

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE GOMA ARÁBIGA Y β -CAROTENO MICROENCAPSULADO EN GOMA ARÁBIGA EN LECHE FRENTE A MICROORGANISMOS AISLADOS DE DICHA MATRIZ

Bernardo Sigifredo (bernardosigifredo@gmail.com)¹

Tutoras: Virginia Gonzalez Estevez², M. Laura Boiero³

^{1,2,3}Departamento de Química. Universidad Tecnológica Nacional - Facultad Regional Villa María, Av. Universidad 450. Villa María. Córdoba. Argentina.

¹Alumno de Ingeniería Química UTN, FRVM. ²Alumna de Maestría en Tecnología de los Alimentos UTN, FRVM. ³Alumna de Doctorado en Ciencias Químicas UNRC.

Resumen

La calidad e higiene de la leche depende principalmente de la flora microbiana que la habita. La refrigeración a baja temperatura es una de las estrategias más aplicadas para conservar la leche cruda y los productos lácteos de la descomposición, lo que favorece a la selección de microorganismos psicrótrofos. Los productos de degradación microbiológica generan efectos indeseables en el sabor y olor, disminuyendo la calidad de la leche. Es por esto, que la aplicación de sustancias naturales antimicrobianas, tales como, β -caroteno y Goma Arábiga (GA) pueden proveer una nueva estrategia para controlar el deterioro causado por bacterias alterantes y psicrótrofas, mejorando la calidad e inocuidad del alimento. El objetivo del trabajo fue evaluar la Actividad antimicrobiana (AAM) de GA y β -caroteno microencapsulado en GA (BcGA) adicionados en leche frente a microorganismos aislados de leche cruda. Los resultados obtenidos indican que la GA y el microencapsulado BcGA poseen una AAM moderada frente a los microorganismos analizados. Este efecto, además de las propiedades antioxidantes de BC y emulsificantes de GA ya conocidas, convierte al microencapsulado en un alternativo preservante de origen natural, reduciendo la pérdida de la calidad nutricional de la leche.

Introducción

La leche cruda, posee una composición rica en nutrientes y pH neutro, lo que favorece el crecimiento de una amplia variedad de especies microbianas. La flora microbiana en leche cruda, es considerada esencial para las características sensoriales y variedad de quesos tradicionales. Sin embargo, dicha microflora también puede ser responsable de defectos de flavour (sabor y aroma) en productos lácteos, o incluso, podría constituir un riesgo para la salud.

Las condiciones de obtención de leche cruda, en particular, las prácticas de higiene de los granjeros (por ej. lavado del equipamiento de ordeño, y preparación de la ubre, pre- y post-ordeño), determinan el contenido de microorganismos (MO) útiles en la elaboración de queso y los alterantes. El uso de la refrigeración a baja temperatura, es una de las estrategias más aplicadas para conservar la leche cruda y los productos lácteos de la descomposición, y mantener la calidad de los mismos. Sin embargo, esto trae como consecuencia la selección de MO psicrótrofos, los cuales son capaces de crecer a temperaturas cercanas a 0 °C. Estos, representan menos del 10% de la flora inicial, pero se pueden convertir en flora predominante, al permanecer de uno a tres días bajo condiciones de refrigeración (Thomas, *et. al.* 1973; Sørhaug, *et. al.* 1997). Los MO psicrótrofos, además de su alta velocidad de crecimiento a bajas temperaturas, son sensibles a tratamientos térmicos, tales como pasteurización o tratamiento a ultra alta temperatura (UHT), resultando eliminados, pero las enzimas hidrolíticas producidas por éstos permanecen, ya que resisten altas temperaturas. Entre dichas enzimas extracelulares liberadas, se encuentran: *proteasas*, *lipasas* y *fosfolipasas*, algunas de las cuales son termoresistentes (Braun, *et. al.*, 1999; Chena, *et. al.*, 2003; Matta, *et. al.*, 1999). La acción de todas estas enzimas, afectan la composición química y nutricional de la leche, generan disminución en los rendimientos para la elaboración de queso y otros productos lácteos. Además, los productos de degradación, generan

efectos indeseables en el sabor y aroma (Karatapanis, *et. al.* 2006; Kilcast, D., & Subramaniam, P., 2000), disminuyendo la calidad e inocuidad de la leche.

Todas las razones anteriormente mencionadas, indican la relevancia de la detección y control de MO, especialmente psicrótrofos y sus enzimas resistentes al calor, cobrando gran importancia y siendo ésta, una de las principales preocupaciones en la industria láctea. Si bien la leche posee una protección natural contra las degradaciones 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 (AAM) (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 Goma Arábiga (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%).

En cuanto a la AAM 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 MO de principal interés son aquellos capaces de resistir condiciones de pasteurización y provistos de enzimas hidrolíticas, que generan off-flavour en el alimento, aquellos cuya temperatura de almacenamiento es óptima para su desarrollo y MO autóctonos que estarán presentes naturalmente en la leche cruda.

El objetivo del trabajo es evaluar la capacidad antimicrobiana de GA pura y β -caroteno microencapsulado en Goma Arábiga (BcGA), para reducir la velocidad de crecimiento de microorganismos aislados de leche cruda: *Gordonia spp.* (GO), *Enterobacter spp.* (EB) y *Enterococcus spp.* (EC).

Materiales y Métodos

Biopolímeros

Se empleó β -caroteno rodeado por GA, como material de pared (BcGA), 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 de Leche Cruda

Con el objetivo de evaluar la AAM de carotenoides microencapsulados (CAR MC), frente a MO capaces de crecer en leche, se realizaron los pasos necesarios para obtener cultivos puros de MO aislados de leche cruda (almacenada a 4 °C inmediatamente posterior al ordeño). Se purificaron e identificaron 3 cepas: *Gordonia spp.* (GO), *Enterobacter spp.* (EB) y *Enterococcus spp.* (EC) para evaluar la AAM.

Determinación de Actividad Antimicrobiana por Reducción de Velocidad de Crecimiento Microbiano

La velocidad de crecimiento microbiano (μ), con o sin agregado de CAR MC, se determinó a 4 °C, empleando la técnica de recuento en placa, a través de siembra en profundidad. A partir de un

inóculo *overnight* en caldo nutritivo de cada MO, se preparó un inóculo general, en un frasco con leche reconstituida, ajustando la concentración a una absorbancia de 0,002 a 600 nm, que equivale a 10^6 UFC/ml. De esta manera, se logra que el inóculo inicial sea exactamente el mismo en la muestra con y sin antimicrobiano. Posteriormente se divide en porciones iguales, a las que se adicionan los compuestos GA y BcGA, en cantidades previamente pesadas para obtener concentraciones finales de 0,34, 1,37 y 6,85 mg/ml, correspondiente a 10, 25 y 50 μ M de BcGA, y los pesos equivalentes de GA. Una porción permanece sin adición, actuando como control positivo del desarrollo microbiano. Las muestras fueron incubadas a 4 °C, entre 7-10 días. Se realizó el recuento de MO en placa, a través de la técnica de siembra en profundidad (*ICMSF*). Para ello, se toma una alícuota de cada muestra a diferentes intervalos de tiempo, y tras diluciones seriadas en agua peptonada estéril (0,1%), se coloca 0,1 ml en una placa estéril, a la que luego se adiciona 12 ml de Agar de Recuento Total (ART). Las placas fueron incubadas 48 hs a 37 °C. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada MO, y las siembras fueron realizadas en cabina de seguridad microbiológica. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el recuento microbiano de las placas que presentaron entre 30-300 colonias, de cada una de las muestras, para determinar si ejerce efecto antimicrobiano. Los resultados se expresan como UFC/ml. La μ , (h^{-1}) con o sin el agregado del CAR MC, fue determinada de la pendiente de la porción lineal (fase exponencial), de las curvas de crecimiento del MO. El porcentaje de reducción del crecimiento microbiano (%R), fue calculado a través de la ecuación 1:

$$\%R = \frac{\mu - \mu^{MC}}{\mu} \times 100 \quad (1)$$

Donde μ y μ^{MC} , son las velocidades de crecimiento bacteriano en ausencia y presencia del microencapsulado, respectivamente.

Análisis Estadístico de los Resultados

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente, empleando el software Statgraphics Centurion XV.II, mediante análisis de la varianza ANOVA multifactorial, con el objetivo de comparar si los factores tiempo y concentración de antimicrobiano adicionado, tienen un efecto estadísticamente significativo sobre los valores, con un nivel de significancia del 95,0 %.

Resultados y Discusión

Determinación de Actividad Antimicrobiana por Reducción de Velocidad de Crecimiento Microbiano

Con el objetivo de determinar la AAM de los CAR MC, frente al desarrollo de MO aislados de leche cruda, fue determinada la μ de cada uno, con y sin adición de GA y BcGA, a través de la técnica de recuento en placa.

Se determinó la velocidad de crecimiento del MO aislado GO, con y sin adición de GA, Figura 1 (A), y BcGA, Figura 1 (B).

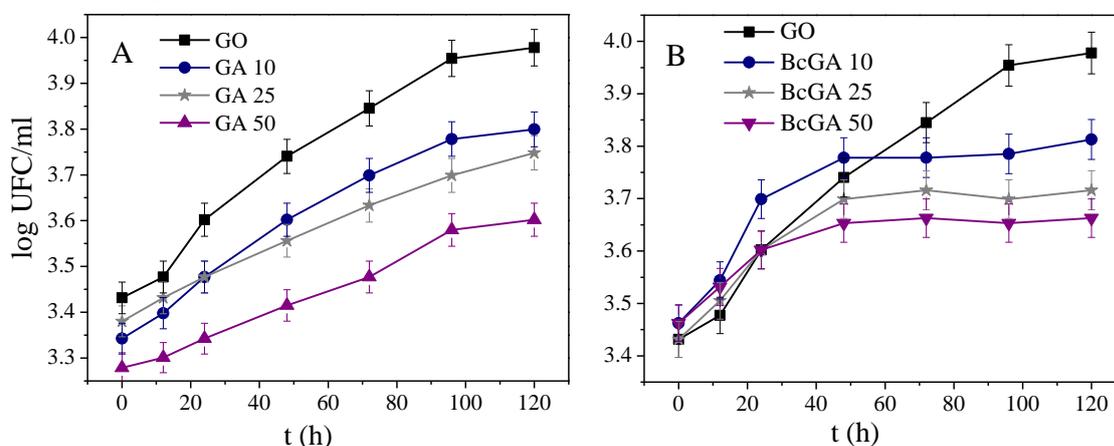


Fig. 1. Curva de crecimiento de GO en leche, a 4 °C con y sin adición de (A) GA y (B) BcGA.

Se pudo demostrar que la AAM de GA, como se observa en la Figura 1 (A), incrementa con la concentración del biopolímero, ejerciendo un significativo efecto antimicrobiano, principalmente la adición de 50 μM , causando una reducción de la μ , del 43 %. A su vez, la adición de GA 10 y 25 μM , no presentan diferencia significativa entre sí.

En cuanto a la AAM de BcGA, se observa en la Figura 1 (B), que no muestran diferencia significativa, respecto de la cepa sin adición, en los primeros tiempos del desarrollo. Sin embargo, a partir de las 60 h de incubación a 4 $^{\circ}\text{C}$, comienza a observarse mayor AAM con la adición de concentraciones crecientes del compuesto, siendo los %R similares a los obtenidos con la adición de GA, lo que permite inferir, que la AAM proviene del material de la microcápsula (MC).

Los resultados de la AAM de GA y BcGA frente al desarrollo microbiano del bacilo Gram negativo *EB* se muestran en la Figura 2.

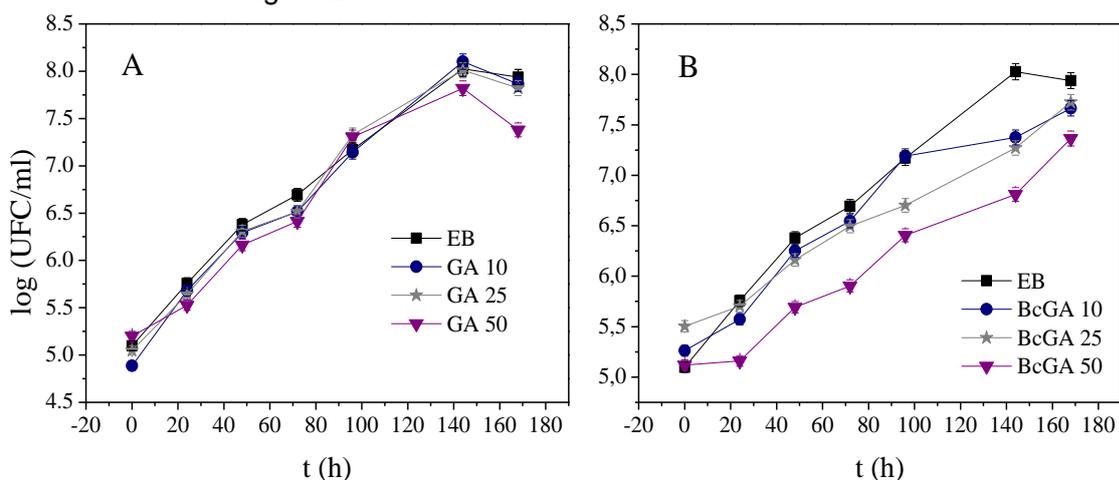


Fig. 2. Curva de crecimiento de *EB* en leche, a 4 $^{\circ}\text{C}$ con y sin adición de (A) GA y (B) BcGA.

Se puede observar que la adición de distintas concentraciones de GA (10, 25 y 50 μM), no presentan diferencias estadísticamente significativas (con un nivel de confianza del 95,0 %), sobre el desarrollo de *EB*. Por el contrario, BcGA, particularmente la concentración 50 μM , posee AAM, reduciendo de manera estadísticamente significativa la μ de *EB* (%R 21 %), respecto de *EB*, sin adición y con adición de BcGA 10 y 25 μM .

La AAM de GA y BcGA, fue determinado por recuento en placa, y luego se calculó la μ , a partir de la porción lineal de la curva del coco Gram positivo *EC*, Figura 3.

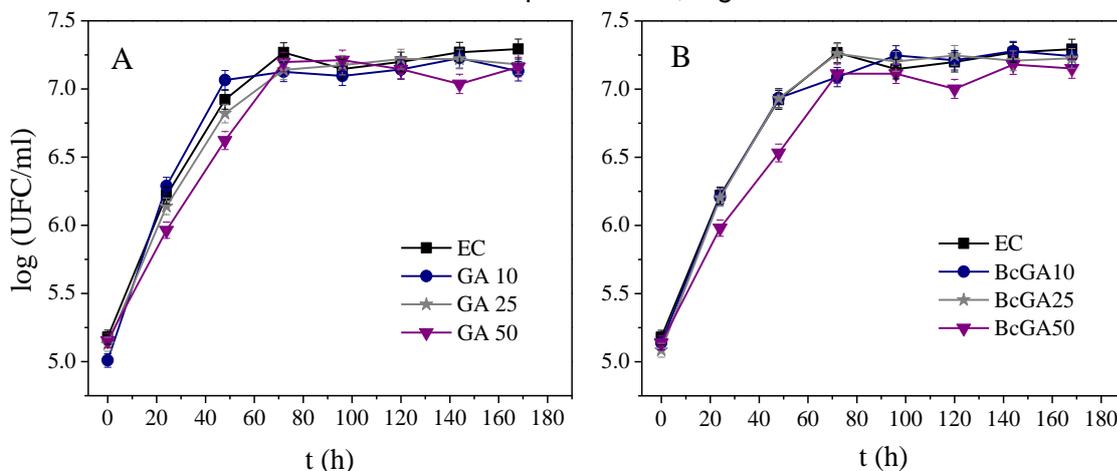


Fig. 3. Curva de crecimiento de *EC* en leche, a 4 $^{\circ}\text{C}$ con y sin adición de (A) GA y (B) BcGA.

El análisis estadístico de los valores logarítmicos de UFC/ml, indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas, con un nivel de confianza del 95 %, entre las variables respecto del control sin GA, y tampoco entre sí (datos no presentados). Esto es representado gráficamente

en la Figura 3 (A). Sin embargo, los valores de %R (Tabla 1), demostraron que la adición de 50 μM de GA, causó una reducción del 35%.

Por otra parte, la adición de BcGA 50 μM , produjo un efecto de AAM estadísticamente significativo (con un nivel del 95,0 % de confianza), respecto del crecimiento de *EN*, sin adición de CAR MC, y a su vez, presenta diferencias con las curvas de crecimiento con adición de BcGA 10 y 25 μM . Es importante destacar, que la AAM de BcGA 50 μM es comparable a la de GA 50 μM , causando una reducción de aproximadamente el 34 % en la μ de *EN* (Tabla 1), lo que indica que la AAM provendría exclusivamente del material de pared del encapsulado, es decir, GA.

Tabla 1. Velocidad de crecimiento de microorganismos aislados ($\mu \pm \text{SD}$ (h^{-1})), con y sin adición de GA y BcGA, con sus respectivos porcentajes de reducción de la velocidad de crecimiento (%R).

[AAM] (μM)	Cepa <i>GO</i>		[AAM] (μM)	Cepa <i>GO</i>	
[GA]	$\mu \pm \text{SD}$ (h^{-1})	%R	[BcGA]	$\mu \pm \text{SD}$ (h^{-1})	%R
0	$0,012 \pm 0,001$	-	0	$0,012 \pm 0,002$	-
10	$0,011 \pm 0,002$	15	10	$0,011 \pm 0,001$	15
25	$0,010 \pm 0,001$	38	25	$0,009 \pm 0,001$	30
50	$0,007 \pm 0,001$	43	50	$0,007 \pm 0,001$	39
	Cepa <i>EB</i>			Cepa <i>EB</i>	
[GA]	$\mu \pm \text{SD}$ (h^{-1})	%R	[BcGA]	$\mu \pm \text{SD}$ (h^{-1})	%R
0	$0,045 \pm 0,001$	-	0	$0,045 \pm 0,001$	-
10	$0,044 \pm 0,001$	3	10	$0,047 \pm 0,003$	NI
25	$0,042 \pm 0,003$	7	25	$0,039 \pm 0,004$	15
50	$0,020 \pm 0,002$	25	50	$0,036 \pm 0,001$	21
	Cepa <i>EC</i>			Cepa <i>EC</i>	
[GA]	$\mu \pm \text{SD}$ (h^{-1})	%R	[BcGA]	$\mu \pm \text{SD}$ (h^{-1})	%R
0	$0,084 \pm 0,001$	-	0	$0,084 \pm 0,001$	-
10	$0,065 \pm 0,001$	23	10	$0,067 \pm 0,005$	21
25	$0,060 \pm 0,001$	30	25	$0,066 \pm 0,003$	34
50	$0,055 \pm 0,001$	35	50	$0,055 \pm 0,0001$	34

(NI): No inhibe

Conclusión

La AAM observada para los microencapsulados analizados en este trabajo, proviene principalmente del biopolímero GA, que constituye la pared de la MC. Sin embargo, frente a *EN* y *EC*, se observa que el BcGA, ejerce un efecto potenciador sobre la AAM de GA, ya que únicamente la adición de 50 μM de BcGA, causó un efecto significativo de reducción de la μ , respecto a la concentración equivalente, en GA y comparado al crecimiento del MO sin adición de antimicrobiano.

De los resultados, se observa que la AAM con la adición de GA y BC-GA comienza a ser efectiva, 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 (Clark *et al.*, 1993).

Como conclusión, los resultados obtenidos indican que la aplicación de GA y BcGA en leche, 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 MC, sino también como un

agente antimicrobiano, pudiendo ser adicionado como una preservante de alimentos, protegiendo la calidad higiénica y nutricional, y prolongando la vida útil del mismo.

Referencias

- Braun, P., Fehlhaber, K., Klug, C., Kopp, K. 1999. Investigations into the activity of enzymes produced by spoilage-causing bacteria: a possible basis for improved shelf-life estimation. *Food Microbiology*. 16, 531-540.
- Chena, L., Daniela, R.M., Coolbear, T. 2003. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milkpowders. *International Dairy Journal*. 13, 255-275.
- 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.
- 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.
- 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. *Int.Dairy J*. 16: 750–761.
- Kilcast, D., & Subramaniam, P. (2000). Introduction. In D. Kilcast, & P. Subramaniam (Eds.). *The stability and shelf-life of food* (pp. 1-19). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Matta, H., Punj, V. 1999. Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic, spore forming bacteria from raw milk. *International Journal of Dairy Technology*. 52, 2, 59-62.
- Sørhaug, T. Stepaniak, L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*. 8, 35-41, y referencias allí citadas.
- Thomas, S.B., Thomas, B.F. 1973. Psychrotrophic bacteria in refrigerated bulk-collected raw milk. *Dairy Industries*. 38, 61-70.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, of the International Union of Microbiological Societies). *Microorganismos de los Alimentos, Volumen 1. Su significado y métodos de enumeración*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza España. Segunda Edición. ISBN: 84-200-0908-3.