

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE β -CAROTENO MICROENCAPSULADO EN GOMA ARÁBIGA FRENTE A MICROORGANISMOS EN LECHE

Bernardo Sigifredo¹; Virginia Gonzalez Estevez¹; María Laura Boiero¹; Silvia Moyano¹ y Mariana Angélica Montenegro^{1,2}

¹ Departamento de Química. Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Villa María, Av. Universidad 450. Villa María. Córdoba. Argentina. ² Instituto A.P. de Ciencias Básicas y Aplicadas, UNVM, Campus Universitario Arturo Jauretche 1555, Villa María, Córdoba, Argentina.
e-mail: lboiero@frvm.utn.edu.ar

Resumen: La refrigeración a baja temperatura, es una de las estrategias más aplicadas para conservar la leche cruda de la descomposición. Esto favorece la selección de microorganismos psicrótrofos, muchos de los cuales son capaces de producir enzimas extracelulares (como proteasas y lipasas) que pueden ser termoestables. La acción de dichas enzimas, afecta la composición química y nutricional de la leche, repercutiendo en los rendimientos en la elaboración de productos derivados. La aplicación de sustancias naturales antimicrobianas podría proveer una nueva estrategia para controlar este problema.

El objetivo del trabajo, fue evaluar la Actividad antimicrobiana (AAM) de Goma arábica (GA) y β -caroteno microencapsulado en GA (BC-GA) adicionados en leche, frente a cepas ATCC de *Bacillus subtilis* (Bs), y *Pseudomonas aeruginosa* (Ps), y frente a microorganismos (m.os) aislados de leche cruda, *Enterococcus spp.* y *enterobacterias*). El aislamiento se realizó a través de siembra en profundidad, de una dilución 10^{-2} de leche cruda, empleando agar de recuento total (ATR). Las placas fueron incubadas a 37 °C – 48 h y a 4 °C durante 10 días. Las bacterias aisladas, fueron identificadas en base a la morfología de colonia, tinción de gram y pruebas bioquímicas. La velocidad de crecimiento (μ) se determinó empleando la técnica de recuento en placa. Los resultados obtenidos indican que GA y BC-GA poseen una AAM moderada frente a los microorganismos evaluados, presentando un efecto bacteriostático, convirtiéndolo en un alternativo preservante de origen natural, que permite mantener la calidad nutricional de la leche.

Palabras claves: Actividad antimicrobiana, leche, β -caroteno, goma arábica.

INTRODUCCIÓN

La pérdida de la calidad nutricional de un alimento muchas veces está originada por el desarrollo microbiano durante las diferentes etapas de producción. Debido a que la leche y los productos lácteos son alimentos con una compleja matriz, ricos en sustancias nutritivas, como proteínas, glúcidos, lípidos y sales, a una determinada temperatura de almacenamiento,

se convierten en blancos susceptibles a estas alteraciones, constituyendo principalmente un medio favorable para el desarrollo de microorganismos psicrótrofos (T óptima de crecimiento 0 – 7 °C) y psicrótrofos mesófilos (T óptima de crecimiento > 20°C). El crecimiento microbiano genera alteraciones en los componentes de la leche, lo que se traduce en pérdidas del “*flavor*” (sabor y aroma) asociadas a la generación de compuestos

volátiles de aroma indeseado. Además, la alteración de la composición de la matriz, produce una pérdida en el valor nutricional (Karatapanis *et al.*, 2006) y una reducción del rendimiento en la elaboración de productos derivados.

Si bien la leche posee una protección natural contra las degradaciones oxidativas y microbiológicas, ésta es débil y puede alterarse fácilmente durante el procesamiento y almacenamiento, por lo que deben ser adicionados compuestos antimicrobianos exógenamente. Existe una nueva tendencia a la preservación de los alimentos mediante el empleo de compuestos naturales que puedan actuar como antimicrobianos. Estos compuestos pueden ser vitaminas, aceites esenciales, carotenoides, polifenoles, etc.

Existen indicios de que los carotenoides presentan actividad antimicrobiana (Fleischer *et al.*, 2003), además de su conocida capacidad antioxidante, lo que constituye una ventaja adicional. Sin embargo, debido a su estructura química, no son fácilmente dispersables en sistemas acuosos y son altamente lábiles y reactivos bajo las condiciones ambientales, por lo que se emplea una técnica efectiva para estabilizarlos y solubilizarlos en matrices acuosas para su utilización en medios biológicos: la microencapsulación con biopolímeros. Un polisacárido natural ampliamente usado en la industria alimenticia es la GA, que es el exudado de los árboles de acacia, *Acacia senegal* (L.) y *Acacia seyal*. Su estructura química consiste básicamente en un grupo de macromoléculas caracterizadas por una elevada proporción de carbohidratos (97%), siendo D-galactosa y L-arabinosa los monosacáridos predominantes y una baja proporción de proteínas (1-3%). Numerosos trabajos han demostrado que GA posee efectos biológicos benéficos sobre el metabolismo de los lípidos, enfermedades renales cardiovasculares y gastrointestinales, siendo principalmente atribuidos a la composición aminoacídica de la fracción proteica (Glover *et al.*, 2009).

En cuanto a la actividad antimicrobiana de GA, pocos estudios han sido realizados, informando principalmente que presenta actividad inhibitoria del crecimiento de ciertas especies patógenas periodontales (agente implicado en la placa bacteriana), tales como

Prophyromonas gingivalis y *Prevotella intermedia* (Clark *et al.*, 1993). Sin embargo, hasta el momento no se han realizados estudios de la AAM de GA con el fin de ser adicionada a una matriz alimenticia, tal como la leche, para protegerla del desarrollo microbiano. Los microorganismos de principal interés son aquellos capaces de resistir condiciones de pasteurización y provistos de enzimas hidrolíticas, que generan *off-flavour* en el alimento, tales como *Bs*; aquellos cuya temperatura de almacenamiento es óptima para su desarrollo, como *Ps* y, por último, m.os autóctonos que estarán presentes naturalmente en la leche cruda.

El objetivo del trabajo es evaluar la capacidad antimicrobiana de GA pura y BC-GA, para reducir la velocidad de crecimiento del microorganismo mesófilo, *Bs*, del psicrótrofo, *Ps* y de m.os aislados de leche cruda: *Enterococcus* spp. (*EN*) y *Citrobacter amalonaticus* bio. 1 (*C. am*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Biopolímeros

Se empleó β -caroteno rodeado por GA, como material de pared (BC-GA), obtenido a través de secado por aspersión, (Lab Plant SD-04) en Laboratorio de Química de Alimentos (FEA-UNICAMP, Brasil). Además, se empleó GA pura para determinar el efecto de la microencapsulación.

Microorganismos

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6066 obtenidas de (American Type Culture Collection, Rockville, MD), fueron usadas como cultivos de referencia.

Aislamiento e identificación de m.os de leche

El aislamiento de los m.os a partir de leche cruda (almacenada a 4 °C inmediatamente posterior al ordeño), se realizó a través de siembra en profundidad de una dilución 10^{-2} de la muestra, empleando agar de recuento total (ART) y medios selectivos como agar cetrimide (AC), agar glucosa-peptona (AGP), y agar KF. Las placas fueron incubadas a 4 °C durante 10 días. Para poder purificar algunas cepas, se empleó la adición de una solución 0.1% de tween 20 estéril, en tubos con solución de agua peptonada al 0.1%. Las bacterias

aisladas, fueron identificadas en base a la morfología de colonia, tinción de Gram, y pruebas bioquímicas (catalasa, oxidasa, oxidación o fermentación de diferentes azúcares, crecimiento en medios selectivos y diferenciales).

Determinación de actividad antimicrobiana

Para determinar la curva de crecimiento de los microorganismos de referencia (*Bs* y *Ps*) y de los aislados de leche cruda (*EN* y *C. am*), con y sin la adición de los antimicrobianos (AM): GA y Bc-GA, se desarrolló la técnica de recuento microbiano con cada uno de ellos. Empleando cultivo “over night” en fase exponencial, con una concentración $\cong 10^6$ UFC/ml, se inoculó un volumen determinado por densidad óptica, a una muestra de leche, que luego fue dividida en porciones, de manera de obtener la misma concentración inicial del inóculo. A cada una de ellas, se le adiciona el compuesto AM en diferentes concentraciones (1,37; 3,42; y 6,85 mg/ml, correspondiente a 10, 25 y 50 μ M de Bc-GA y el equivalente en peso de GA pura). Una porción permanece sin adición, actuando como control positivo del desarrollo microbiano. Para el desarrollo de *Bs*, se incuban a 32°C durante 30hs, mientras que para *Ps* y los otros psicrótrofos (*EN* y *C. am*), se incubaron a 4°C durante 10 días. A determinados intervalos de tiempo, se realizó el recuento a través de siembra en profundidad, de cada una de las muestras de leche con y sin AM, en AGP como medio de cultivo específico para *Bs*, en AC para *Ps*, en KF para *EN* y ART para *C. am*. Las placas se incubaron durante 48hs a 32°C. Luego de dicho período, se realizó el recuento en UFC/ml y se graficó en función del tiempo. La velocidad de crecimiento (μ , (h^{-1})) de un cultivo microbiano en leche, se determinó a partir de la porción lineal de la pendiente de las curvas de crecimiento del microorganismo, con y sin agregado de GA y Bc-GA.

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

Inhibición del crecimiento microbiano

El porcentaje de inhibición del crecimiento microbiano (%I) ejercido por el compuesto

antimicrobiano, fue calculado a través de la siguiente ecuación:

$$\%I = 100 - \left[\left(\frac{k_{obs}^{m.o+MC}}{k_{obs}^{m.o}} \right) \times 100 \right]$$

Donde $K_{obs}^{m.o}$ y $k_{obs}^{m.o+MC}$, son las constantes de velocidad de crecimiento bacteriano de primer orden, sin y con la adición del microencapsulado, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de m.os de leche

De los m.os que se desarrollaron en medios ricos a 4 °C (psicrótrofos), fueron aisladas y purificadas 13 cepas, siguiendo la metodología y pasos anteriormente explicados. A partir de los cultivos puros, las cepas fueron identificadas en base a la morfología de colonia, tinción de Gram, filancia, y pruebas bioquímicas, tales como: catalasa, oxidasa, oxidación o fermentación de diferentes azúcares, crecimiento en medios selectivos y diferenciales, formación de esporas, para su clasificación. De ellos, fue seleccionado un coco Gram positivo, catalasa y oxidasa negativos, que fue identificado como *EN*, debido a su crecimiento diferencial en agar KF (colonias rojas con halo amarillo), crecimiento en caldo a 45 °C y en caldo 6,5% NaCl. Y además, para cubrir un amplio espectro microbiano, se seleccionó un bacilo Gram negativo, catalasa positivo-oxidasa negativo. Esto es indicativo de una Enterobacteria, por ello, que para su identificación se realizó una set de pruebas bioquímicas, denominado Enterotest (Brizula S.A). Los resultados obtenidos fueron: utilización de glucosa y lactosa positivos, con producción de gas y sin de SH₂, urea positivo, citrato negativo, movilidad positivo, indol positivo. Esto indica que la bacteria aislada corresponde a un *Citrobacter amalonaticus* biog. 1.

Determinación de actividad antimicrobiana

La AAM de GA y Bc-GA, fue evaluada a la temperatura de almacenamiento de la leche a 4 °C, (excepto *Bs*, a 37°C), frente a cepas puras ATCC, y a microorganismos aislados de leche, para comprobar su acción sobre la

contaminación que puede ocurrir en el producto final.

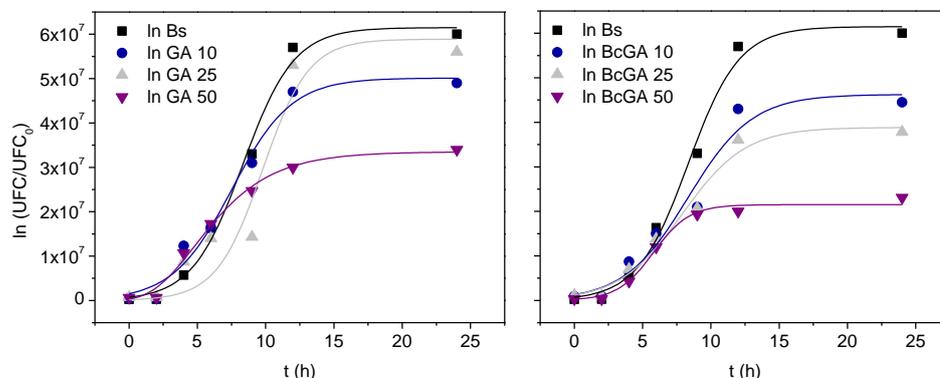


Figura 1. Curva de crecimiento de Bs en leche, a 37 °C con y sin adición de GA (A) y Bc-GA (B).

La Figura 1 muestra las curvas de crecimiento de Bs a 37 °C en leche, con y sin adición de GA y Bc-GA. En la Figura 1 A, se observa una disminución de la velocidad de crecimiento de Bs con la adición del biopolímero GA, principalmente posterior a las 8 hs de incubación, siendo mayor la reducción de la velocidad de crecimiento con una concentración 50 μM , reflejando un porcentaje de inhibición mayor al 50 % (Tabla 1). Con la adición de los microencapsulados de Bc-GA, el efecto fue similar, aunque ocurrió a tiempos más cortos. Además, se observa un efecto de concentración, siendo mayor la AAM a medida que aumenta la cantidad de microencapsulado (Figura 1 B). Con el agregado de 50 μM de Bc-GA, el %I fue superior al 50%, comparable al obtenido con la adición de la misma concentración de GA, lo que indica que la AAM provendría básicamente del biopolímero que constituye el material de pared de la microcápsula.

En la Figura 2, se muestran las curvas de crecimiento de Ps en leche, a 4 °C con y sin adición de GA (A) y Bc-GA (B).

En cuanto a la velocidad de crecimiento de Ps en leche a 4 °C, se vio disminuida con la adición de GA en todas las concentraciones (Figura 2 A), siendo mayor el %I obtenido (37%), con la concentración de 50 μM . Mientras que, como se observa en la Figura 2 B, solo fue evaluada la AAM de Bc-GA en una

concentración de 10 μM , resultando en la inhibición de un 22% (Tabla 1). Dicho valor es prácticamente igual al de GA 10 μM , demostrando, al igual que frente a Bs, que la AAM provendría principalmente del material de pared, GA.

Se ha realizado la determinación de la AAM frente al microorganismo aislado de leche cruda, *C. am*. Sin embargo, los resultados no fueron lo esperado. No se observa efecto antimicrobiano con la adición de GA y Bc-GA, frente al desarrollo de dicho microorganismo en leche a 4 °C, en ninguna de las concentraciones adicionadas, (Gráficos no presentados). Esto podría deberse a que las bacterias Gram negativas, presentan dos membranas citoplasmáticas, que la rigidiza y dificulta el acceso de las moléculas antimicrobianas. Esta membrana externa conforma una barrera con permeabilidad selectiva, lo que los convierte en m.os más resistentes frente a la acción de numerosos antibióticos y compuestos con acción antibacteriana (Hiroshi 1989). Si bien presenta canales inespecíficos, denominado porinas, que la atraviesan y permiten el paso de solutos hidrofílicos pequeños, y como ya se conoce, GA es un biopolímero hidrofílico, pero de gran tamaño. Su peso molecular es de alrededor de $3,5 \times 10^5$ Da, lo que puede explicar el hecho de que no ejerza AAM sobre dicho microorganismo.

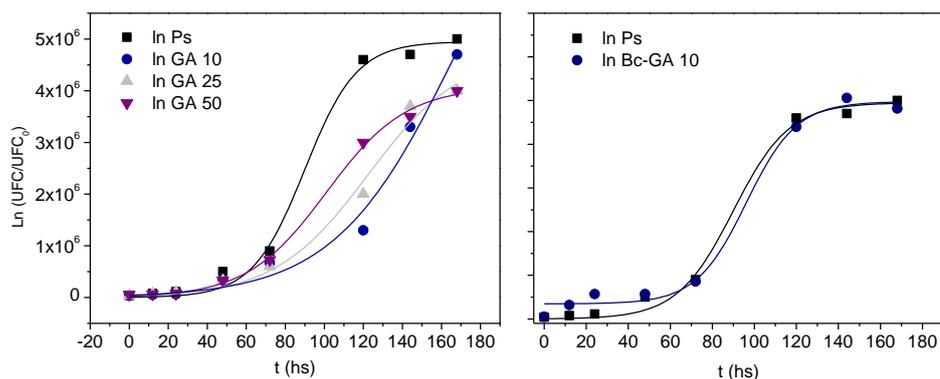


Figura 2. Curva de crecimiento de Ps en leche, a 4 °C con y sin adición de GA (A) y Bc-GA (B).

Tabla 1. Velocidad de crecimiento y porcentaje de Inhibición de Bs y Ps, en leche.

[GA-p](μM)	<i>Bs</i> (37 °C)		<i>Ps</i> (4 °C)		<i>EN</i> (4 °C)	
0	$\mu_{Bs} = 0,276$		$\mu_{Ps} = 0,03687$		$\mu_{EN} = 0,08441$	
10	$\mu = 0,197$	%I=28,62	$\mu = 0,02876$	%I=21,99	$\mu = 0,06531$	%I=22.63%
25	$\mu = 0,203$	%I=26,45	$\mu = 0,02857$	%I= 22.55	$\mu = 0,05996$	%I= 28.97%
50	$\mu = 0,125$	%I=54,78	$\mu = 0,02323$	%I= 36.99	$\mu = 0,0815$	%I=3.45%
[Bc-GA](μM)	$\mu_{Bs} = 0,276$		$\mu_{Ps} = 0,03687$		$\mu_{EN} = 0,08441$	
10	$\mu = 0,134$	%I=51,45	$\mu = 0,02885$	%I= 21.72	$\mu = 0,06655$	%I=21.16%
25	$\mu = 0,168$	%I=39,13	-	-	$\mu = 0,0598$	%I=29.16%
50	$\mu = 0,1318$	%I=52,25	-	-	$\mu = 0,08214$	%I=2.69%

En cuanto a la determinación de AAM del otro microorganismo aislado de leche. En la Figura 3, se muestra la curva de crecimiento de *Enterococcus* spp. aislado de leche cruda, almacenado a 4 °C, con y sin adición de GA y Bc-GA. En todas las concentraciones ejerce un efecto sobre la velocidad de crecimiento de la cepa aislada, siendo mayor con una concentración de 25 μM, demostrando un %I del 30% (Tabla 1). Sin embargo, a concentraciones mayores (50 μM), no ejerce prácticamente, un efecto inhibitorio del crecimiento. Esto puede deberse a que la adición del biopolímero en altas concentraciones, podría estar siendo empleado como fuente de carbono por el microorganismo, favoreciendo su desarrollo. Esto puede ser sustentado por la composición química de la GA, que consiste en un grupo de macromoléculas caracterizadas por una elevada proporción de carbohidratos (97%) de los cuales D-galactosa y L-arabinosa son los

monosacáridos predominantes y una baja proporción de proteínas (1-3%), (Williams, 2000; Montenegro *et al.*, 2012).

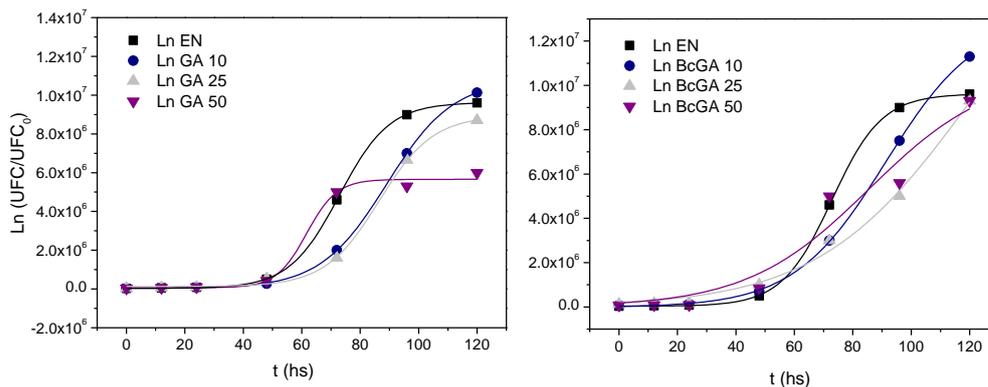


Figura 3. Curva de crecimiento de EN en leche, a 4 °C con y sin adición de GA (A) y Bc-GA (B).

CONCLUSIONES

Se ha demostrado que GA y Bc-GA poseen un efecto bacteriostático frente tanto, a microorganismos de referencia, como aislados de leche cruda, todos ellos contaminantes de alimentos, con la excepción de *C. am*, que demostró resistencia. De los resultados, se observa que la AAM con la adición de GA y Bc-GA comienza a ser efectiva en todos los casos a partir de las 60 hs cuando es almacenado a 4 °C y entre las 8-10hs a 37 °C, es decir, cuando el microorganismo se encuentra en la fase exponencial de crecimiento.

La AAM mostrada por GA puede atribuirse a enzimas tales como oxidasas, peroxidasas y pectinasas presentes en la fracción proteica de la misma. Para algunas de estas enzimas se han demostrado sus propiedades antimicrobianas (Kirtikar and Basu, 1984).

Por último podríamos indicar que los resultados obtenidos potencian la aplicación de los microencapsulados GA y Bc-GA, que además de la eficiente actividad antioxidante de β -caroteno, ejercen un importante efecto antimicrobiano, reduciendo en un 30-50% la velocidad de crecimiento de diversas bacterias psicrótrofas, lo cual estaría potenciando las aplicaciones de GA no solo como un agente emulsionante y protector que constituye la pared de microcápsulas, sino también como un agente antimicrobiano, pudiéndose ser adicionado como una preservante de alimentos, protegiendo la calidad higiénica y nutricional, y prolongando la vida útil del mismo.

BIBLIOGRAFÍA

- Karatapanis, A.E.; Badeka, A.V.; Riganakos, K.A.; Savvaidis, I.N.; Kontominas, M.G. (2006). Changes in flavour volatiles of whole pasteurized milk as affected by packaging material and storage time. *International Dairy Journal*, 16, 750-761.
- Fleischer, T.C.; Ameade, E.P.; Mensah, M.L.K.; Sawyer, I.K. (2003) Antimicrobial activity of the leaves and seeds of *Bixa orellana*. *Fitoterapia*, 74:136-38.
- Glover, D.A.; Ushida, K.; Phillips, A.O.; Riley, S.G. (2009). Acacia(sen) SUPERGUM™ (Gum arabic): An evaluation of potential health benefits in human subjects. *Food Hydrocolloids* 23, 2410-2415.
- Clark, D.T.; Gazi, M.I.; Cox, S.W.; Eley, B.M.; Tinsley, G.F. (1993). The effects of Acacia arabica gum on the in vitro growth and protease activities of periodontopathic bacteria. *J Clin Periodontol.* 20, 238-43.
- Hiroshi Nikaido (1989). Outer Membrane Barrier As A Mechanism Of Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Nov. P. 1831-1836.

Williams, P.A. (2000). In *Handbook of Hydrocolloids*; Williams, P. A., Phillips, G. O., Eds.; CRC Press: Cambridge, 155-168.

Montenegro, M.A., Boiero, M.L., Valle L.; Borsarelli, C.D. (2012). Gum Arabic: More Than an Edible Emulsifier, Products and Applications of Biopolymers, Casparus Johannes Reinhard Verbeek (Ed.), ISBN: 978-953-51-0226-7, InTech.