

EFECTO COMBINADO DE ATMOSFERAS MODIFICADAS Y EMPAQUES BIODEGRADABLES Y COMESTIBLES ANTIMICROBIANOS EN LA INOCUIDAD DE JAMÓN INOCULADO CON *S. aureus* Y *Micrococcus luteus*

Rodríguez Olvera, M. G.; Regalado González, C.

Facultad de Química, Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos,
Universidad Autónoma de Querétaro

RESUMEN

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva que se encuentra tanto en el ambiente (suelo, agua, aire) como en las fosas nasales, garganta, piel y en el pelo de individuos sanos; también es común encontrarlo en alimentos procesados que contienen altas concentraciones de proteína como pollo, carne, lácteos. Debido a la diversidad de ambientes en los que se puede encontrar *S. aureus*, es posible que las mismas personas que preparan y elaboran los alimentos (manipuladores) los contaminen con la bacteria. Esta situación puede ser causa de una enfermedad transmitida por alimentos (ETA), ya que *S. aureus* genera enterotoxinas que ocasionan intoxicación alimentaria.

De lo anterior surge la necesidad de aplicar tecnologías nuevas y eficaces para el control microbiológico, protección y conservación de los alimentos, como los recubrimientos comestibles que son una alternativa tecnológica para permite ofrecer mayor calidad y seguridad alimentaria. El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento de *S. aureus* en jamón recubierto con un empaque comestible al cual se le incorporó nisina, durante un periodo de almacenamiento de 8 días a 7° C. Para ello se trabajó con muestras de jamón de dimensiones de 5 cm x 5 cm a partir de las cuales se determinó periódicamente el número de UFC/mL de *S. aureus* sobre agar soya tripticaseína (AST). Los empaques comestibles con nisina inhibieron parcialmente el desarrollo de *S. aureus* en jamón empacado al vacío y almacenado en refrigeración durante el periodo de evaluación.

INTRODUCCION

La conservación de alimentos requiere de la eliminación o limitación de la habilidad de los microorganismos patógenos de crecer, y del empaque para limitar la recontaminación. Desde una perspectiva de seguridad alimentaria, el empaque cumple con dos funciones: previene la contaminación y alarga la efectividad de los métodos de conservación del alimento. Frecuentemente los procesadores utilizan una combinación de estos factores en lugar de depender de solo uno. Esto se debe a que un sistema de conservación que utilice un único control deberá ser muy severo, reduciendo por lo tanto la aceptación del producto por parte del consumidor. El uso de factores múltiples constituye el llamado concepto de barrera. Los controles microbiológicos utilizando pH, actividad de agua, inhibidores, empaque y atmósfera modificada, son frecuentemente utilizados en conjunto durante la producción de alimentos. La creciente demanda de alimentos de alta calidad y con larga vida de anaquel, en conjunto con el reclamo ambiental de reducir los desperdicios sólidos, ha incrementado el interés en la investigación sobre recubrimientos comestibles con antimicrobianos incorporados a la película, ya que éstos sirven como barreras de protección y conservación, para preservar las características y prolongar la vida de anaquel de los alimentos. Aunque estas películas no están pensadas como reemplazos totales de los empaques sintéticos, tienen potencial para reducir su uso y para limitar la migración de humedad, aromas y lípidos entre los componentes de los alimentos, o ser acarreadores de agentes antioxidantes y antimicrobianos, donde los empaques tradicionales no pueden funcionar (Krochta y Mulder-Johnston, 1997). Un ejemplo de antimicrobiano que puede incorporarse en la película comestible es la nisina, la cual es una bacteriocina (polipéptido pequeño de 34 aminoácidos) producida por bacterias ácido lácticas; la nisina muestra actividad antimicrobiana que incluye

un amplio espectro de bacterias gram positivas, como los microorganismos patógenos *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum*. El mecanismo por el cual este tipo de péptido actúa contra los microorganismos es su interacción con un precursor del peptidoglicano denominado Lípido II, con la subsiguiente formación de poros en la membrana citoplasmática, los cuales afectan el estado energético de la célula y disipación de la fuerza motriz de protones, causando un paro en los procesos dependientes del gradiente de pH y del potencial eléctrico. La nisina tiene muchas ventajas sobre otros conservadores de alimentos, tales como su no toxicidad, digestibilidad por la enzima proteolítica α -quimotripsina, estabilidad al calor a bajo pH, y ausencia de color y sabor (Pongtharangkul et al, 2004). *S. aureus* es una bacteria gram positiva capaz de producir una toxina proteica muy estable al calor que causa enfermedades en los humanos. Existe en el aire, el polvo, las alcantarillas, el agua, la leche, los alimentos y los equipos para su procesamiento, las superficies, los humanos y los animales. Además estos microorganismos, se encuentran presentes en las fosas nasales, la garganta, y en el cabello y la piel de más del 50% de los individuos saludables. Entre los alimentos que frecuentemente se ven involucrados en brotes causados por *Staphylococcus* se encuentran la carne y los productos cárnicos; los productos avícolas y los huevos; los productos de panadería y la leche y productos lácteos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron agar soya tripticaseína (AST) al 0.8%, caldo soya tripticaseína (CST), agar Baird Parker; los cuales se elaboraron con materiales grado reactivo. Se utilizó agua peptonada al 0.1% como diluyente, y como agente antimicrobiano se utilizó nisina. El microorganismo utilizado fue *Staphylococcus aureus* crecido en CST.

Formulación de la película (para 20ml): WPI: 1g, Sorbitol no cristalizante: 1.4g, cera de abeja: 0.08g, nisina: 0.22g y/o Nikon LQ*(300ppm), Tween 80: 0.02g, Agua: 17.68 ml.



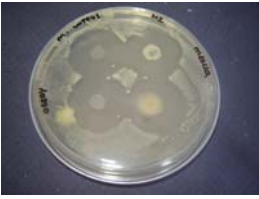


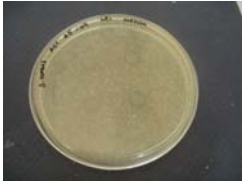
Preparación de la película: El aislado de proteína de suero (WPI) y el sorbitol se mezclaron con agua y se ajustó el pH a 7.5, la mezcla se colocó en baño maría a 90°C por 25 min. Se agregó la cera de abeja y se mantuvo en el baño maría por otros 5 min. La solución se vació en un recipiente de plástico que contenía el Tween 20 y se homogenizó 2 min a 21500 rpm, se dejó reposar 1 min y nuevamente se homogenizó 1 min a 21500 rpm. La solución se vertió en un recipiente en baño de hielo para enfriar rápidamente, se agregó el agente antimicrobiano (nisina ajuste pH=5.6, Nikon LQ* sin ajuste de pH), después la solución se desgasificó y se esparcieron 4 mL sobre placas de vidrio de 10 cm x 10 cm, las películas se secaron a temperatura ambiente 24 h. Por último, se esterilizó la película por 3 h aproximadamente (1.5 h de cada lado) en luz ultravioleta.

El efecto antimicrobiano del material de empaque activo con nisina, o Nikon LQ* y una mezcla nisina-Nikon LQ* se evaluó mediante el método de difusión en agar, inoculando por extensión en superficie 100 μ L de *M. Luteus* y *S. aureus* en su respectivo medio de cultivo, después se colocaron círculos de película comestible con antimicrobiano sobre el agar, se incubaron ambos microorganismos a 30°C por 48 h y a 37°C por 24 h respectivamente. El efecto antimicrobiano del material de empaque activo conteniendo nisina se realizó inoculando 100 μ L de *S. aureus* sobre un trozo de jamón (Premium, Zwan) previamente flameado de dimensión 5 cm x 5 cm; posteriormente se cubrió con la película activa y se empacó al vacío. Se realizó la cuenta de la carga microbiana inicial y la cuenta de la carga microbiana al segundo, quinto y octavo día por duplicado utilizando la técnica de extensión en superficie sobre AST. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 7°C.

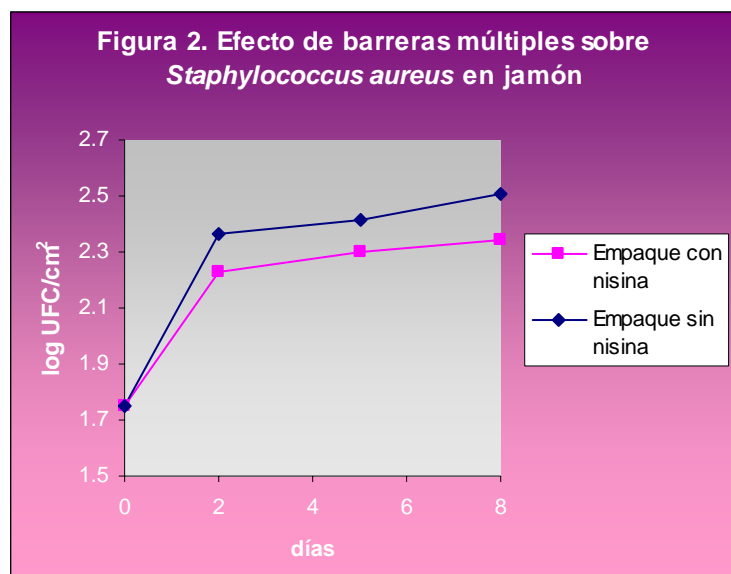
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De los agentes antimicrobianos incorporados a la película comestible, el que tuvo mayor efecto de inhibición sobre *S. aureus* fue la nisina. No hubo evidencia de inhibición de Nicon LQ* sobre *S. aureus*, y tampoco evidencia alguna de efecto sinérgico o aditivo de la mezcla nisina-Nicon LQ*. En la Figura 1 se muestran los espectros de inhibición de los agentes antimicrobianos aplicados.

Figura 1. Efecto de agente antimicrobiano sobre *M. luteus* y *S. aureus*.

Microorganismo	Nisina	Nicon LQ*	Nisina-Nicon LQ*
<i>M. luteus</i>			
<i>S. aureus</i>			

La combinación de empaque comestible y activo conteniendo nisina, envasado al vacío y refrigeración, como barreras de protección del jamón durante un periodo de almacenamiento de 8 días, mostró buenos resultados inhibiendo el desarrollo de *S. aureus*, de manera modesta, al compararlo con el control, como se muestra en la Figura 2.



El recubrimiento comestible sin nisina muestra que el crecimiento de *S. aureus* en el jamón, aún en condiciones de empaquetado al vacío y refrigeración, tiende a aumentar. Cabe mencionar que al evaluar las muestras a partir del quinto día, fue evidente el olor característico de deterioro en estas muestras.

CONCLUSIONES

La inocuidad de los alimentos es un elemento fundamental de la salud pública y un factor determinante del comercio de alimentos. Es importante seguir lineamientos dirigidos a conservar la inocuidad alimentaria a fin de evitar que bacterias como *S. aureus* se multipliquen y causen intoxicaciones alimentarias. Este trabajo muestra que la aplicación de envasado al vacío y refrigeración no es suficiente para la inhibición del desarrollo de *S. aureus* en jamón, sin embargo, la aplicación del recubrimiento comestible con nisina complementó la tecnología de barreras, aunque en cantidad insuficiente para mejorar la vida de anaquel. Cálculos preliminares indican que se utilizaron 3 g nisina pura/kg de película (ppm), cantidad que puede aumentarse para mejorar el efecto antimicrobiano. La utilidad de una película comestible reside en su capacidad de mejorar las características de los alimentos extendiendo su vida de anaquel, con un beneficio tanto para la industria alimentaria como para el medio ambiente, sobre todo si se considera que el uso intensivo de materiales plásticos ha ocasionado grandes problemas en la acumulación de residuos sólidos urbanos, ya que son prácticamente no biodegradables. La caracterización de una película y de sus propiedades es importante para poder determinar su aplicación y su funcionalidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Chen H., “Functional Properties and Applications of Edible Films Made of Milk Proteins”, Journal of Dairy Science, 78(11), 2563–2583, **1995**.
- Chi-Zhang Y., Yam K. L., Chikindas M. L., “Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system”, International Journal of Food Microbiology, 90, 15–22, **2004**.
- Cutter, C. N., Siragusa, G. R., “Incorporation of nisin into a meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces”, Applied Microbiology, 28, 19–23, **1998**.
- Fernández E. E., “Microbiología de alimentos”, Universidad Autónoma de Querétaro, **2000**.
- Gill, A. O., Holley, R. A., “Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA”, Food Res. Int., 33, 83–90, **2000**.
- Leistner, L., “Basic Aspects of Food Preservation by Hurdle Technology”, International Journal of Food Microbiology, 99, 235–240, **2000**.
- Min S., Harris L. J., Krochta J. M., “*Listeria Monocytogenes* Inhibition by Whey Protein Films and Coatings Incorporating the Lactoperoxidase System”, Journal of Food Science, 70(7), M317–M328, **2005**.
- Min S., Harris L. J., Krochta J. M., “Antimicrobial Effects of Lactoferrin, Lysozyme, and the Lactoperoxidase System and Edible Whey Protein Films Incorporating the Lactoperoxidase System Against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7”, Journal of Food Science, 70(7), M332–M338, **2005**.
- Pongtharangkul T., Demirci A., “Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification”, Applied Microbiology and Biotechnology, 65, 268–272, **2004**.
- Varnam A. H., Evans M. G., “Foodborne Pathogens, an illustrated text”, Wolfe Publishing Ltd., England, **1991**.