

# **EFFECTO ANTIMICROBIANO DE NISINA INCORPORADA A EMPAQUES COMESTIBLES SOBRE EL DESARROLLO DE *M. luteus* y *B. thermosphacta* EN JAMÓN**

Téllez Trejo I. P., García Almendaréz B. E., Regalado González C.  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de Querétaro

## **RESUMEN**

Las características microbiológicas y la composición química de la carne la convierten en un excelente sustrato para los microorganismos. Desde un punto de vista microbiológico, la propiedad más importante que presenta la carne es un elevado contenido en agua, lo que permite el crecimiento de la mayor parte de microorganismos. *Brochothrix thermosphacta* es un microorganismo responsable del deterioro de productos cárnicos y pescado. Se ha encontrado como microorganismo dominante en carne almacenada en atmósfera modificada (80% O<sub>2</sub>, 20% CO<sub>2</sub>) y constituye, junto con las bacterias ácido lácticas (BAL), la microbiota predominante en productos cárnicos envasados al vacío. En éstos, el crecimiento de *B. thermosphacta* conduce a su alteración debido a su carácter proteolítico y a la producción de ácido láctico, etanol y ácidos grasos de cadena corta que provocan la aparición de olores desagradables. De ahí 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 ofrecer mayor calidad y seguridad alimentaria. El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento de *B. thermosphacta* en jamón recubierto con empaque comestible a base de proteína de suero lácteo incorporado con 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/cm<sup>2</sup> de *B. thermosphacta* usando agar soya tripticaseína (AST). Los empaques comestibles con nisina inhibieron el desarrollo de *B. thermosphacta* en jamón empacado al vacío y almacenado en refrigeración durante el periodo de evaluación.

## **INTRODUCCIÓN**

La seguridad y estabilidad en la composición microbiológica así como en la calidad sensorial y nutricional de la mayoría de los alimentos, se basa en la combinación de diversos factores de conservación llamados barreras múltiples. Las principales barreras usadas para la conservación de alimentos son la temperatura (alta o baja), la actividad de agua, acidez, potencial redox, conservantes y diversos microorganismos competidores como las bacterias ácido lácticas (BAL) (Leistner, 2000). Las diferentes barreras aplicadas en un alimento pueden actuar de manera combinada afectando simultáneamente la membrana celular, ADN, síntesis de enzimas, etc., del microorganismo alterante, afectando su homeostasis de alguna manera. Desde hace algunos años se ha investigado la tecnología de recubrimientos comestibles con algún agente antimicrobiano incorporado en la película, los cuales sirven como barreras de protección y conservación, para conservar las características y prolongar la vida de anaquel de los alimentos. Se trata de películas biodegradables que se adhieren a la superficie del alimento mediante el uso de surfactantes en su formulación, creando una microatmósfera en torno a él que dependiendo del tipo de recubrimiento puede reducir la permeabilidad al oxígeno. 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 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, una bacteria ácido láctica. La nisina presenta un amplio espectro antimicrobiano principalmente contra 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, alterando 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, inmediata digestibilidad por la enzima  $\alpha$ -quimotripsina, estabilidad al calor a bajo pH, y ausencia de color y sabor (Pongtharankul et al, 2004). *B. thermosphacta* es una bacteria gram positiva responsable de la alteración de productos cárnicos y de pescados, crudos y cocidos, envasados al vacío y almacenados en frío. El jamón se encuentra entre los productos cárnicos más perecederos y en los que con mayor frecuencia se ha referido la alteración debida a *B. thermosphacta*. Además, se trata de un alimento susceptible de ser protegido con barreras múltiples, ya que por su bajo contenido en sal (aprox. 2 %), pH cerca de 6 y actividad de agua superior a 0.945; presenta condiciones que propician el crecimiento de microorganismos asociados a la contaminación post-proceso. Actualmente se utiliza el envasado al vacío como forma de controlar a *B. thermosphacta*, pues se consideraba que la ausencia de oxígeno impedía el crecimiento de esta bacteria. Sin embargo, hay información que asegura que el vacío no es suficiente para proteger de la alteración por *B. thermosphacta*, por lo que se han buscado métodos que puedan aplicarse en el control de este microorganismo, como alternativa al vacío o también como barrera complementaria al mismo. Con este objeto se han combinado con el vacío, distintos conservadores químicos y biológicos, para aumentar su eficacia. En general, los resultados de combinar la nisina con el vacío han dado resultados satisfactorios (Cutter y Siragusa, 1998; Gill y Holley, 2000).

## MATERIALES Y MÉTODOS





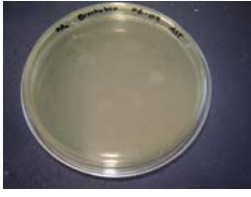

Se utilizaron como medios de cultivo caldo assay, caldo soya tripticaseína (CST) (Bioxon®), agar assay, agar soya tripticaseína (AST) (Bioxon®) y peptona bacteriológica (Oxoid®) al 0.1% como diluyente. Los microorganismos usados fueron *B. thermosphacta* y *M. luteus* como microorganismo indicador. Formulación de la película comestible: aislado de proteína de suero (WPI) 5% (w/v), sorbitol no cristalizante 7% (w/v), cera de abeja 0.4% (w/v), Tween 20 0.1% (w/v), nisina como agente antimicrobiano (11 mg/mL) y/o Nikon LQ\*(300ppm). El 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 1min y nuevamente se homogenizó 1min a 21500rpm. La solución se vertió en un recipiente en baño de hielo para enfriar rápidamente, se agregó la nisina con o sin Nikon dependiendo de la formulación y se ajustó el pH a 5.6, (Nikon LQ sin ajuste de pH). La solución se desgasificó y se vaciaron 4 mL sobre placas de vidrio de 10 cm x 10 cm, las películas se secaron a temperatura ambiente por 24 h, y se esterilizaron 3 h con luz UV. Se evaluó el efecto antimicrobiano de nisina, Nikon LQ\* y una mezcla nisina-nikon LQ\*, mediante el método de difusión en agar, inoculando por extensión en superficie 100  $\mu$ L de *M. Luteus* y *B. thermosphacta* 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. Para la evaluación de la combinación de barreras de conservación del jamón, se cortaron trozos de jamón de 5 cm x 5 cm, se flameó la superficie del jamón, y en condiciones asépticas se inoculó 100  $\mu$ L de una suspensión de *B. thermosphacta* en CST, para obtener una cuenta inicial mínima de  $10^5$

UFC/cm<sup>2</sup>. Seis muestras de jamón fueron recubiertas con empaque comestible sin antimicrobiano (control), y otras seis muestras de jamón se recubrieron con empaque comestible con nisina. Las muestras fueron empacadas al vacío y almacenadas en refrigeración. Se obtuvieron muestras a los 2, 5 y 8 días de almacenamiento para recuento bacteriano por duplicado utilizando la técnica de extensión en superficie sobre AST.

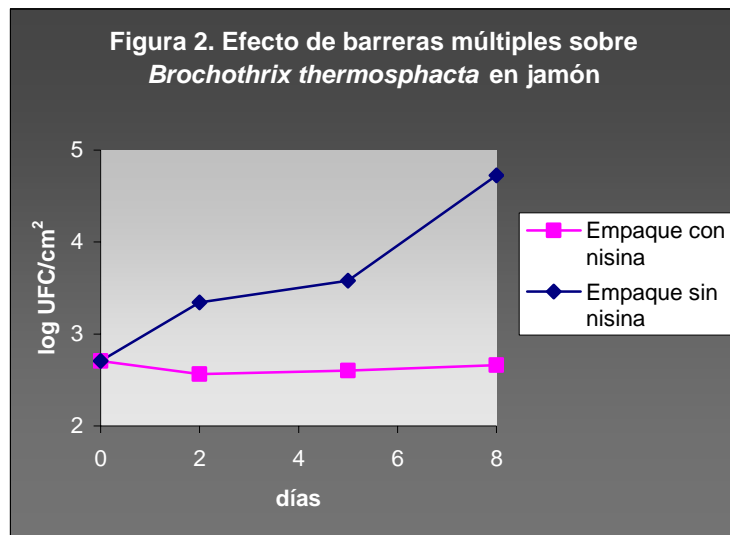
## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De los agentes antimicrobianos incorporados a la película comestible, el que tuvo mayor efecto de inhibición sobre *B. thermosphacta* fue la nisina, no hubo evidencia de efecto de Nicon sobre *B. thermosphacta*, y tampoco evidencia alguna de efecto sinérgico de la mezcla nisina-Nicon. 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 *B. thermosphacta*.

Microorganismo	Nisina	Nicon LQ*	Nisina-Nicon LQ*
<i>M. luteus</i>			
<i>B. thermosphacta</i>			

La combinación de empaque comestible con nisina, envasado al vacío y refrigeración, como barreras de protección y conservación del jamón durante un periodo de 8 días, mostró resultados satisfactorios inhibiendo notablemente el desarrollo de *B. thermosphacta*, como muestran los resultados de la Figura 2.



El recubrimiento comestible sin nisina muestra que el crecimiento de *B. thermosphacta* en el jamón, aún en condiciones de envasado al vacío y refrigeración, tiende a aumentar, cabe mencionar que al evaluar las muestras control a partir del día 5 de almacenamiento, fue evidente el olor característico de deterioro en estas muestras. Por otro lado las muestras conteniendo recubrimiento con nisina no mostraron deterioro después de 5 días de almacén.

## CONCLUSIONES

La seguridad alimentaria es una de las principales preocupaciones de la industria y también de los consumidores, por lo que el estudio de la calidad microbiológica de productos cárnicos es crucial para aportar a los productores una base para la obtención de productos seguros de alta calidad. La tecnología de barreras para la conservación y protección de alimentos es una alternativa con resultados satisfactorios; sin embargo, es necesario implementar las barreras que puedan ser aplicadas a un alimento específico. Este trabajo demuestra que la aplicación de envasado al vacío y refrigeración no es suficiente para la inhibición del desarrollo de *B. thermosphacta* en jamón. Sin embargo, la aplicación del recubrimiento comestible con nisina complementó la tecnología de barreras, extendiendo además la vida de anaquel. Los empaques comestibles surgen de la necesidad del aprovechamiento de recursos biodegradables y para la protección del medio ambiente, además junto con la adición de antimicrobianos en su red biopolimérica, es posible una aplicación tecnológica efectiva para la conservación y control microbiológico de diferentes alimentos como frutas, hortalizas, productos cárnicos, cereales, etc.

## 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**.
- Pongtharankul T., Demirci A., “Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification”, Applied Microbiology and Biotechnology, 65, 268–272, **2004**.