

# EFFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE UNA PELÍCULA DE GLUTEN ACTIVADA CON BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR *L. CURVATUS* CRL705

1 Blanco Massani Mariana, 1 Molina Vanesa, 2 Sanchez Mariana, 2 Renaud Viviana, 1 Eisenberg Patricia y 3 Vignolo Graciela.

1 INTI-Plásticos, 2 INTI-Carnes, 3 CERELA-CONICET. e-mail: [blanco@inti.gov.ar](mailto:blanco@inti.gov.ar)

## OBJETIVO

Estudiar la efectividad antimicrobiana de una película de gluten activada con las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus curvatus* CRL705 en función del envejecimiento de la película.

Este trabajo se refiere a un material activo antimicrobiano desarrollado en el marco del trabajo de tesis doctoral de la Dra. Mariana Blanco Massani (Universidad Nacional de Tucumán), cuyos resultados fueron publicados en 2014, para mayores detalles referirse a las publicaciones [1-2].

## DESCRIPCIÓN

**Microorganismos y condiciones de cultivo.** *Lactobacillus curvatus* CRL705, productor de lactocina 705 y lactocina AL705 fue aislado y caracterizado en CERELA-CONICET [3]; *Lactobacillus plantarum* CRL691 (indicador de lactocina 705), y *Listeria innocua* 7 (indicador de la actividad de lactocina AL705), fueron provistos por CERELA-CONICET.

**Preparación y cuantificación de la solución activa.** Lactocina 705 y AL705 se obtuvieron por precipitación con sulfato de amonio (44% (m/v), de un sobrenadante *overnight* de *L. curvatus* CRL705. La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas en solución se expresó como Unidades arbitrarias por ml (UA/ml) [1].

**Preparación de la película activa y determinación de la actividad antimicrobiana.** Se obtuvo una película de gluten de trigo por el método de *casting*. Se agregó la solución activa (1% (m/v)) en la formulación. La suspensión obtenida se secó a 50 °C. Como control negativo de bacteriocinas se reemplazó la solución activa por agua destilada estéril en la formulación de la película de gluten.

La actividad antimicrobiana de las películas se determinó por el método de difusión en agar frente a los microorganismos indicadores [1].

**Propiedades de la película en función del tiempo.** Se estudiaron la tensión y deformación, la permeabilidad al vapor de agua, las propiedades antimicrobianas y la liberación de las bacteriocinas en simulante acuoso (agua destilada estéril) y graso (aceite de girasol) en función del tiempo (50 días a 23°C) [1].

**Preparación de los envases activos e inoculación de salchichas.** Se colocó una

almohadilla (48 cm<sup>2</sup>) de gluten activa en envases formados por películas multicapa para salchichas (Cryovac- Sealed Air, Argentina). Se incluyeron almohadillas sin bacteriocinas (control) en otros envases. Todos los envases se almacenaron asépticamente a 5° C hasta su uso.

Las salchichas (obtenidas en la planta piloto de INTI-Carnes) se inocularon en condiciones de esterilidad sumergiéndolas por separado en soluciones con *L. innocua* 7 y *L. plantarum* CRL691 (10<sup>4</sup> unidades formadoras de colonias/g (UFC/g)).

Se colocaron tres salchichas (42 g) por envase activo y control. Se incluyeron controles sin bacteriocinas. Todos los envases se termosellaron al vacío (Erich Vacuum) y se almacenaron a 5°C por 45 días.

**Análisis microbiológico.** Periódicamente se realizaron recuentos *L. innocua* 7 y *L. plantarum* CRL691 en un homogenato de las salchichas, utilizando medios de crecimiento selectivos (medio Oxford modificado (MOX), Britania) adicionado con moxalactama de sodio, y Man, Rogosa y Sharpe (MRS, Britania) en condiciones anaeróbicas, respectivamente). Todos los medios se incubaron 48 h a 35°C. ,

## RESULTADOS

### Propiedades de la película en función del tiempo

Las propiedades mecánicas de la película de gluten (activa y control) en función del tiempo se muestran en la Figura 1. La película mostró variaciones graduales en las propiedades mecánicas reflejando el envejecimiento de la misma, con una disminución en la elongación y un aumento en la tensión a la rotura al final del experimento respecto del control (Fig.1).

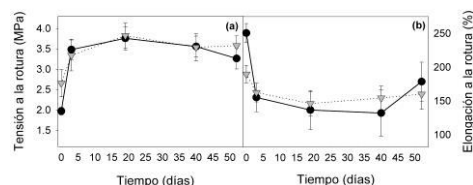
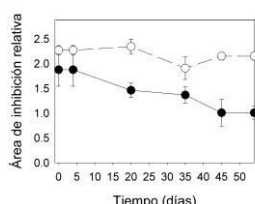


Figura 1. Propiedades mecánicas en función del tiempo para la película control (●) y activa (▼)

La permeabilidad al vapor de agua de las películas activa y control se mantuvo en el mismo orden de magnitud hasta los 50 días de almacenamiento ( $8 \cdot 10^{-12} \pm 8 \cdot 10^{-13}$ ,  $8 \cdot 10^{-12} \pm 6 \cdot 10^{-13}$

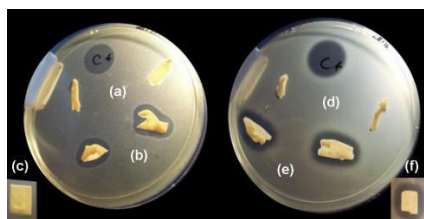
<sup>13</sup> mol/m.s.Pa, respectivamente, para el activo y control).

Cuando se estudió la influencia del tiempo de almacenamiento (50 días a 23°C) de la película en sus propiedades antimicrobianas se observó una leve disminución en la actividad anti-*Listeria* (lactocina AL705) al final de período de almacenamiento, mientras que la disminución de la actividad de lactocina 705 en la película fue más pronunciada (Fig.2).



**Figura 2.** Actividad antimicrobiana de lactocina 705 (●) y AL705 (○) en función del tiempo.

Cuando se estudió la liberación de bacteriocinas desde la película hacia simulante de alimento graso y acuoso, así como su actividad antimicrobiana residual luego del contacto con los simulantes (Fig. 3, Tabla 1), se observó actividad antimicrobiana residual de ambas bacteriocinas en la película de gluten aún después del contacto con agua (Fig. 3: b y e). Sin embargo, luego del contacto con simulante graso sólo se obtuvo actividad antimicrobiana residual de lactocina AL705 (Fig. 3: c y f). Estos resultados se obtuvieron durante todo el período de almacenamiento de la película a 23°C. Asimismo, ambas bacteriocinas se detectaron en el agua que estuvo en contacto con la película al inicio del experimento, mientras que solo lactocina AL705 estuvo presente en el agua en contacto con la película envejecida durante 15 días (Tabla 1).



**Figura 3.** Lactocina 705 y AL705 en la película activa luego del contacto con agua (b) y (e), y aceite de girasol (c) y (f), respectivamente. (a) y (d) son controles sin bacteriocinas.

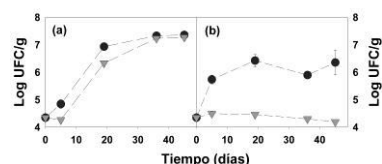
No se detectó actividad antimicrobiana en agua luego del contacto con una película envejecida durante 30 a 50 días. Para todos los tiempos evaluados, la actividad antimicrobiana en el aceite de girasol que estuvo en contacto con las películas estuvo por debajo de los límites de detección (Tabla 1).

**Tabla 1.** Actividad antimicrobiana residual en el agua y aceite que estuvieron en contacto con la película activa con diferentes días de envejecimiento.

Tiempo (días)	Actividad en el medio (UA/ml) luego del contacto con la película			
	Agua		Aceite de girasol	
	705	AL705	705	AL705
0,04	19	122	-	-
15	-	32	-	-
30	-	-	-	-
44	-	-	-	-
50	-	-	-	-

### Efectividad antimicrobiana en salchichas.

Las salchichas envasadas sin almohadillas con bacteriocinas mostraron el crecimiento típico de los organismos inoculados, mientras que la presencia de lactocina 705 en la película de gluten provocó una ligera reducción (0.5 unidades Log, día 19) en el crecimiento de *L. plantarum* CRL 691, respecto al del control, produciéndose luego en las salchichas en ambos tipos de envases paquetes (activos y control) el mismo crecimiento a los 35 días de almacenamiento a 5 °C (Fig. 4a). En envases activos inoculados con *L. innocua* 7 se observó un efecto bacteriostático durante el almacenamiento a 5°C, manteniéndose 2.5 unidades logarítmicas por debajo de los respectivos controles sin bacteriocinas (Fig. 4b).



**Figura 4.** Crecimiento de *L. plantarum* CRL691 (a) y *L. innocua* 7 (b) en función del tiempo (45 días a 5°C) en envases activos (▼) y controles (●).

### CONCLUSIONES

El desarrollo de este trabajo permitió obtener una película de gluten activada con lactocina 705 y AL705. Los cambios en las propiedades de la matriz polimérica de gluten producidos por el envejecimiento favorecieron la retención de las bacteriocinas en la película sin perder la actividad antimicrobiana. La película obtenida en este trabajo mostró elevada eficiencia anti-*Listeria* en el modelo alimentario ensayado (salchichas tipo Viena). La inhibición de *L. plantarum* CRL691 (usado como contaminante de deterioro) se vio dificultada por la inactivación de lactocina 705 en presencia del alto porcentaje de grasa en la composición del alimento. Estos resultados demuestran la importancia del diseño del envase activo para cada alimento en particular.

### REFERENCIAS

1. Blanco M y col (2014) *Food Addit Contam*, **31**, 164 - 171.
2. Blanco M y col (2014) *Int J Food Microbiol*, **178**, 7-12.
3. Vignolo y col. (1993). *J Appl Bacteriol*, **75**, 344-349.