

## **Estabilidad térmica de las bacterias ácido-lácticas bajo la influencia de un emulsificante a base de monoacilglicerol.**

L. Huerta-González\*<sup>1</sup>, F. López-Valdez<sup>1</sup> y S. Luna-Suárez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorios de Biotecnología Alimentaria y de Biotecnología Agrícola. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional (CIBA-IPN). Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala. 90700, México. \*[luertaglez@gmail.com](mailto:luertaglez@gmail.com) o [luertag@ipn.mx](mailto:luertag@ipn.mx)

### **RESUMEN**

El efecto de los lípidos sobre la inactivación térmica de las células bacterianas y de las esporas se ha reportado en medios de calentamiento no acuosos. En estas condiciones, los lípidos aumentan la resistencia al calor de las bacterias, lo que ha llevado a la conclusión de que los lípidos pueden proteger a las células bacterianas y a las esporas del posible daño provocado por el tratamiento térmico. Sin embargo, no todos los lípidos parecen tener el mismo efecto protector sobre la resistencia al calor de las bacterias. Tal es el caso de los monoacilglicerol, de los cuales se ha reportado actividad bactericida principalmente sobre organismos Gram-positivos. Sin embargo, se han realizado muy pocos estudios para determinar su influencia y aplicaciones junto con un posible tratamiento térmico. En la presente investigación se estudió la inactivación de bacterias ácido-lácticas al someterlas a un tratamiento térmico en presencia de un emulsionante a base de monoacilglicerol. El objetivo fue identificar su efecto sobre cuatro cultivos iniciadores ampliamente utilizados, y cómo esta combinación de factores permitiría la aplicación de un tratamiento térmico, asegurando la conservación de nutrientes cuya presencia en los productos lácteos fermentados es altamente deseable.

**Palabras clave:** Tasa de muerte térmica, bacterias ácido-lácticas, monoacilglicerol, productos fermentados.

### **ABSTRACT**

The effect of lipids on thermal inactivation of bacterial cells and spores has been reported in non-aqueous heating media. Under these conditions, lipids have been reported to increase the heat resistance of bacteria, which has led to the generally accepted belief that lipids can protect bacterial cells and spores from possible damage caused by heat treatment. However, not all lipids seem to have the same protective effect on the heat resistance of bacteria. Such is the case of monoacylglycerols, of which bactericidal activity has been reported mainly on Gram-positive organisms. However, very few studies have been conducted to determine its influence and applications in conjunction with possible heat treatment. In the present research, the inactivation of lactic acid bacteria was studied by subjecting them to a thermal treatment in the presence of an emulsifier based on monoacylglycerols. The objective was to identify its effect on four widely used starter cultures, and how this combination of factors would allow the application of a heat treatment, ensuring the conservation of nutrients whose presence in fermented dairy products is highly desirable.

**Keywords:** Thermal death rate, lactic acid bacteria, monoacylglycerols, fermented products.

## INTRODUCCIÓN

El efecto de los lípidos en la inactivación térmica de bacterias y de esporas ha sido ampliamente reportado en medios no acuosos (Yang *et al.*, 2020; Aldrete-Tapia & Torres, 2020). En estas condiciones, se ha observado que los lípidos aumentan la resistencia de las bacterias al calor, lo que ha llevado a la creencia generalmente aceptada de que los lípidos pueden proteger a las células y esporas bacterianas de posibles daños provocados por el tratamiento térmico. Sin embargo, no todos los lípidos parecen tener el mismo efecto protector. Tal es el caso de los monoacilglicérols, los cuales muestran actividad bactericida, por lo que se han estudiado para la inactivación de organismos patógenos, ya sea Gram-positivos como *S. aureus* y *L. monocytogenes*, o bien Gram-negativos como *S. typhimurium* (García *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2018; Kozak *et al.*, 2018; Yosief *et al.*, 2020).

Sin embargo, se han realizado muy pocos estudios para determinar el uso de los monoacilglicérols en conjunto con un posible tratamiento térmico. Esta combinación podría tener ciertas ventajas, por ejemplo, en la fabricación de productos fermentados de larga duración. En estos productos, se utiliza un tratamiento térmico posterior a la fermentación, para prolongar la vida de anaquel del producto mediante la inactivación de los cultivos ácido-lácticos, sus enzimas y otros posibles microorganismos como levaduras y mohos. Sin embargo, el tratamiento térmico provoca pérdidas de nutrientes y colores, además de alterar las propiedades de sabor y textura de los productos (Lewis & Deeth, 2009; Tamime & Robinson, 2007). En este contexto, la combinación de monoacilglicérols junto con el tratamiento térmico podría conducir a procesos térmicos menos severos, pero más eficientes, obteniéndose productos de mayor calidad, por ejemplo, tratamientos térmicos que conserven la actividad de la enzima  $\alpha$ -D-galactosidasa, cuya presencia en los productos lácteos fermentados es particularmente deseable por los consumidores con deficiencia de esa enzima (Nagendra, 2017; Voidarou *et al.*, 2021).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación de emulsiones.

Se prepararon emulsiones de leche descremada reconstituida (RSM) de acuerdo con la Tabla 1. Se incorporaron aceite de maíz (MO), aceite de palma (PO), grasa de leche anhidra (AMF) o aceite de semilla de palma hidrogenado (HPKO) como fuente de grasa. Se utilizó RECODAN™ (Danisco A/S) como agente emulsionante (C.E.). La emulsificación de los ingredientes se realizó a 70 - 75 °C utilizando un homogeneizador de etapa única Rannie a una presión de homogeneización de 100 bar. El tamaño de las partículas de grasa se estandarizó a una moda entre 1,23  $\mu$ m y 1,58  $\mu$ m en todas las emulsiones preparadas, usando un medidor de partículas y gotas Malvern, serie 2600c (Malvern Instruments). Todas las emulsiones se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos.

**Tabla 1.** Composición de las emulsiones para las pruebas de inactivación térmica.

Emulsión	Leche descremada en polvo	Emulsificante Recodan™	Grasa (4 tipos)	Agua peptonada	Lactosa	Agua pura
Leche reconstituida descremada (RSM)	8.5					91.5
RSM+C.E.	8.5	0.2				91.3
RSM+C.E.+grasa	8.5	0.2	4			87.3
RSM+grasa	8.5		4			87.5

### **Inoculación de emulsiones.**

Se preparó una suspensión microbiana que contenía de  $10^9$  a  $10^{10}$  UFC mL<sup>-1</sup> mediante la adición de cultivo iniciador tipo DVI a 10 mL de leche reconstituida libre de grasa a 25°C. Se permitió que la suspensión se reactivara durante 1 h a 37 °C. Pasado ese tiempo, se tomó 1 mL de la suspensión microbiana y se agregó a 99 mL de cada emulsión previamente preparada y esterilizada, ahora considerada como medio de calentamiento.

### **Determinación de parámetros de muerte térmica de bacterias ácido-lácticas (LAB).**

Se realizaron tratamientos térmicos a 62.5°C en leche descremada reconstituida y leche descremada reconstituida con 0.2% de C.E. para *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Los ensayos posteriores se realizaron utilizando *S. thermophilus*, ya que fue la bacteria ácido-láctica que mostró mayor resistencia térmica. Se probaron otras temperaturas (60°C, 65°C y 68°C), pero se observó que la temperatura de 62.5°C era la que permitía una mejor observación del efecto sinérgico por la presencia de los acilglicerolos. El pH se ajustó a 6.6 ya que permitía una buena estabilidad de las emulsiones RSM. Para todos los ensayos se determinaron los tiempos de reducción decimal (valores D) y el número de grados que se debería de aumentar la temperatura para lograr una reducción de diez veces en el valor D (valores Z). Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y se reportó tanto la media como la desviación estándar.

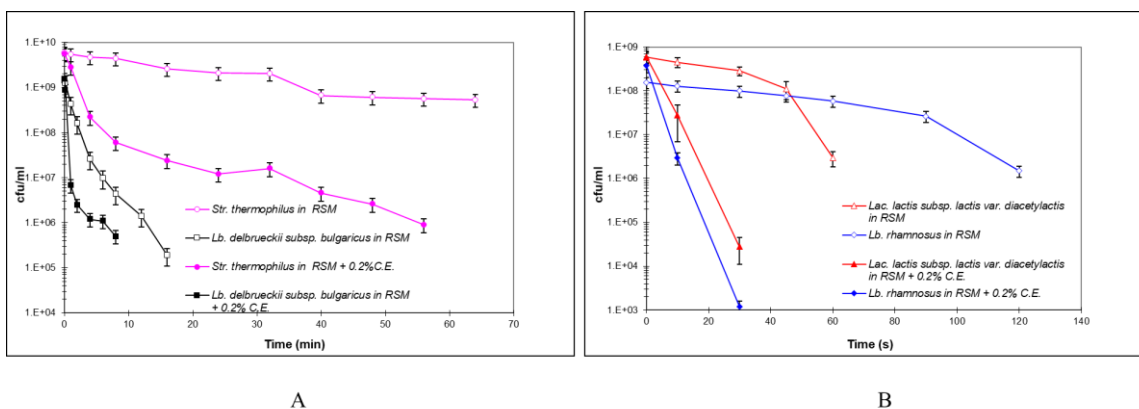
### **Enumeración de sobrevivientes.**

El número de sobrevivientes al tratamiento térmico se determinó mediante siembra en superficie usando la técnica de spiral plating. La siembra se realizó en medio M17, seguido de incubación aeróbica a 37 °C por 48 h para *S. thermophilus*, y a 30 °C por 48 h para *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*. Asimismo, se utilizó medio MRS acidificado, seguido de incubación anaeróbica a 37 °C por 72 h para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, y a 45 °C durante 72 h para *L. rhamnosus*. Todos los medios de cultivo se obtuvieron de Unipath Ltd. La lactosa se obtuvo de Difcon Laboratories. El recuento de colonias se realizó utilizando un contador de colonias láser automático (Spiral System Instruments Inc.).

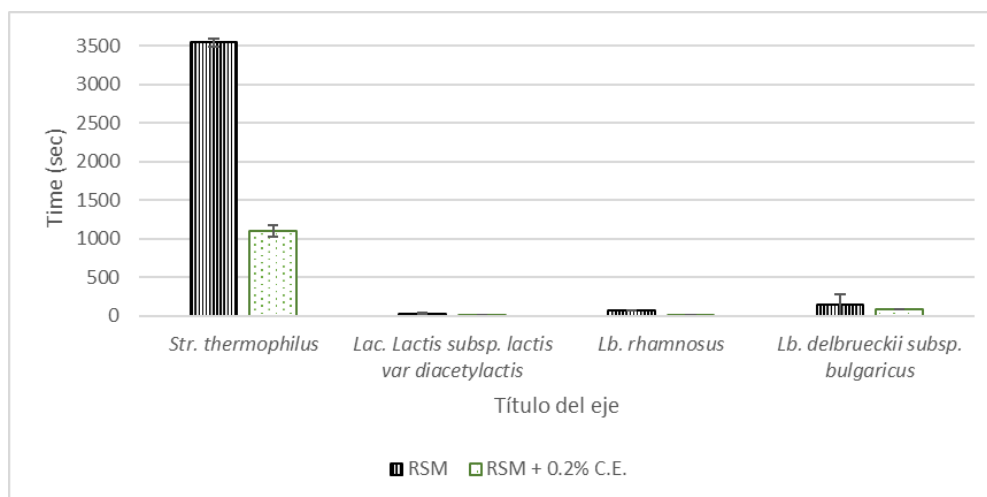
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Parámetros de muerte térmica de LAB en emulsiones RSM.**

El número de sobrevivientes durante el tratamiento térmico a 62.5 °C, en emulsiones RSM y emulsiones RSM + 0.2% E.C., para *S. thermophilus*, *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, *L. rhamnosus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, se muestran en las Figura 1. El tiempo de reducción decimal (valores D) se muestra en la Figura 2. *S.thermophilus* presentó la mayor resistencia térmica, y permitía observar mejor los cambios por efecto de C.E.



**Figura 1.** Curvas de muerte térmica a 62.5°C de LAB en emulsiones RSM y emulsiones RMS+0.2%C.E. A) *Str. Thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; B) *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, y *L. rhamnosus*.



**Figura 2.** Valores D (tiempo de reducción decimal) a 62.5 °C para las cuatro especies de LAB en emulsiones RSM y RSM+0.2%C.E.

**Influencia de la cepa en la termorresistencia bacteriana.**

La Tabla 2 muestra los valores D obtenidos durante el tratamiento térmico en emulsiones RSM, de dos cepas diferentes de *S. thermophilus*, códigos TA054 y TA060. El análisis de varianza mostró que, para la misma cepa bacteriana, no hubo una diferencia significativa en los valores D obtenidos de diferentes emulsiones. Sin embargo, la cepa TA060 presentó mayor resistencia térmica que la cepa TA054. Los resultados destacaron el hecho de que los valores D son específicos de la cepa bacteriana que se utilice.

**Tabla 2.** Valores D para *S. thermophilus* TA054 y TA060

Strain	Temp (°C)	SM+CE+PO	Std. Dev.	SM+CE+MO	Std. Dev.	SM+CE+AMF	Std. Dev.	SM+CE+HPKO	Std. Dev.
TA054	62.5	11.1 ± 0.46		12.2 ± 0.93		11.5 ± 0.29		11.2 ± 0.36	
TA054	65	3.8 ± 0.49		3.1 ± 0.27		3.2 ± 0.14		3.4 ± 0.10	
TA060	62.5	47.5 ± 1.90		47.6 ± 2.22		49.2 ± 1.13		47.8 ± 1.01	
TA060	65	8.7 ± 0.15		8.1 ± 0.30		8.4 ± 0.20		9.0 ± 0.21	

## CONCLUSIÓN

Los resultados anteriores mostraron el efecto sinérgico de un emulsificante a base de monoacilgliceroles en la termorresistencia de las bacterias ácido-lácticas. La adición de grasa láctea anhidra o cualquier grasa vegetal redujo el efecto bactericida del emulsificante.

Derivado de los resultados observados, podría argumentarse que el efecto potenciador en la inactivación térmica de bacterias no fue causado por una lesión por calor mejorada de las células bacterianas, sino por una inactivación química potenciada por calor. El daño a la pared celular bacteriana y la membrana celular parece ser el mecanismo más probable, lo cual concuerda con lo reportado por Yoon *et al.* (2018), quienes señalaron que el comportamiento lítico de los ácidos grasos y los monoglicéridos sobre la membrana se deriva de sus propiedades anfipáticas, lo que puede provocar la desestabilización de la membrana y la formación de poros, con la consecuente inhibición del crecimiento de células bacterianas (acción bacteriostática) o la muerte celular (acción bactericida). También se debe considerar que los ácidos grasos tienen el potencial de interrumpir la cadena de transporte de electrones al unirse a los transportadores de electrones o alterar la integridad de la membrana, así como interferir con la fosforilación oxidativa al disminuir el potencial de membrana y el gradiente de protones.

Los resultados obtenidos en esta investigación podrían guiar el rediseño de procesos térmicos menos severos que prolongaran igualmente la vida de anaquel de productos fermentados bajos en grasa, favoreciendo a la vez la conservación de sus características organolépticas y de sus beneficios nutricionales, y reduciendo al mismo tiempo los costos asociados a la etapa de tratamiento térmico del producto.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aldrete-Tapia, J.A., & Torres, J.A. (2020). Enhancing the Inactivation of Bacterial Spores during Pressure-Assisted Thermal Processing. *Food Eng Rev.*
- García, M., Amalaradjou, M. A. R., Nair, M. K. M., Annamalai, T., Surendranath, S., Lee, S., Hoagland, T., Dzurec, D., Faustman, C., & Venkitanarayanan, K. (2007). Inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters by monocaprylin alone or in combination with acetic acid. *Journal of Food Protection*, 70(7), 1594-1599.
- Kozak, S. M., Brown, S. R., Bobak, Y., & D'Amico, D. J. (2018). Control of *Listeria monocytogenes* in whole milk using antimicrobials applied individually and in combination. *Journal of Dairy Science*, 101(3), 1889-1900.
- Lewis, M. J., & Deeth, H. C., (2009). *Heat treatment of milk. In: Milk Processing and Quality Management.* Edit. by Adrian Y. Tamime. Society of Dairy Technology series. Blackwell Publishing, Ltd. United Kingdom.
- Nagendra, P. S. (2017). *Yogurt in Health and Disease Prevention.* Academic Press, Elsevier, London, United Kingdom.
- Tamime, A. Y., & Robinson, R. K. (2007). *Tamime and Robinson's Yoghurt, Science and Technology* (Third Edition). Woodhead Publishing. Series in Food Science, Technology and Nutrition. Washington, DC.
- Voidarou, C., Antoniadou, M., Rozos, G., Tzora, A., Skoufos, I., Varzakas, T., Lagiou, A., and Bezirtzoglou, E. (2021). Fermentative Foods: Microbiology, Biochemistry, Potential Human Health Benefits and Public Health Issues. *Foods*, 10(1), 69.

- Yang, R., Guan, J., Sun, S., Sablani, S. S., & Tang, J. (2020). Understanding water activity change in oil with temperature. *Current Research in Food Science*, 3, 158-165.
- Yoon, B. K., Jackman, J. A., Valle-González, E. R., & Cho, N. J. (2018). Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1114.
- Yosief, H. O., Hussain, S. A., Sarker, M. I., & Annous, B. A. (2020). Efficacy of Fatty Acid Amide Derivatives against *Listeria monocytogenes*. *Chemistry Select*, 5(39), 12261-12265.