

# PELÍCULA ANTIMICROBIANA A BASE DE PROTEÍNA DE SUERO LÁCTEO, INCORPORADA CON BACTERIAS LÁCTICAS COMO CONTROLADOR DE *Listeria monocytogenes*, APLICADA SOBRE SALMÓN AHUMADO

## FILM ANTIMICROBIAL BASED WHEY PROTEIN, LACTIC ACID BACTERIA INCORPORATED AS CONTROLLER *Listeria monocytogenes* APPLIED TO SMOKED SALMON.

DEYCI RODRÍGUEZ<sup>1</sup> Y RENATE SCHÖBITZ R<sup>2</sup>

### PALABRAS CLAVES:

concentrado de proteína de suero, bacterias ácido lácticas, sustancias tipo bacteriocina, biocontrolador, *Listeria monocytogenes*.

### KEYWORDS:

Whey protein concentrated, lactic acid bacteria, substances type bacteriocina, biocontrol, *Listeria monocytogenes*.

### RESUMEN

*El concentrado de proteína de suero lácteo (CPS) posee propiedades funcionales apropiadas para la elaboración de películas biopreservantes, siendo factible la incorporación de bacterias ácido lácticas (BAL) productoras de sustancias tipo bacteriocina (STB) y así, lograr un efecto controlador sobre *Listeria monocytogenes* al ser utilizada como cobertura sobre salmón ahumado. Las condiciones para la formación de la película fueron: CPS 12% p/v, glicerol 18% v/v, pH en solución formadora de película 7,0 y 8,0, y secado a 30°C por 16 horas. La actividad inhibitoria de la película incorporada con las cepas lácticas fue evaluada usando el método de difusión frente a un césped de *L. monocytogenes* y mediante el recuento en placa, obteniendo: la combinación de dos cepas BAL aumentó la actividad controladora sobre *L. monocytogenes* logrando reducir hasta 2,1 ciclos logarítmicos el crecimiento de este patógeno, bajo condiciones de refrigeración durante 15 días.*

### ABSTRACT

*The Whey protein concentrated (WPC) has functional properties suitable for developing films biopreservantes. Thanks to the functional properties*

---

Recibido para evaluación: 7 de agosto. Aprobado para publicación: 12 de agosto

1 Microbióloga. M. Sc. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile

2 Tec. Medico. M. Sc. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile.

*of its components, was feasible the incorporation of lactic acid bacteria (LAB) producing substances type bacteriocins (STB) and thus achieve and effective control Listeria monocytogenes to be applied on smoked salmon. The conditions for the formation of the film were: CPS 12% w / v, glycerol 18% v/v, pH of film-forming solution 7.0 and 8.0, and dried at 30 ° C for 16 hours. The study of inhibitory activity of the film incorporated with lactic strains was evaluated using the diffusion method against a lawn of L. monocytogenes and by plate counting, getting the combination BAL-A + B, increases the activity of controlling L. monocytogenes achieving 2.1 log units to reduce the growth of this pathogen under refrigeration for 15 days.*

## INTRODUCCIÓN

*L. monocytogenes* es una bacteria patógena, psicrotrófica, ubicua. La enfermedad que causa es conocida como listeriosis, se presenta al ingerir alimentos contaminados, afecta principalmente a personas inmunosuprimidas, mujeres embarazadas y recién nacidos. Este patógeno es considerado un contaminante post-proceso, puede crecer y sobrevivir a temperaturas entre 0°C y 45°C, incluso a 48°C, sobrevive a pH bajos, ambientes anaerobios y desecación; se ha demostrado que resiste hasta 28% de sal y altas concentraciones de nitritos [1, 2].

El salmón ahumado es un alimento listo para consumo, tiene una vida útil de varias semanas cuando es almacenado a temperaturas de refrigeración y empaclado al vacío; *L. monocytogenes* se ha presentado ocasionalmente como contaminante de este producto, siendo un sustrato vulnerable dado las características de contenido de sal, el pH y la actividad de agua ( $A_w$ ), parámetros que favorecen el crecimiento de este organismo bajo condiciones de refrigeración y envasado al vacío [3].

Se han propuesto variados métodos para el control post-proceso de *L. monocytogenes* en alimentos, incluyendo la aplicación directa de sustancias antimicrobianas, tratamiento térmico, irradiación, procesamiento a alta presión, películas y/o coberturas con antimicrobianos [4]. Estas películas proveen protección física y de barrera a los alimentos, controlan el crecimiento microbiano y son un medio propicio para incorporar aditivos y sustancias como los antimicrobianos naturales [5,6]. Diversos materiales han sido usados como base para

la elaboración de dichas películas, todos reconocidos como seguros para consumo humano. Entre ellos se encuentran polisacáridos, lípidos y proteínas. Los de mayor aplicación en la industria cárnica son proteína de suero, caseína, proteína de soja, gluten de trigo y alginato. En cuanto a las proteínas de suero lácteo, éstas, representan el 20% del total de las proteínas en la leche; comercialmente conocidos como concentrados de proteína de suero lácteo CPS por su contenido en proteínas entre 25 a 80% ó aislados de proteína de suero lácteo APS con valores cercanos al 90% de proteínas. Las principales proteínas del suero, la b-lactoglobulina y, la  $\alpha$ -lactoalbumina al ser desnaturalizadas por calor producen películas transparentes, insípidas y flexibles, pero, es necesario incorporar sustancias plastificantes como el glicerol para incrementar la flexibilidad y mejorar sus propiedades mecánicas [7, 8].

La incorporación de biopreservantes naturales en alimentos ha sido tema de investigación en los últimos años, algunos como las bacterias ácido lácticas se ha demostrado que interfieren con el desarrollo de patógenos dado que al competir por nutrientes y por producción de sustancias con acción inhibitoria como ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, etc.); peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Por lo anterior, el uso de sustancias antimicrobianas naturales nivel industrial en alimentos debe ser considerado como una alternativa, por su efectividad en contra de patógenos [9, 10, 11, 12]. El objetivo de este trabajo fue, evaluar sobre trozos de salmón ahumado una película a base de proteína de suero lácteo incorporada con bacterias lácticas, como biocontroladora de *L. monocytogenes*.

## MATERIALES

Material biológico: cepas *Carnobacterium* spp. denominadas cepa BAL-A, aislada de salmón ahumado y cepa BAL-B aislada de carne envasada al vacío. *Listeria monocytogenes*, aislada de salmón ahumado.

-

Antimicrobiano comercial: nisina, Nisaplin (Danisco®).  
Medios de cultivo: Agar D-MRS para bacterias lácticas (Schillinger et al., 1993) [9], agar soya tripticasa (ST) y agar OXFORD para *L. monocytogenes*.

Componentes de la película: concentrado de proteína de suero CPS 80% (Lactoprin-80, PRINAL S.A.), glicerol al 99% (WINKLER Ltda.).

## METODOLOGÍA

Para la elaboración de la película (Figura 1) se trabajó con una solución acuosa CPS al 12% (p/v) y glicerol al 18% (v/v), una vez disueltos, se ajustó el pH a 7,0 y 8,0 con NaOH 0,1N. La solución fue sometida a 90°C por 30 minutos, en baño termostático, posteriormente, se redujo la temperatura a 20°C en baño de agua con hielo y se incorporó el concentrado celular. Para la formación de la película fueron dispuestos volúmenes de 15 mL por placa, en cajas de petri desechables (Corning, 150mmx25mm). El secado se realizó en estufa a 30°C por 16 horas, asegurando la dispersión y uniformidad de las películas previo al secado [13,14].

De las cepas BAL incorporadas en las películas se evaluó: a) la actividad inhibitoria de la sustancia tipo bacteriocina (STB) frente a *L. monocytogenes*, mediante prueba de antagonismo, utilizando el método de difusión desde discos de películas de CPS que contenían las cepas BAL-A, BAL-B y la mezcla de cepas BAL-A+B b) la viabilidad de las BAL, mediante recuento en placa, durante 20 días a 4°C; c) la actividad inhibitoria de las BAL en las películas como cobertura ó empaque sobre trozos de salmón ahumado (4cmx4cm) inoculados con *L. monocytogenes* a una concentración de  $10^5$  UFC/ml

y envasado al vacío (Figura 2), y d) viabilidad de BAL y *L. monocytogenes* durante almacenamiento por 15 días a 7°C, estas dos últimas mediante recuento en placa en agar D-MRS y OXFORD respectivamente.

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante análisis de varianza, con un nivel de confianza de 95% según Tukey.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de películas biodegradables tiene gran interés por su bajo impacto ambiental, además de ser vehículo de bacterias lácticas, contribuyen a asegurar la inocuidad de productos alimenticios como el salmón ahumado.

**Figura 1.** Película de CPS Lácteo incorporadas con bacterias ácido lácticas.



**Figura 2.** Trozo de salmón cubierto con película de proteína de suero y envasado al vacío.



La viabilidad de las cepas BAL-A, BAL-B y BAL-A+B incorporadas en la película de proteína evaluadas in vitro tanto a pH 7,0 como pH 8,0 no presento diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

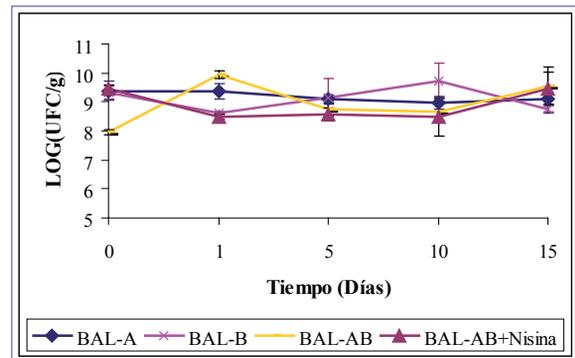
En cuanto a la viabilidad de las cepas BAL y las cepa BAL + nisina en película a pH 8,0 evaluada sobre salmón (Figura 3), se observó que no hubo crecimiento sin diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), excepto, para la cepa BAL-B la cual mostró un aumento en su crecimiento al día 10 respecto al día 1, durante el tiempo de almacenamiento a 7°C.

En cuanto a la actividad antagonista de las cepas BAL incorporadas (Figura 4), las STB lograron reducir el crecimiento de *L. monocytogenes*, en 1,7 Log de UFC/cm<sup>2</sup> la cepa BAL-A y 2,11 Log de UFC/cm<sup>2</sup> la combinación de las cepa BAL A+B. En el caso de la película incorporada con cepa BAL-B el efecto controlador no se observo, al ser aplicada sobre salmón ahumado.

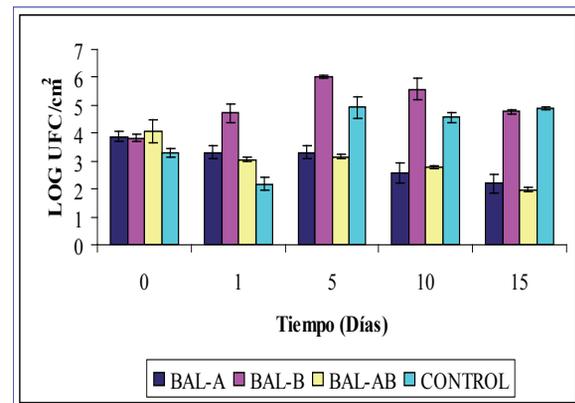
También fue evaluada la combinación cepas BAL-A+B + nisina (Nisaplin, Danisco 100UI/mL) (Figura 5), aplicada por aspersión sobre la película logrando una disminución de 0,52 Log de UFC/cm<sup>2</sup> del patógeno por la combinación de BAL-A+B, el uso de cepas combinadas potencia la actividad y acción de las sustancias inhibitorias frente al patógeno evaluado. En el caso de la aspersión de nisina sola, el efecto inhibitorio se dio hasta las 24 horas de almacenamiento, el patógeno mostró resistencia frente a la nisina y continuo desarrollándose. La actividad antimicrobiana de la nisina depende del pH, de las condiciones de aplicación y de la composición de los alimentos; así como del tipo y número de microorganismos presentes y de la concentración de nisina [14,15].

Simultáneamente fue evaluado el pH en la película incorporada con las cepas lácticas, partiendo de un pH 8,0 en película; al incorporar las cepas lácticas se observó una disminución de 0,5, en el valor del pH, al día final (día 15) se registro un pH de 5,28 en película, mostrando la actividad metabólica de las bacterias incorporadas.

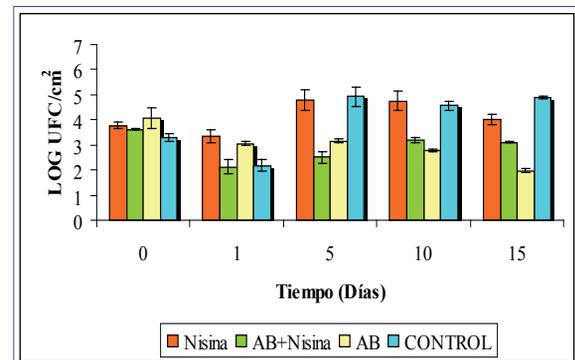
**Figura 3.** Viabilidad de las cepas BAL en la película de proteína a pH 8,0, almacenadas a 7°C por 15 días.



**Figura 4.** Efecto antagonista de las STB desde la película de proteína a pH 8,0, frente a *L. monocytogenes* bajo condiciones de refrigeración por 15 días.



**Figura 5.** Efecto antagonista de nisina, STB de BAL-A+B + nisina cepas BAL-A+B desde la película de proteína frente a *L. monocytogenes* a pH 8,0.



## CONCLUSIONES

El diseño de las películas a base de proteína de suero ofreció las condiciones apropiadas para la incorporación y viabilidad de cepas BAL para su uso como biopreser-

vante y controlador de *L. monocytogenes*, mediante la STB durante el tiempo evaluado.

Fue demostrada la actividad inhibitoria de la combinación de las cepas BAL A+B y BALA+B+nisina frente a *L. monocytogenes* durante todo el período de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración del salmon ahumado cubierto con la película y envasado al vacío.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Fondo de Fomento Al Desarrollo científico y Tecnológico (FONDEF) proyecto D04i1153 y la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) del Gobierno de Chile.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1]. HAYMAN, M., ANANTHESWARAN, R., & KNABEL, S. 2008. Heat shock induces barotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*; 71(2):426 - 430.
- [2]. PEREZ RODRIGUEZ, F., TODD, E., VALERO, A., CARRASCO, E., GARCÍA, R. & ZURELA, G. 2006. Linking quantitative exposure assessment and Risk management using the food safety objective concept: An example with *Listeria monocytogenes* in different crosscontamination scenarios. *Journal of Food Protection*. 69, (10):2384 - 2394.
- [3]. MIN, S., HARRIS, L. HAN, J., & KROCHTA, J. 2005. *Listeria monocytogenes* inhibition by Whey Protein Films and Coatings incorporating lysozyme. *Journal of Food Protection*. 68 (11): 2317 - 2325.
- [4]. NEETOO, H., VE, M. & CHEN, H. 2007. Effectiveness and stability of Plastic Films Coated with Nisin for inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 70 (5): 1267-1271.
- [5]. CAGRI, A., USTUNOL, Z. & RYSER, E. 2001. Antimicrobial, Mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey Protein – based edible films containing p-aminobenzoico or Acids Sorbic. *Journal of Food Science*; 66 (6) 865-870.
- [6]. LIN, D. ZHAO, Y. 2007. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processes fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food safety*; (6): 60 -74.
- [7]. GALIETTA, G.; HARTE, F.; MOLINARI, D. Y CAPDEVIELLE, R. 2005. Aumento de la vida útil postcosecha de tomate usando una película de proteína de suero de leche. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 6(2):117-123.
- [8]. MCHUGH, T., AUJARD, A. & KROCHTA, J. 1994. Plasticized Whey Protein Edible Films: Water Vapor Permeability Properties. *Journal of Food Science*. Vol. 59(2): 416-419.
- [9]. SHILLINGER, U., STILES, M., & HOLZAPEL, W. 1993. Bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV 61. *International Journal of Food Microbiology* 20: 131-147.
- [10]. BRILLET, A., PILET, M., PREVOST, H., BOUTTEFROY, A. & LEROI, F. 2004. Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity o bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*. 97: 1029-1037.
- [11]. CLEVELAND, J., MONTVILLE, T., NES, I. & CHIKINDAS, M. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71: 1-20.
- [12]. SCHÖBITZ, R., ZAROR, T., LEON, O. & COSTA, M. 1999. A bacteriocin from *Carnobacterium piscicola* for the control of *Listeria monocytogenes* in vacuum packaged meat. *Food Microbiology*. 16:249-255.
- [13]. SCHÖBITZ, R., SUAZO, V., COSTA, M., & CIAMPI, L. 2003. Effects of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Carnobacterium piscicola* against human and salmon isolated of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 84:237-244.
- [14]. ALCANTARA, C., RUMSEY, T. & KROCHTA, J. 1998. Drying rate effect on the properties of whey protein films. *Journal of food Process Engineering*. 21, 387-405.

- [15]. GROWER, J.; COOKSEY, K. & GETTY, J. 2004. Development and Characterization of an Antimicrobial Packaging Film Coating Containing Nisin for Inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*; 67(3): 475-479.