

## MI PROYECTO DE TESIS

### **Control de microorganismos alterantes y patógenos de leche y queso de oveja de la provincia de León por D-eritroascorbato (análogo natural de la vitamina C) y otros antioxidantes utilizados en la industria alimentaria**

Marta Gutiérrez Larraínzar

Área de Bioquímica y Biología Molecular. Departamento de Biología Molecular. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. 24071. León.

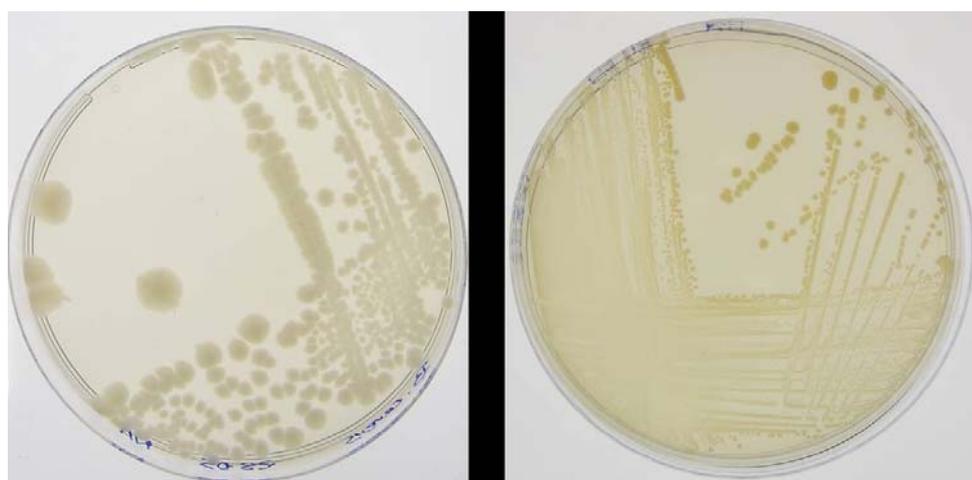
[mgutl@unileon.es](mailto:mgutl@unileon.es)

El deterioro y/o la alteración de los alimentos por los microorganismos es un problema que, hoy en día, no ha sido llevado a un adecuado control, a pesar de la amplia gama de técnicas de conservación. Los consumidores, cada vez más, evitan las comidas preparadas con conservantes de origen químico y las alternativas naturales son, por lo tanto, necesarias para lograr una vida útil suficientemente larga del alimento así como un alto grado de seguridad respecto a los microorganismos patógenos. Por ello, aún es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para la reducción y eliminación de agentes patógenos transmitidos en los alimentos, posiblemente en combinación con métodos ya existentes. Además, en la sociedad occidental hay un interés creciente hacia un consumismo natural, deseando menos aditivos sintéticos en los alimentos y productos con un menor impacto medioambiental (Burt, 2004). En este sentido muchos estudios se centran en nuevas sustancias conservantes que, además de ser naturales, es decir, no sintéticas, no comprometen en ningún caso la salud.

La calidad microbiológica de la leche tiene una importancia fundamental tanto en la calidad tecnológica y sensorial de los productos elaborados (principalmente cuando son elaborados con leche cruda) como en el riesgo que supone el consumo de leche contaminada con patógenos alterantes de la misma. Los psicotrofos más comunes en la leche fresca cruda son microorganismos Gram-negativos, perteneciendo el 50% al género *Pseudomonas*, predominando *P. fluorescens*. Entre los microorganismos que sobreviven a la pasteurización, debido a su habilidad para esporular, destacamos *Bacillus cereus*. Además, bacterias patógenas pueden estar presentes en la leche como consecuencia de una enfermedad mamaria (mastitis) producida entre otros por *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Sin embargo, existen otras bacterias, las ácido-lácticas (BAL), cuyas bacteriocinas son activas frente a patógenos de los alimentos como *Clostridium botulinum*, *S. aureus* y *Listeria monocytogenes* (Nettles y Barefoot, 1993) y por lo tanto pueden ser aplicadas para la

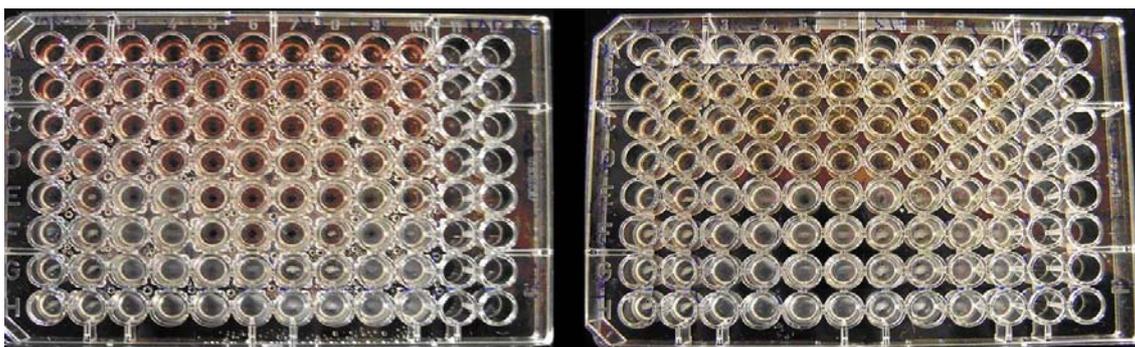
conservación del alimento gracias a sus ventajas microbiológicas, fisiológicas y tecnológicas (Nettles y Barefoot, 1993; Smith, 1993; de Vuyst y Vandamme, 1994; Cleveland et al., 2001).

Por todo lo expuesto nos pareció adecuado el estudio de distintos compuestos antimicrobianos en la inhibición del crecimiento de diversas especies bacterianas presentes en la leche y queso de oveja. De este modo, se seleccionaron 17 compuestos antimicrobianos, naturales y sintéticos, que pudiesen evitar el crecimiento de especies bacterianas patógenas tales como *S. aureus*, *B. cereus*, *P. fluorescens* y *E. coli*, permitiendo el crecimiento de otras necesarias como *E. faecalis* y *L. paracasei*. Los compuestos naturales utilizados en este estudio fueron timol, carvacrol, eugenol, hidroquinona, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido protocatéquico, ácido gálico, ácido ascórbico y un análogo de éste, el ácido D-eritroascorbato y su forma glucosilada, ambos purificados del hongo zygomyceto *Phycomyces blakesleeanus*. Los compuestos sintéticos estudiados fueron los siguientes: BHA, BHT, TBHQ, galato de propilo, galato de octilo, ácido propil-4-hidroxibenzoato y el ácido N-heptil-4-hidroxibenzoato. La actividad antimicrobiana se midió determinando la cantidad más pequeña que se necesita de un agente para inhibir el crecimiento de un organismo, valor llamado Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (Madigan et al., 2004). También se determinó la Concentración Mínima Bactericida (CMB), que se define como la concentración más pequeña del compuesto antimicrobiano que produce una reducción igual o superior al 99,9 % en el número de células viables en comparación con el que existía en el inóculo inicial, para alguno de los compuestos (carvacrol, hidroquinona, TBHQ y galato de propilo) en las cepas más sensibles y más resistentes, según los valores obtenidos de CMI, para cada especie microbiana.



**Figura 1:** Dos cepas, una de *Bacillus cereus* (izda) y otra de *Staphylococcus aureus* (dcha) empleadas en este estudio.

De todos los compuestos ensayados, resultaron más eficaces frente a las Gram positivas, dentro de los sintéticos el TBHQ, con valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de 3,125 µg/ml para *S. aureus* y CMI<sub>90</sub> de 800 µg/ml para *B. cereus*, obteniéndose para este microorganismo el menor CMI<sub>50</sub> con N-heptil-4-hidroxibenzoato, con un valor de 25 µg/ml. En el caso de las bacterias Gram negativas, el compuesto sintético más eficaz tanto para *P. fluorescens* como para *E. coli* fue el galato de octilo, con valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de 50 µg/ml para *P. fluorescens* y CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de 100 µg/ml para *E. coli*. En cuanto a los compuestos naturales, el carvacrol resultó ser el más eficaz frente a las dos especies Gram negativas utilizadas, con valores de CMI<sub>50</sub> de 400 µg/ml y CMI<sub>90</sub> de 600 µg/ml para *P. fluorescens* y CMI<sub>50</sub> de 150 µg/ml y CMI<sub>90</sub> de 300 µg/ml para *E. coli*, y para una de las especies Gram positiva, *B. cereus*, con valores de CMI<sub>50</sub> de 200 µg/ml y CMI<sub>90</sub> de 500 µg/ml. En cambio para *S. aureus* el compuesto natural más efectivo resultó ser la hidroquinona con valores de CMI<sub>50</sub> de 100 µg/ml y CMI<sub>90</sub> de 125 µg/ml.



**Figura 2:** Efecto antimicrobiano de hidroquinona (izda) y galato de octilo (dcha) sobre varias cepas de *S. aureus*. Los pocillos claros indican ausencia de crecimiento bacteriano.

En cuanto a los compuestos que han centrado nuestro estudio, el D-eritroascorbato (D-EAA) y su glucósido (D-EAAG), éstos tuvieron un comportamiento similar al del L-ascorbato, con un CMI<sub>50</sub> de 1600 µg/ml para *S. aureus* y 6400 µg/ml para *E. coli* en el caso del D-EAAG y con un CMI<sub>90</sub> de 6400 µg/ml tanto para *S. aureus* como para *E. coli* en el caso del D-EAA.

Observamos que en el caso de las bacterias Gram negativas es necesario una mayor cantidad de compuesto, tanto natural como sintético, para conseguir inhibición en el crecimiento. La menor susceptibilidad de los microorganismos Gram-negativos puede deberse a la membrana externa que rodea la pared celular (Ratledge y Wilkinson, 1988) la cual restringe la difusión de los compuestos hidrofóbicos a través de la cubierta polisacáridica (Vaara, 1992). Sin embargo, esta membrana no es completamente hidrofóbica y algunos



compuestos pueden pasar a través de ella por medio de las porinas (Nikaido, 1996).

Así, aunque los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> más bajos se han encontrado fundamentalmente en compuestos sintéticos, se ha observado que compuestos naturales, tal y como el carvacrol y la hidroquinona, son eficientes en la inhibición del crecimiento de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, pudiendo suponer una alternativa a la hora de la utilización de determinados compuestos que pueden llegar a tener efectos indeseables en la salud humana.

### **Bibliografía**

- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in food- a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. y Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 71: 1-20.
- de Vuyst, L. y Vandamme, E. J. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications. Blackie Academic and Professional, London.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. (2004). Brock. Biología de los microorganismos. Pearson Educación, S.A., Madrid.
- Nettles, C. G. y Barefoot, S. F. (1993). Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food- associated lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 56: 338-356.
- Nikaido, H. (1996). Outer membrane. En: *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*. Editado por F. C. Neidhardt, pp: 29-47. AMS Press, Washington, D.C. USA.
- Ratledge, C. y Wilkinson, S. G. (1988). An overview of microbial lipids. Academic Press, London, UK.
- Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews* 56: 395-411.

### Dirigida por:

**Dra. M<sup>a</sup> Dolores de Arriaga Giner y Dra. M<sup>a</sup> Pilar del Valle Fernández** (Área de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de León).

**Otros miembros del equipo de investigación:**

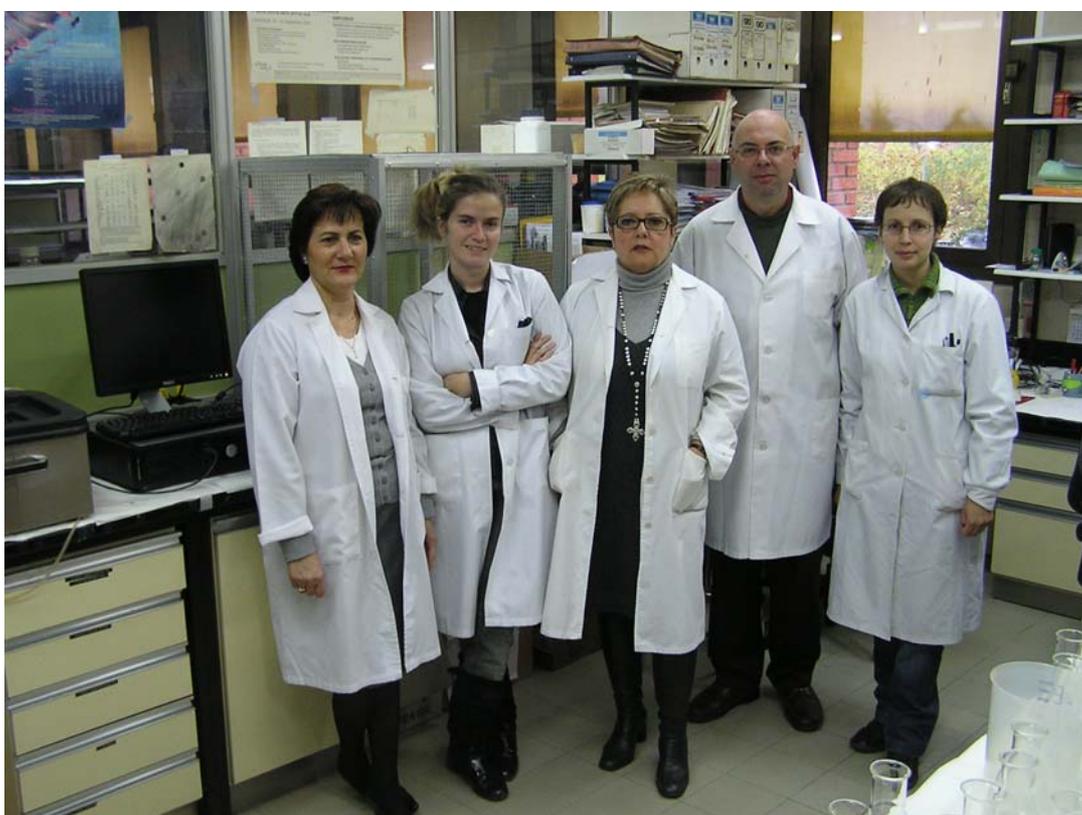
Dr. Félix Busto Ortiz (Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de León).

Dra. M<sup>a</sup> Rosario García Armesto (Área de Nutrición y Bromatología, Universidad de León).

Dr. Francisco Javier Rúa Aller (Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de León).

Dña. Cristina de Castro Cristiano (Área de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de León).

**Galería de fotos**



Grupo de investigación al que pertenece la autora de la tesis doctoral. De izquierda a derecha: Dra. Pilar del Valle; Marta Gutiérrez; Dra. Dolores de Arriaga; Dr. Javier Rúa y Cristina de Castro.