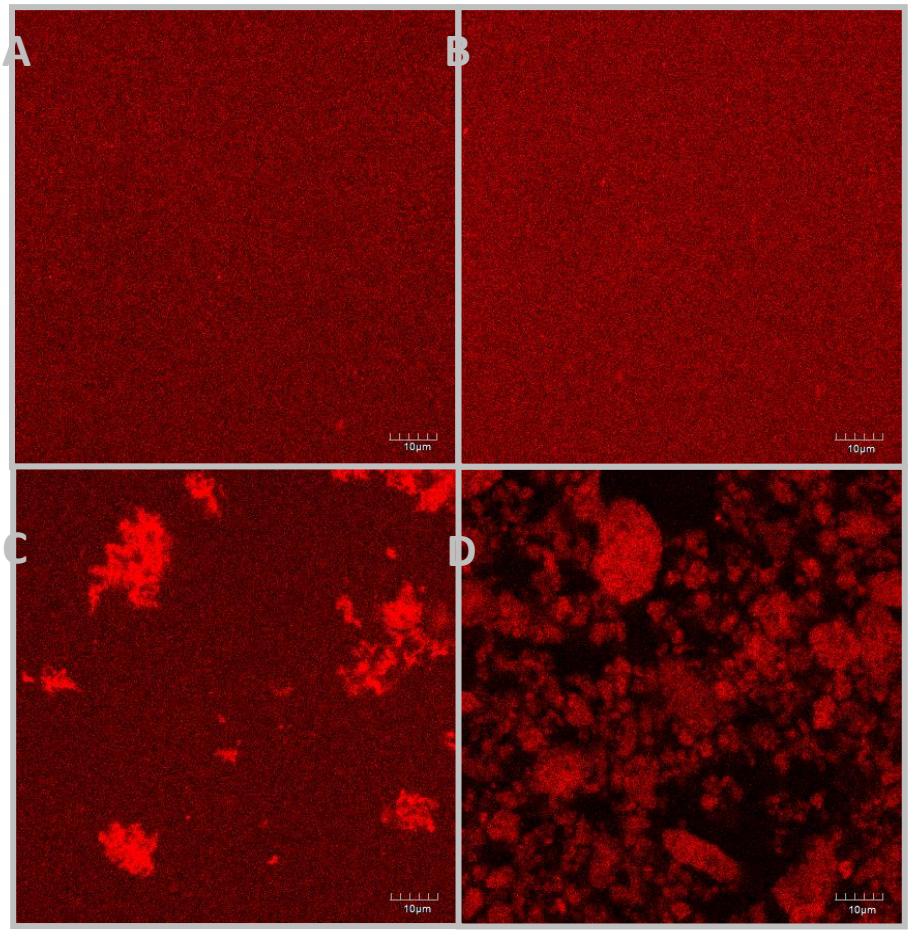


Figura 2. Imágenes de microscopia confocal de (A) AF 0,5% pH 3, (B) β-lg 5% pH 3, (C) β-lg 5% - AF 0,1% pH 3, (D) β-lg 5% - AF 0,5% pH 3.

AF (%p/p)	Tamaño (µm)
0	0,13 ± 0,05
0,0025	3,68 ± 0,74
0,1250	9,86 ± 0,23

Tabla 1. Diámetro promedio de partículas de GA a concentraciones crecientes de AF.

Luego, se evaluó la estabilidad ante los cambios de pH, de la unión de AF a los carriers de β-lg y GA ya que esto podría impactar en su posible utilización en alimentos como así también en la digestión gastrointestinal y posterior absorción del AF. En la **Figura 3** se observa que cuando las partículas de diámetro promedio cercano a 30 µm de β-lg /AF y a 10 µm de GA/AF obtenidas a pH 3 se ajustan nuevamente a neutralidad, revierten totalmente. Se obtiene un tamaño de partícula similar al que tenían inicialmente los sistemas a pH 7, antes de la agregación, lo cual verifica el carácter iónico de la interacción entre las proteínas y el AF. Este tipo de interacción

se verificó también a través de la medición de la carga superficial de las partículas (potencial ζ).

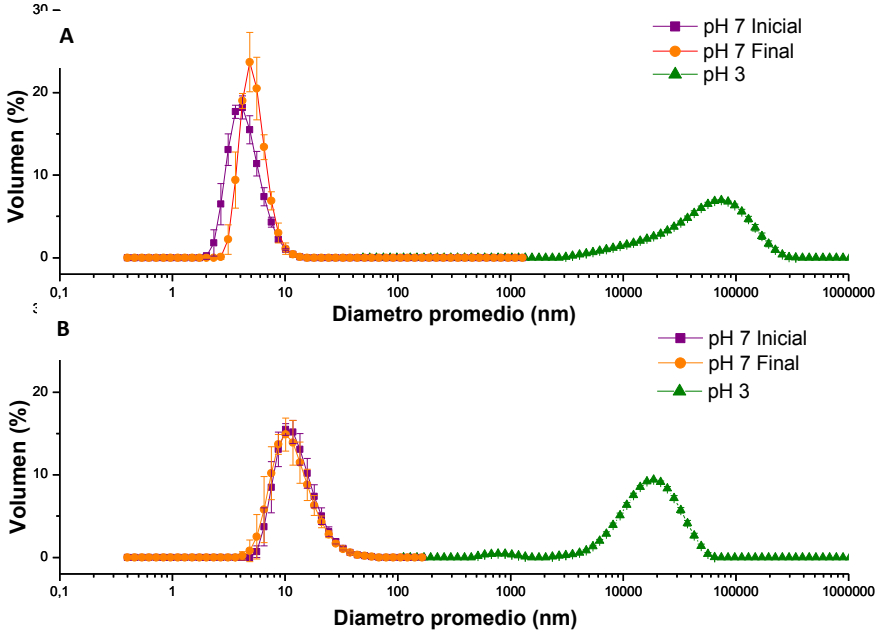


Figura 3. Distribución de tamaños de partícula en volumen.
(A) β-lg 5% - AF 0,625%, (B) Gelatina 0,5% - AF 0,125%.

En la **Figura 4** se observa que el potencial ζ de ambas proteínas a pH 3 es altamente positivo (≈ 20 – 30 mV) y no se ve significativamente modificado por su interacción con cantidades crecientes de AF. Esto indicaría que durante la interacción, la carga negativa del AF se vería neutralizada por las cargas positivas de las moléculas proteicas, que estarían en exceso.

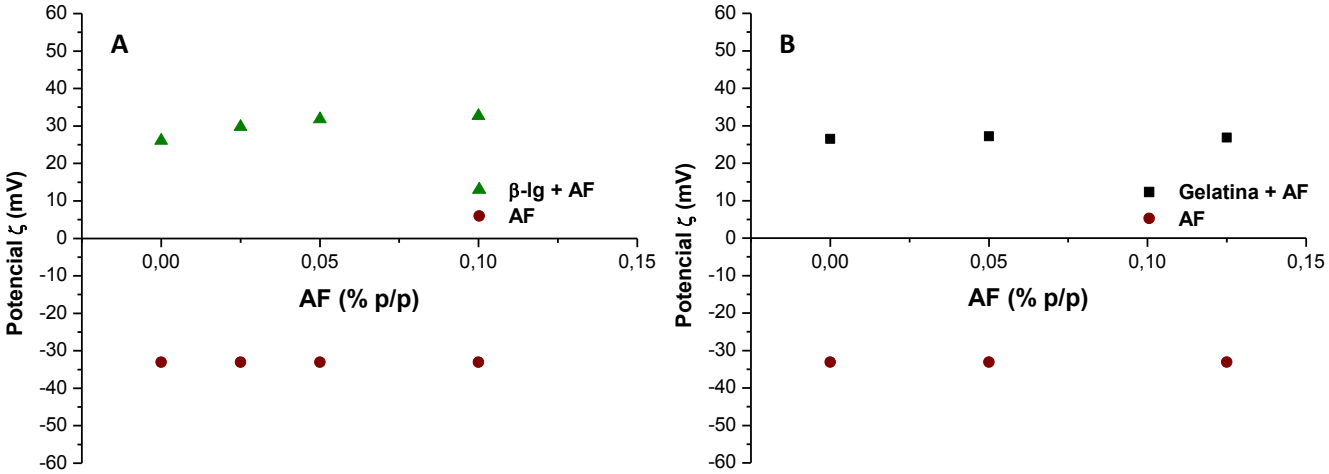


Figura 4. Potencial ζ de sistemas mixtos en comparación con componentes puros.
(A) β-lg 5% pH 3, (B) Gelatin 0,5% pH 3.

CONCLUSIONES

Se verificó la interacción del ácido fólico tanto con la β-lactoglobulina como con la gelatina ácida, a pH 3. Esta interacción promueve la agregación y formación de nano-micro partículas, las cuales incrementan su tamaño con la concentración de AF. Se trataría de uniones electrostáticas reversibles, lo cual permitiría proteger al

compuesto bioactivo durante el procesamiento y almacenamiento, al igual que durante la digestión gástrica, en el organismo, y ser liberado en el tracto intestinal, al alcanzar el pH neutro, donde su absorción es máxima.

BIBLIOGRAFÍA

Akhtar MJ, Khan MA, Ahmad I. 1999. Photodegradation of folic acid in aqueous solution. J. Pharm. Biomed. Anal. 19:269-275.

Arzeni C, Pérez OE, LeBlanc JG, Pilosof AMR. 2015. Egg albumin–folic acid nanocomplexes: Performance as a functional ingredient and biological activity. J. Funct. Foods 18, Part A:379-386.

Arzeni C. 2014. Modificación molecular y funcional de proteínas de clara de huevo mediante ultrasonidos de alta intensidad: aplicación de esta tecnología al diseño de nanovehículos para ácido fólico. Available from: http://digital.bl.fcen.uba.ar/gsdl-282/cgi-bin/library.cgi?a=d&c=tesis&d=Tesis_5480_Arzeni

Huang X, Kakuda Y, Cui W. 2001. Hydrocolloids in emulsions: particle size distribution and interfacial activity. Food Hydrocoll. 15:533-542.

Leroux J, Langendorff V, Schick G, Vaishnav V, Mazoyer J. 2003. Emulsion stabilizing properties of pectin. Food Hydrocoll. 17:455-462.

Liang L, Subirade M. 2012. Study of the acid and thermal stability of β-lactoglobulin–ligand complexes using fluorescence quenching. Food Chem. 132:2023-2029.

Lorente C. 2003. Fotofísica y propiedades fotosensibilizadoras de pterinas en solución acuosa. Available from: http://hdl.handle.net/10915/2216

Molloy AM, Scott JM. 2001. Folates and prevention of disease. Public Health Nutr. 4:601-609.

Penalva R, Esparza I, Agüeros M, Gonzalez-Navarro CJ, Gonzalez-Ferrero C, Irache JM. 2015. Casein nanoparticles as carriers for the oral delivery of folic acid. Food Hydrocoll. 44:399-406.

Refsum H. 2001. Folate, vitamin B12 and homocysteine in relation to birth defects and pregnancy outcome. Br. J. Nutr. 85:S109-S113.

Schrieber R, Gareis H. 2007. Practical Aspects. En: Gelatine Handbook. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. p 119-299. Available from: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527610969.ch3/summary

Von Staszewski M, Pizones Ruiz-Henestrosa VM, Pilosof AMR. 2014. Green tea polyphenols-β-lactoglobulin nanocomplexes: Interfacial behavior, emulsification and oxidation stability of fish oil. Food Hydrocoll. 35:505-511.

Uhrínová S, Smith MH, Jameson GB, Uhrín D, Sawyer L, Barlow PN. 2000. Structural Changes Accompanying pH-Induced Dissociation of the β-Lactoglobulin Dimer †,‡. Biochemistry (Mosc.) 39:3565-3574.

Vora A, Riga A, Dollimore D, Alexander KS. 2002. Thermal stability of folic acid. Thermochim. Acta 392–393:209-220.

Wu Z, Li X, Hou C, Qian Y. 2010. Solubility of Folic Acid in Water at pH Values between 0 and 7 at Temperatures (298.15, 303.15, and 313.15) K. J. Chem. Eng. Data 55:3958-3961.

Zhang Y, Li J, Lang M, Tang X, Li L, Shen X. 2011. Folate-functionalized nanoparticles for controlled 5-Fluorouracil delivery. J. Colloid Interface Sci. 354:202-209.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina y la Universidad de Buenos Aires.