

CINÉTICA DE LA LIBERACIÓN DE NISINA INCORPORADA EN PELÍCULAS COMESTIBLES ELABORADAS A BASE DE AISLADO DE SUERO DE LECHE

Bolaños Gómez, J.C. Regalado Gonzáles, C. Rossi Márquez, G.
Universidad Autónoma de Querétaro, Postrado de la Facultad de Química,
Laboratorio de Biotecnología en Alimentos

Resumen

El objetivo de este trabajo fue el evaluar el efecto de diferentes pH's y temperaturas en la liberación, en un intervalo de 3 días, de nisina incorporada a una película de aislado de suero de leche. La metodología utilizada para el muestreo fue tomar una alícuota (a las 1,3,6,9,12,24,36,48,60 horas) de la solución en la que se encuentran suspendidas las películas, para su posterior evaluación en un ensayo microbiológico utilizando a *Micrococcus luteus* como evaluador de la actividad antimicrobiana.

Introducción

La preservación de los alimentos se ha buscado desde los inicios de la humanidad para lograr mantener un reservorio de alimentos; los métodos utilizados han sido bastante constantes, el salado de los alimentos, el ahumado, la congelación, la conserva con ácido acético y en la era moderna se han utilizado compuestos químicos y procesos físicos para alargar la vida de los alimentos. En la actualidad existe una creciente preocupación por el uso de aditivos químicos y su correlación con enfermedades crónico-degenerativas (Forman ,2004; Frasier, et. al., 1979), por lo que el descubrimiento y desarrollo de sustancias naturales alternativas como preservativos ha tenido un auge. Aunado a esto, otra creciente preocupación por la preservación del medio ambiente ha creado un fuerte mercado en la utilización de empaques biodegradables. En conjunto, estos problemas han dado paso a la creación de empaques activos, biodegradables y con muchas cualidades positivas en la conservación y alargamiento de la vida de anaquel de los alimentos. Los empaques activos tienen propiedades específicas como son la permeabilidad al vapor de agua, el grado de difusión de gases (O₂), proporcionar una protección contra microorganismos, así como también deben de cumplir con las propiedades físicas y mecánicas de los polímeros petroquímicos (Gilbert, et. al., 1995). Los empaques activos se conforman de algún polímero orgánico adicionado con un plastificante, y sus propiedades varían ampliamente conforme a las proporciones utilizadas y conforme a otros aditivos utilizados. La nisina es una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* con capacidad inhibitoria hacia bacterias Gram +. En este artículo se analizó la liberación de nisina incorporada en una película elaborada a base de aislado de suero de leche, con sorbitol como plastificante y cera de abeja para mejorar la permeabilidad al vapor de agua.

Materiales y Métodos

Medio de ensayo al 1% para *Micrococcus luteus*:

- Peptona bacteriológica 10g/l
- Extracto de levadura 1.32g/l
- Agar bacteriológico 10g/l
- Azúcar mascabado 1g/l
- Extracto de carne 3g/l
- Tween 80 10ml/l
- NaCl 3g/l

Se ajustó el pH de la solución a 7.5, se llevó a ebullición por 1 minuto y se esterilizó

Caldo de ensayo al 1% para *Micrococcus luteus*:

- Peptona bacteriológica 10g/l
- Extracto de levadura 1.32g/l
- Azúcar mascabado 1g/l
- Extracto de carne 3g/l
- Tween 80 10ml/l
- NaCl 3g/l

Se ajustó el pH a 7.5 y se esterilizó

Solución para agitación de la película de WPI

- Fosfato de potasio 11.4g/l
- Agua destilada Aforar a 1 litro
- Tween 20 8ml/l
- Glicerol 73ml/l

La solución se ajusta al pH deseado y se esteriliza

Solución para dilución de muestras

La solución consta de una proporción 1 a 1 de:

- HCl 0.02N : Tween 20

Es necesario esterilizar la solución

Solución Ringer ¼

- Cloruro de calcio anhidro 0.24g/l
- Bicarbonato de sodio 0.2g/l
- Cloruro de potasio 0.416g/l
- Cloruro de sodio 9g/l
- Agua destilada Aforar a 1 litro
- Diluir la solución a ¼ con agua destilada

Solución Tween 20 al 50%

- Agua Destilada 500ml/l
- Tween 20 500ml/l

Curva estándar de inhibición con nisina

Se realizó una curva estándar de nisina a partir de una solución de 1000UI de nisina :

- HCl 0.02N 50ml
- Nisina 0.05g

Películas de aislado de suero de proteína (WPI)

- Cera de abeja 4g/l
- Tween 80 1ml/l
- Sorbitol 50g/l
- Nisina 11g/l
- Agua 884ml
- WPI 50g/l

Se mezclaron el WPI con el sorbitol y el agua, ajustando el pH a 7.5. Se colocó la solución en baño maría (85-95° C) por 25 minutos. Posteriormente se agrega la cera de abeja y se deja 5 minutos en baño maría (85-95° C). Pasados los 5 minutos se agrega el tween 80 y se homogeneiza a 21500rpm por 3 minutos, dejando reposar 1 minuto entre el minuto 2 y el 3. Inmediatamente después de homogeneizar se pone la solución en un baño de hielo, esto con el propósito de formar cristales pequeños. Se agrega la nisina poco, cuidando que toda se solubilize. Ajustar el pH de la solución formadora de película a 5.6 y desgasificar. Con ayuda de una pipeta, se vertieron 3ml de solución

formadora de película en una caja petri de 5 cm de diámetro. Se dejan secar las películas por 48 horas a temperatura ambiente

Acondicionamiento de las películas

- Las películas se dejan acondicionar 24 horas en un recipiente hermético con una solución de Nitrato de Magnesio, para lograr una humedad relativa de 70%.

Medición del espesor de las películas de WPI

Se tomaron 10 mediciones en diferentes partes de la película con un micrometro digimático Mitutoyo APB-2C

Activación de *Micrococcus luteus* y preparación de solución madre

A partir de chaquiras con *M. luteus* se sembró un caldo de ensayo al 1% y se dejó incubar a 30° C 2 días. Se verificó la pureza resemebrando en tubo inclinado de medio de ensayo, incubando por 48 horas. Pasado el tiempo de incubación, se lavó uno de los tubos inclinados con 200 µl de solución ringer ¼ y con un asa bacteriológica se raspó el *M. luteus*. Ésta es la solución madre y tiene una viabilidad de 30 días.

Prueba de inhibición de muestras

Se prepararon cajas petri de 14cm de diámetro con 40 ml de medio assay, agregando 800µl de solución tween 20 al 50% y 800µl de solución ajustada de *Micrococcus luteus*. El *M. luteus* no debe de agregarse al medio si la temperatura esta por encima de los 35° C. Una vez preparadas las cajas, se ponen en refrigeración 1 hora. Con un horador del numero 4 estéril, se hicieron 13 pozos uniformemente distribuidos por caja; en cada pozo se vertieron 60µl de muestra, haciendo duplicados de cada muestra. El control utilizado en cada caja fue con estándar de nisina 10UI.

Los halos de inhibición se midieron con un Vernier MetroMex®

Prueba de inhibición de película: Pasado el tiempo necesario para la prueba, se tomo una muestra circular de 2mm de radio y se esterilizó con luz UV. La prueba de inhibición se realiza con *Micrococcus luteus* en agar sólido, poniendo la película directamente sobre el agar.

Resultados y discusión

	Inhibición
Día 0	+
Día 5	+
Día 10	+
Día 15	+
Día 20	+

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos, y como se puede observar la liberación de la nisina se ve eficientizada a 30°C y un pH 7; sin embargo la nisina se liberada más rapidamente a un pH de 5 y una temperatura de 30°C. Es constante en los 3 pH's que la liberación de la nisina se ve mejorada a altas temperaturas, esto probablemente se debe a una mejor solubilidad a elevadas temperaturas.

pH4								
4°C			15°C			30°C		
Medición	Inhibición (cm)	Inhibición (cm) Dilución 1:2	Medición	Inhibición (cm)	Inhibición (cm) Dilución 1:2	Medición	Inhibición (cm)	Inhibición (cm) Dilución 1:2
Hora 1	0	2.5	Hora 1	0	2.5	Hora 1	0	2.5
Hora 2	3.18	2.95	Hora 2	3.5	3.2	Hora 2	3.45	3.3
Hora 3	3.25	3.1	Hora 3	3.44	3.3	Hora 3	3.4	3.25
Hora 4	3.4	3.3	Hora 4	3.62	3.4	Hora 4	3.5	3.3
Hora 5	3.9	3.75	Hora 5	3.65	3.82	Hora 5	3.39	3.7
Hora 6	4.18	3.9	Hora 6	4.2	3.85	Hora 6	4.2	4.05
Hora 7	4	3.9	Hora 7	4.25	4	Hora 7	4.12	3.85
Hora 8	3.51	3.34	Hora 8	3.86	3.48	Hora 8	3.76	3.24
Hora 9	1.85	1.62	Hora 9	1.7	1.58	Hora 9	1.5	1.36
Promedio	3.03	3.151111111	Promedio	3.135555556	3.236666667	Promedio	3.035555556	3.172222222

pH5								
4°C			15°C			30°C		
Medición	Inhibición (cm)	Inhibición (cm) Dilución 1:2	Medición	Inhibición (cm)	Inhibición (cm) Dilución 1:2	Medición	Inhibición (cm)	Inhibición (cm) Dilución 1:2
Hora 1	3.725	3.55	Hora 1	4.025	3.9	Hora 1	3.95	3.9
Hora 2	4.19	3.85	Hora 2	4.2	4	Hora 2	4.5	3.9
Hora 3	4.15	3.93	Hora 3	4.08	3.89	Hora 3	4.18	3.85
Hora 4	4.2	4.05	Hora 4	4.15	4.025	Hora 4	4.125	4
Hora 5	4.02	3.55	Hora 5	4.05	3.63	Hora 5	4.1	3.9
Hora 6	4.2	3.83	Hora 6	4.18	3.78	Hora 6	4.09	3.92
Hora 7	4.1	3.8	Hora 7	4.05	3.76	Hora 7	4.14	3.76
Hora 8	4.08	3.78	Hora 8	n/a	3.71	Hora 8	4.13	3.77
Hora 9	2.05	1.88	Hora 9	2.16	1.95	Hora 9	2.2	1.95
Promedio	3.857222222	3.58	Promedio	3.861875	3.627222222	Promedio	3.935	3.661111111
pH7								
4°C			15°C			30°C		
Medición	Inhibición (cm)	Inhibición (cm) Dilución 1:2	Medición	Inhibición (cm)	Inhibición (cm) Dilución 1:2	Medición	Inhibición (cm)	Inhibición (cm) Dilución 1:2
Hora 1	3.95	3.8	Hora 1	4.4	3.725	Hora 1	3.9	3.59
Hora 2	3.9	3.9	Hora 2	4.4	3.8	Hora 2	3.95	3.75
Hora 3	3.92	3.74	Hora 3	4.05	3.77	Hora 3	3.66	3.45
Hora 4	4.5	4.3	Hora 4	4.35	4.2	Hora 4	4.37	4.2
Hora 5	3.93	3.35	Hora 5	3.84	3.5	Hora 5	4.83	3.53
Hora 6	3.98	3.8	Hora 6	3.96	3.67	Hora 6	4	3.7
Hora 7	3.98	3.87	Hora 7	4.01	3.7	Hora 7	4.13	3.7
Hora 8	2.14	1.83	Hora 8	2.15	1.91	Hora 8	2.2	1.84
Hora 9	1.72	1.45	Hora 9	1.7	1.39	Hora 9	1.4	0.88
Promedio	3.557777778	3.337777778	Promedio	3.651111111	3.296111111	Promedio	3.604444444	3.182222222

Conclusión

La aplicabilidad de las películas de suero de leche es amplia, ya que cumplen con una amplia gama de propiedades físicas necesarias para la industria empacadora de alimento, y en cuanto a la liberación de la nisina, aun cuando se observa una mejor afluencia de nisina a un pH de 7, en otros rangos de pH la nisina sigue siendo eficiente como un antibacteriano vs Gram +. Así mismo podemos observar que aun pasados 20 días, la película continua teniendo propiedades antimicrobianas, lo que da un valor agregado al alargar la vida de anaquel del producto.

Referencias

- A.C. Seydim y G. Sarikus, "Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils" Food Research International, Volumen 39, Número 5, 639-644, 2006.
- Dong Su Cha, Manjeet S. Chinnan, "Biopolymer-Based Antimicrobial Packaging: A Review", Critical reviews in food science and nutrition, Volumen 44, Número 4, 223-237, 2004
- Forman D., "Commentary: Nitrites, nitrates and nitrosation as causes of brain cancer in children: epidemiological challenges" International Journal of Epidemiology, Volumen 33, 1216-1218, 2004
- Fraser P., Chilvers C., Beral V. y Hill M.J., "Nitrate and Human Cancer: A Review of the Evidence", International Journal of Epidemiology, Volumen 9 Número 1,3-12, 2004
- P. Suppakul J. Miltz K. Sonneveld y S.W. Bigger, "Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications", Journal of Food Science, Volumen 68, Número 2, 408-420, 2003
- S. Guilbert, N. Gontard, B. Cuq, "Technology and applications of edible protective films", Packaging Technology and Science, Volumen 8 Número 6, 339-346, 1995.

Anexo 1



