

Efectividad de la bacteriocina sakacina Q aplicada mediante inmersión sobre salchichas tipo Viena

Rivas Franco^{a,c}, Castro Marcela^{a,c}, Campos Carmen^{b,c}

^(a)Universidad Nacional del Chaco Austral.

Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco, Argentina.

^(b)Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, CABA, Argentina.

^(c)CONICET.

mcastro@uncaus.edu.ar

Este trabajo fue presentado en modalidad de trabajo completo en el V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 17-18 de noviembre de 2014. Córdoba, Argentina



Resumen

El objetivo del ensayo fue determinar la efectividad de la bacteriocina sakacina Q aplicada a salchichas mediante inmersión en suspensiones con distinta concentración de bacteriocina y forma de incorporación. Los sistemas de inmersión fueron: a) suspensión de *L. curvatus* ACU-1 (cepa productora de bacteriocina); b) Sobrenadante Libre de Células (SLC) de ACU-1 conteniendo la bacteriocina; c) SLC ACU-1 más suspensión ACU-1; d) control (caldo MRS). La mitad de cada lote de salchichas se sumergió en una suspensión de *Listeria innocua*. Las salchichas se envasaron al vacío y se almacenaron a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 29 días. Se realizaron recuentos periódicos de: bacterias lácticas (BL); aeróbicos totales; enterobacterias; *Brochothrix* spp. y *Listeria*. Los distintos tratamientos fueron efectivos frente a BL, mesófilos totales, *Brochothrix* spp. y *Listeria*. El número de enterobacterias estuvo por debajo del límite de detección. Los sistemas con el SLC tuvieron el mayor efecto inhibitorio. Se infiere entonces que la sakacina Q aplicada de esta forma resultaría promisorio para la biopreservación de estos productos.

Palabras clave: sakacina Q, salchichas tipo Viena, funcionalidad de bacteriocina.

Introducción

En la industria de alimentos existe una tendencia creciente en cuanto al empleo de antimicrobianos de origen natural a fin de lograr el reemplazo total o parcial de los antimicrobianos sintéticos. Las industrias procesadoras de alimentos de la provincia del Chaco, si bien no desconocen esta tendencia, continúan produciendo alimentos aplicando tecnologías de preservación tradicionales y, por ende, necesitarían adecuarse a las exigencias del mercado. La creciente utilización de bacterias y/o de sus sustancias antagónicas producidas, entre ellas bacteriocinas, como parte de un sistema de barreras múltiples para la biopreservación de alimentos constituye una alternativa viable en el marco de la producción local de productos cárnicos. Consecuentemente, el empleo de estas sustancias naturales podría contribuir a mejorar la calidad y seguridad de los mismos. En el caso de las industrias elaboradoras de productos cárnicos, sería de gran provecho el uso de técnicas de biopreservación a fin de poder ofrecer productos con características sensoriales típicas y de buena calidad.

Al evaluar un cultivo bacteriocinogénico para la fermentación y/o la biopreservación de la carne y sus productos, la naturaleza compleja de los mismos es un factor clave a tenerse en cuenta. Se debe considerar si la producción de bacteriocina es in situ o ex situ, ya que muchos parámetros ambientales influyen en el crecimiento y la producción metabólica. Por lo tanto, para la selección de una cepa bacteriocinogénica se deben tener en cuenta su capacidad para crecer y producir la bacteriocina in situ; la difusión de la bacteriocina través de la carne (Dicks y col., 2004); su adsorción a componentes de los alimentos, tales como proteínas y grasas (Aasen y col., 2003); la influencia de los ingredientes específicos, a saber cloruro de sodio y nitrito (Verluyten y col., 2003); y también las condiciones que podrían desestabilizar la actividad biológica de la bacteriocina (Sarantinopoulos y col., 2002).

En los productos cárnicos cocidos, los cultivos protectores han sido evaluados principalmente por su potencial para inhibir los patógenos alimentarios tales como *Listeria monocytogenes* (Amezquita y Brashears, 2002; Budde y col., 2003; Mataragas y col., 2003). Sin embargo, se sabe menos sobre la posibilidad de utilizar cultivos protectores para prolongar la vida útil de estos productos (Vermeiren y col., 2006).

Como el desarrollo de la población microbiana responsable del deterioro de las carnes curadas envasadas al vacío se produce esencialmente en la superficie de los productos, la eficacia de un tratamiento antimicrobiano puede ser mejorada mediante la aplicación del compuesto antimicrobiano en la superficie de las carnes cocidas. En los productos cárnicos mínimamente tratados con calor, curados, envasados al vacío y refrigerados, tales como las salchichas de Viena, las bacteriocinas se pueden aplicar para inhibir el deterioro por BL seleccionadas por la baja temperatura de almacenamiento, la presencia de nitrito y sales de curado, y condiciones de microaerofilia (Barros y col., 2010).

La salchicha es el producto más antiguo y de mayor arraigo de la carne procesada; para su elaboración se han utilizado durante miles de años como cubierta protectora los intestinos de ovejas, de cerdos y de terneras (Wijnker y col., 2006). Estas carcasas naturales están con-

taminadas con bacterias de importancia para la salud pública, tales como estreptococos fecales, enterobacterias y coliformes (Byun y col., 2001). Estos microorganismos podrían representar un riesgo para la salud del consumidor. Estas cubiertas normalmente se conservan mediante salazón, curado, secado y/o congelado (Houben y col 2005). La congelación y la salazón, al ser procedimientos bacteriostáticos, no son eficaces en la eliminación de contaminantes y microorganismos patógenos. En función de lo expuesto, el empleo de tripa ovina natural como soporte para la aplicación de bacteriocinas en la bioconservación de salchichas tipo Viena resulta prometedor.

En trabajos previos, se verificó que el empleo de la cepa bacteriocinogénica *Lactobacillus curvatus* ACU-1 sobre la superficie de carne de cerdo cocida inhibe el crecimiento de *Listeria innocua* sin perder efectividad por adsorción a los tejidos grasos o cárnicos (Rivas y col., 2014). En consecuencia, su aplicación en productos cárnicos como cultivo protector o como parte de un cultivo iniciador resulta prometedora. Es por esto que el objetivo de este ensayo fue determinar la efectividad de la bacteriocina sakacina Q aplicada superficialmente en salchichas, mediante inmersión de las mismas en suspensiones con distintas concentraciones de bacteriocina y forma de incorporación.

Seguridad en el envasado de alimentos



R 5 - bomba de vacío líder en la industria

Disponga de la mejor tecnología de vacío para los procesos de fabricación y envasado

Somos los líderes en la industria de la alimentación!

Optimice con Busch Argentina sus procesos de vacío.



Santo Domingo 3076 | Ciudad de Buenos Aires
Tel. | 4302 8183 | Fax | 4301 0896 | info@busch.com.ar | www.busch.com.ar



Materiales y métodos

Efectividad de la bacteriocina aplicada sobre salchichas por inmersión

Las salchichas tipo Viena utilizadas en este estudio fueron elaboradas en una planta industrial local (Cooperativa "La Unión" Ltda., Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco), bajo las condiciones operativas normales. Las mismas fueron transportadas al laboratorio en forma aséptica e inmediatamente después se sometieron a ocho tratamientos diferentes, sumergiéndolas en 500 ml de los siguientes sistemas: a) Suspensión de *L. curvatus* ACU-1 (10^6 UFC/ml); b) Suspensión de *L. curvatus* ACU-1 (10^6 UFC/ml), luego en suspensión de *Listeria innocua* (10^6 UFC.ml⁻¹); c) Sobrenadante Libre de Células (SLC) de ACU-1 (800 unidades arbitrarias/ml (UA/ml) de bacteriocina) obtenido mediante centrifugación (4000 rpm, 10 minutos) y posterior filtrado (0,22 micrones de tamaño de poro); d) SLC ACU-1 (800 UA/ml de bacteriocina), luego en suspensión de *Listeria* (10^6 UFC/ml); e) SLC ACU-1 (800 UA/ml de bacteriocina) + suspensión ACU-1 (10^6 UFC/ml); f) SLC ACU-1 (800 UA/ml de bacteriocina) + suspensión ACU-1, luego en suspensión de *Listeria* (10^6 UFC/ml); g) Control (caldo MRS); h) Suspensión de *Listeria* (10^6 UFC/ml). Las salchichas fueron envasadas al vacío en bolsas de polietileno (permeabilidad al oxígeno: $70 \text{ [cm}^3/\text{m}^2\text{24h}^1\text{atm}^1]$ a 25°C y 75% HR) y almacenadas a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 29 días. Se tomaron muestras después de 0, 2, 4, 6, 8, 13, 16, 23 y 29 días de almacenamiento. Los ensayos se realizaron por duplicado. Para realizar los recuentos se tomó un gramo de muestra, se colocó en bolsas de stomacher y se agregaron 9 ml de agua de peptona estéril, luego se procedió a homogeneizar. A partir de este homogenato se realizaron las diluciones correspondientes para el recuento microbiano, en los siguientes medios: MRS (de Man, Rogosa & Sharpe; Biokar Diagnostics, Francia) para recuento bacterias lácticas; PCA (Plate Count Agar, Agar para Recuento en Placa, Oxoid, Reino Unido) para aeróbicos totales; VRBg (Violeta Rojo Bilis glucosa Agar, Britania, Argentina) para enterobacterias; STAA (Estreptomycin Talio Acetato Actidiona agar, Britania, Argentina) para *Brochothrix* spp, y Palcam agar (Biokar Diagnostics, Francia) para *L. innocua*. Los resultados obtenidos se expresaron como Log UFC/g.

Análisis estadísticos

El ensayo se repitió dos veces y cada determinación se realizó por triplicado. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un análisis de varianza ($p < 0,05$) y se aplicó el test de Tukey para establecer la existencia de diferencias significativas. Todos los análisis se realizaron con el software Statgraphics Plus versión 5.0 (Manugistics Inc., EE.UU.).

Resultados y discusión

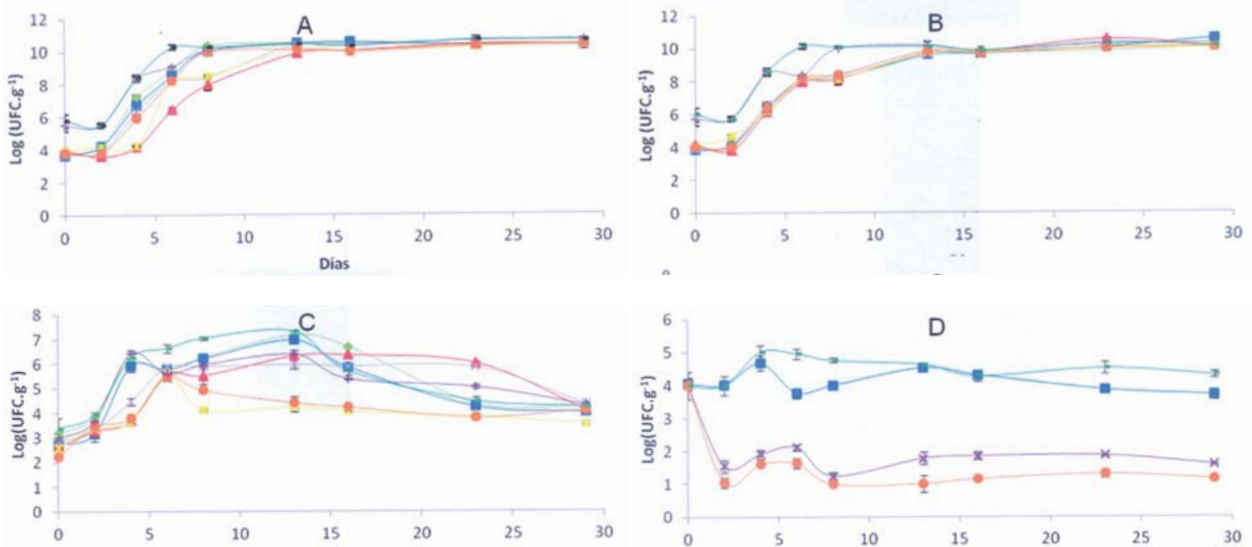
Funcionalidad de la bacteriocina aplicada sobre salchichas por inmersión

El objetivo de este estudio fue determinar la efectividad de la bacteriocina adsorbida sobre la tripa ovina luego de ser embutida, bajo las condiciones normales de manufactura de las salchichas a escala industrial, es decir, aplicar la bacteriocina o la cepa productora para generar la producción de la misma sobre el producto terminado. Los resultados se muestran en la figura 1. La microbiota deteriorante asociada a estos productos cárnicos cocidos está representada principalmente por BL, que colonizan la superficie cárnica una vez que el producto está listo para consumo. Su proliferación a lo largo del almacenamiento trae aparejado la formación de exudados lechosos, hinchamiento de los envases, envejecimiento, mal olor y flavor desagradable. El predominio de las BL continúa a lo largo del almacenamiento refrigerado y el control de los procesos de alteración en carnes procesadas se hace difícil por la naturaleza psicrotrofica, microaerofílica, resistencia a nitritos, sales y ahumado de estas bacterias (Cayré y col., 2003).

En base a las características mencionadas, cabe enfatizar que en este estudio se observó que la aplicación de bacteriocinas por inmersión produjo una reducción en los recuentos de BL. La efectividad de los distintos tratamientos con el biopreservador frente a las BL se comprobó desde el inicio hasta los ocho días de ensayo, mostrando diferencias significativas respecto al control sin inocular y al control con *Listeria* (Figura 1, panel A). El sistema con el SLC fue el más efectivo. A partir de los 16 días, se presentó una inhibición significativa de las BL en el sistema que contenía el SLC (con y sin la suspensión bacteriana de ACU-1). Cabe resaltar estos resultados en comparación con otros estudios, donde Barros y col. (2010) no reportan una inhibición de BL al tratar las salchichas con nisina en medio ácido, condición que facilitaría su actividad.

En lo que respecta al recuento total de microorganismos (Figura 1, panel B), desde el tiempo inicial se observaron diferencias significativas entre los sistemas tratados y el control. Los tratamientos más efectivos resultaron los realizados con el SLC (ya sea con el agregado de la suspensión de ACU-1 como sin la misma). La suspensión de ACU-1 (sistema a) mostró menor efectividad, pero significativa en la reducción del recuento total a partir de los dos días hasta los 13 días de almacenamiento. Resultados similares fueron reportados por otros autores (Martinez y col., 2002; Geonaras y col., 2006), sin embargo, éstos atribuyen dicha actividad inhibitoria a los bajos valores de pH de las soluciones de las bacteriocinas. En nuestro estudio, es de resaltar que los SLC usados fueron neutralizados antes de los ensayos pertinentes, por ende las actividades antimicrobianas observadas son atribuibles a la acción específica de

Figura 1 - Evolución de los recuentos microbianos realizados sobre salchichas tipo Viena, expresados como Log (UFC/g). Panel A: Bacterias Lácticas; Panel B: Mesófilos Totales; Panel C: *Brochothrix* spp.; Panel D: *Listeria innocua*



(●) suspensión de *Lb. curvatus* ACU-1; (●) suspensión de *Lb. curvatus* ACU-1, luego en suspensión de *L. innocua*; (●) SLC de ACU-1; (●) SLC ACU-1, luego en suspensión de *Listeria*; (●) SLC ACU-1 + suspensión ACU-1; (●) SLC ACU-1 + suspensión ACU-1, luego en suspensión de *Listeria*; (+) control; (-) suspensión de *Listeria*.

la bacteriocina. Cayré (2006) al analizar salchichas tipo Viena envasadas en bolsas de polietileno cuya permeabilidad concuerda con las utilizadas en nuestro estudio, reportó recuentos de mesófilos totales y BL que se incrementaron en una semana hasta 7,5-8,2 (Log UFC.g⁻¹), recuentos similares fueron presentados por nuestro sistema control, considerando el mismo período de tiempo. Mientras que los sistemas que fueron tratados con el antimicrobiano disminuyeron y retrasaron estos recuentos 2 ciclos Log hasta los 14 días de almacenamiento. En todos los casos, el número de enterobacterias estuvo por debajo del límite de detección, característica deseada ya que la presencia de este género bacteriano es indicio de contaminación.

Además de las BL, *Brochothrix thermosphacta* también se encuentra como un componente numéricamente significativo en la microbiota de los productos cárnicos almacenados al vacío y refrigerados (Samelis y col., 2000). El crecimiento y el metabolismo de *B. thermosphacta* en productos cárnicos dependen de factores tales como pH, temperatura, ambiente gaseoso y disponibilidad de nutrientes (Cayré y col., 2005). En este estudio, el recuento de *Brochothrix* spp. a partir de los cuatro días de almacenamiento mostró diferencias significativas entre el sistema control y los distintos sistemas tratados con la bacteriocina, siendo los más efectivos los sistemas tratados con SLC, con y sin la suspensión celular de ACU-1 (Figura 1, panel C). Al cabo de 13 días de almacenamiento, se presentó una reducción significativa del microorganismo indicador en cuestión por parte del sistema constituido por el SLC más la suspensión microbiana de la bacteria láctica, pero en ninguno

de los sistemas se logró una inhibición tan marcada como en el ensayo de adsorción de la bacteriocina a la tripa ovina tratada con el SLC concentrado, donde se registró una reducción de 4 ciclos log en el recuento de *Brochothrix* spp. (Rivas, 2014). Al estudiar salchichas tipo Viena en iguales condiciones a las utilizadas en nuestro sistema control, Cayré (2006) registró recuentos de *Brochothrix* spp. de 7,07 (LogUFC/g) a los 15 días de almacenamiento, seguido por una reducción del recuento; el mismo comportamiento fue presentado por el sistema control en nuestro estudio, mientras que los sistemas tratados reportaron las reducciones citadas.

En relación a los recuentos de *Listeria* (Figura 1, panel D), se observó una reducción significativa en los sistemas con SLC (con y sin suspensión de ACU-1) respecto al sistema no inoculado (sistema control) a partir de los dos días de almacenamiento. Cabe resaltar estos resultados con respecto a los presentados por Ben Hammou y colaboradores (2010), quienes reportan que cuando se aplicó nisina sin ningún coadyuvante, ésta no presentó ningún efecto antilisterial antes de los 20 días en salchichas elaboradas con tripa ovina tratada. En trabajos previos de aplicación de sakacina Q sobre tripa ovina antes de la fabricación de las salchichas (Rivas, 2014), recién a los 16 días de almacenamiento se registró una reducción significativa de *Listeria*. En el presente estudio se observó que, en los recuentos correspondientes a los 6, 8, 13 y a partir de los 23 días, se presenta un efecto listericida también en el sistema constituido por la suspensión de la cepa bacteriocinogénica. Se comprueba de esta forma la efectividad de los tres sistemas que contienen la bacteriocina, siendo el más efi-

ciente el sistema del SLC más la suspensión, seguido por el que sólo contenía el SLC y por último el sistema constituido por la suspensión de la cepa bacteriocinogénica. Resultados similares fueron reportados por Geonaras y col. (2004), quienes realizaron un estudio sobre salchichas tipo Frankfurt inoculadas con *Listeria monocytogenes* sumergidas en solución de nisina, encontrando que esta bacteriocina redujo significativamente el recuento de *Listeria*.

Conclusiones

La bacteriocina en estudio, sakacina Q, es efectiva para el control de *Listeria*. El tratamiento más eficiente contra esta microbiota patógena lo constituyó la aplicación del sistema conteniendo el SLC junto con la suspensión de la cepa productora de bacteriocina. Además, cabe destacar que la aplicación por inmersión de las salchichas en los distintos sistemas que contenían la bacteriocina mostró inhibir tanto las bacterias lácticas alterantes como los microorganismos mesófilos. Respecto al recuento total de microorganismos, los tratamientos más efectivos resultaron los realizados con el SLC (ya sea con el agregado de la suspensión de ACU-1 como en ausencia de la misma). Los SLC usados fueron neutralizados antes de los ensayos pertinentes, por ende las actividades antimicrobianas observadas son atribuibles a la acción específica de la bacteriocina estudiada.

En base a los resultados obtenidos en este estudio, se infiere que la bacteriocina sakacina Q, producida por *Lactobacillus curvatus* ACU-1, resulta altamente efectiva para la biopreservación de salchichas tipo Viena envasadas al vacío y almacenadas bajo refrigeración. Esta bacteriocina inhibe microorganismos deteriorantes característicos de estos productos, tales como *Brochothrix* spp. y Bacterias Lácticas, como así también a *Listeria monocytogenes*, bacteria patógena ubicua con una elevada prevalencia en muchos alimentos. De este modo, este trabajo sienta las bases para introducir innovaciones tecnológicas en las operaciones industriales, favoreciendo la inserción de los productos cárnicos provinciales en nuevos mercados. La aplicación de ésta técnica de bioconservación en las salchichas permitiría a las industrias provinciales adecuarse a las exigencias de los consumidores actuales de productos "más naturales" o con menor cantidad de aditivos químicos.

Bibliografía

Aasen IM, Markussen S, Møretrø T, Katla T, Axelsson L, Naterstad K. 2003. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, 87: 35–43.

Amezquita A, Brashears MM. 2002. Competitive inhibition of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat products by lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 65: 316–325.

Barros JR, Kunigk L, Jurkiewicz CH. 2010. Incorporation of Nisin in natural casing for the control of spoilage microorganisms in vacuum packaged sausage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 1001–1008.

Ben Hammou F, Skali SN, Idaomar M, Abrini J. 2010. Combinations of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage casings stored at 6°C. *African Journal of Biotechnology*, 9: 1190–1195.

Budde BB, Hornbaek T, Jacobsen T, Barkholt V, Koch AG. 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification and meat application experiments. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 171–184.

Byun MW, Lee JW, Jo C, Yook HS. 2001. Quality properties of sausage made with gamma irradiated natural pork and lamb casing. *Meat Science*, 59: 223–228.

Cayré ME, Vignolo G, Garro O. 2003. Modeling lactic acid bacteria growth in vacuum-packaged cooked meat emulsions stored at three temperatures. *Food Microbiology*, 20: 561–566.

Cayré ME, Garro O, Vignolo G. 2005. Effect of storage temperature and gas permeability of packaging film on the growth of lactic acid bacteria and *Brochothrix thermosphacta* in cooked meat emulsions. *Food Microbiology*, 22: 505–512.

Cayré ME. 2006. Tesis Doctoral. Efecto de la temperatura y la permeabilidad al oxígeno del envase sobre el crecimiento de alterantes de emulsiones cárnicas-modelos predictivos. Chaco, Argentina: Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Agroindustrias.

Cleveland J, Monteville TJ, Nes IF, Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1–20.

Dicks LMT, Mellett FD, Hoffman LC. 2004. Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Science*, 66: 703–708.

Geonaras I, Skandamis PN, Belk KE, Scanga JA, Kendall PA, Smith GC, Sofos J. 2006. Postprocess control of *Listeria monocytogenes* on commercial frankfurters formulated with and without antimicrobials and stored at 10°C. *Journal of Food Protection*, 69: 53–61.

Geonaras I, Belk KE, Scanga JA, Kendall PA, Smith GC, Sofos JN. 2004. Antimicrobial dipping treatments to control *L. monocytogenes* in commercial frankfurters and smoked sausages. Departmental Research Reports, Department of Food Science and Human Nutrition, Colorado State University, ABD. 255–257.

Houben JH, Bakker WAM, Keizer G. 2005. Effect of trisodium phosphate on slip and textural properties of hog and sheep natural casings. *Meat Science*, 69: 209–214.

Martínez YB, Ferrer K, Salas EM. 2002. Combined effects of lactic acid and nisin solution in reducing levels of microbiological contamination in red meat carcasses. *Journal of Food Protection*, 65: 1780–1783.

Mataragas M, Drosinos EH, Metaxopoulos J. 2003. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced, cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4°C. *Food Microbiology*, 20: 259–265.

Rivas F, Castro M, Campos C. 2014. Adsorción y funcionalidad de la bacteriocina sakacina Q sobre tripa ovina. III Jornadas de Investigación en Ingeniería del NEA y Países Limitrofes, Universidad Tecnológica Nacional, Resistencia, Chaco, Argentina.

Samelis J, Kakouri A, Rementzis J. 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. *Food Microbiology*, 17: 329–340.

Sarantinopoulos P, Leroy F, Leontopoulou E, Georgalaki MD, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E, De Vuyst L. 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. *International Journal of Food Microbiology*, 72: 125–136.

Verluyten J, Messens W, De Vuyst L. 2003. The curing agent sodium nitrite used in the production of fermented sausages, is less inhibiting to the bacteriocin-producing meat starter culture *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3833–3839.

Vermeiren L, Devlieghere F, Debevere J. 2006. Co-culture experiments demonstrate the usefulness of *Lactobacillus sakei* 10A to prolong the shelf-life of a model cooked ham. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 68–77.

Wijnker JJ, Koop G, Lipman LJA. 2006. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. *Food Microbiology*, 23: 657–662.