



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



***CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE
SUBPRODUCTOS CÍTRICOS DE LIMÓN, NARANJA Y
MANDARINA FRENTE A ESCHERICHIA COLI 0157:H7
Y SALMONELLA TYPHIMURIUM.***



MASTER EN CIENCIA E INGENIERIA DE LOS ALIMENTOS

Esteban Picón Foronda
Directora: M^a Dolores Rodrigo Aliaga
Codirector: Antonio Martínez López
Directora Experimental: María Consuelo Pina-Pérez
Centro: IATA-CSIC
Valencia, Junio 2013

CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE SUBPRODUCTOS CÍTRICOS DE LIMÓN, NARANJA Y MANDARINA FRENTE A LOS PATÓGENOS ALIMENTARIOS *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 Y *SALMONELLA TYPHIMURIUM*.

Esteban Picón Foronda, María Dolores Rodrigo Aliaga¹ (Director), Antonio Martínez López¹ (Codirector), María Consuelo Pina-Pérez¹ (Director experimental)

RESUMEN

Investigadores e industriales trabajan en el desarrollo de nuevas formulaciones y procesos que garanticen la calidad y la seguridad de los alimentos. En el ámbito de las nuevas formulaciones, los subproductos de la industria alimentaria representan una potencial fuente de materias primas económicas, y ricas en componentes bioactivos, cuyas propiedades tecnológicas y antimicrobianas se encuentran todavía escasamente estudiadas. En este contexto se plantea el objetivo del presente estudio, evaluar las propiedades antimicrobianas de tres subproductos cítricos; mandarina, naranja y limón, frente a dos patógenos de especial interés para la industria agroalimentaria *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* O157:H7, en medio de referencia, bajo diferentes condiciones de incubación: temperatura [5-22] °C y concentración de subproducto [0.5-10] % (p/v). De los resultados obtenidos se concluye que todos los subproductos presentan efecto bacteriostático y/o bactericida bajo las condiciones estudiadas, siendo el subproducto de mandarina más efectivo frente a los microorganismos considerados. Los valores máximos de reducción en ambas poblaciones microbianas tras la exposición a un 5 % (p/v) de mandarina, alcanzan niveles de ≈ 8 ciclos \log_{10} en refrigeración (5°C) para *S. typhimurium* y 1.60 ciclos \log_{10} para *E.coli* O157:H7, a temperatura ambiente (22°C). De los estudios llevados a cabo en la presente tesina de máster se concluye que los subproductos cítricos presentan capacidad antimicrobiana efectiva, pudiendo actuar como barrera a la proliferación microbiana, adicionados, por ejemplo, a bebidas pasteurizadas, prolongando la vida útil de las mismas en refrigeración, contribuyendo además a cumplir con objetivos de residuo cero marcados por la Unión Europea.

RESUM

Investigadors i industrials treballen en el desenvolupament de noves formulacions i nous processos que garanteixquen la qualitat i la seguretat dels aliments. En l'àmbit de les noves formulacions, els subproductes de la indústria alimentària representen una potencial font de matèries primes econòmiques, i riques en components bioactius, quines propietats tecnològiques i antimicrobianes es troben encara escassament estudiades.

En aquest context es planteja l'objectiu del present estudi, avaluar les propietats antimicrobianes de tres subproductes cítrics; mandarina, taronja i llimona, davant de dos patògens d'especial interès per a la indústria agroalimentària *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli* O157: H7, en mig de referència, i sota diferents condicions d'incubació: temperatura [5-22] °C i concentració de subproducte [0.5-10] % (p/v). Dels resultats obtinguts es conclou que tots els subproductes presenten efecte bacteriostàtic i / o bactericida sota les condicions estudiades, sent el subproducte de mandarina més efectiu davant dels microorganismes considerats, Els valors màxims de reducció en ambdues poblacions microbianes arriben a nivells de ≈ 8 cicles \log_{10} per *S. typhimurium* en condicions de refrigeració (5°C) i 1.60 cicles \log_{10} per *E.coli* O157: H7 a temperatura ambient (22°C). Dels estudis duts a terme en aquesta tesina de màster es conclou que els subproductes cítrics presenten capacitat antimicrobiana efectiva, i poden actuar com a barrera a la proliferació microbiana adicionats, per exemple, a begudes pasteuritzades, perllongant la vida útil de les mateixes en refrigeració, contribuint a més a complir amb objectius de residu zero marcats per la Unió Europea.

ABSTRACT

Scientific researchers and food processors are working in the development of new formulations and new technologies to ensure the quality and safety of food products. In the area of the new formulations, by-products from the food industry are a potential source of inexpensive raw materials, and rich in bioactive components whose technological and antimicrobial properties are still scarcely studied. In this context there is focused the objective of the present study, to evaluate the antimicrobial properties of three citrus by-products, tangerine, orange and lemon, against two pathogens of particular interest to the food industry *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157: H7, in reference medium, under different incubation conditions: temperature and by-products concentration. According to obtained results, it can be concluded that all citric by-products showed bacteriostatic and / or bactericidal effect under the studied conditions, being the tangerine by-product more effective against considered microorganisms. Maximum reduction levels in both microbial populations achieved values of $\approx 8 \log_{10}$ cycles for *S. typhimurium* at refrigeration temperature (5°C) and 1.60 \log_{10} cycles for *E.coli* O157: H7 at room temperature (22°C). From the studies carried out in this master thesis it can be concluded that citrus by-products have effective antimicrobial activity, and may act as a barrier to microbial growth added to pasteurized beverages, e.g prolonging their shelf-life under refrigeration, and in addition contributing to meet zero waste targets set by the European Union.

Palabras clave: Subproductos cítricos, mandarina, limón, naranja, *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7, concentración mínima inhibitoria (MIC), concentración mínima bactericida (MBC).

INTRODUCCIÓN

La industria agroalimentaria española cerró 2010 con unas ventas netas cercanas a los 81.369 millones de euros (16% de las ventas netas del total de la industria y el 8% del PIB español), lo que la convierte en el primer sector industrial de la economía española y el quinto de Europa (*INE, 2011*).

Las actuales industrias alimentarias deben innovar y desarrollar nuevos productos alimenticios que satisfagan las necesidades cambiantes y exigencias de los consumidores. Fruto de esta intensa actividad productiva, las industrias agroalimentarias de frutas y verduras generan una gran cantidad de residuos orgánicos, algo que deriva en importantes pérdidas económicas y medioambientales. Los subproductos agroindustriales presentan, sin embargo, un amplio potencial de aprovechamiento que debe ser rentabilizado de manera eficiente (*Arvanitoyannis y Varzakas, 2008*).

Cada día es mayor el número de empresas y grupos de investigación que tratan de obtener un rendimiento de estos subproductos y reducir la generación de residuos contaminantes (*Martín-Luengo et al, 2011; Martín-Belloso, 2009*). Hasta la fecha, entre las principales vías de aprovechamiento de dichos subproductos vegetales destacan: (i) su uso como bioadsorbentes durante la etapa de pre-tratamiento de aguas residuales; (ii) agentes fitoquímicos en agricultura; (iii) alimentación directa del ganado o para la fabricación de piensos; (iv) utilización en la industria del papel por su alto contenido en celulosa; (v) fabricación de biocombustibles; y recientemente, (vi) aislamiento de ingredientes funcionales y, (vii) obtención de alimentos con un valor nutricional añadido (*Gracia R.A, 2004*).

La posible integración de los subproductos de la industria agroalimentaria como ingredientes en nuevas formulaciones de alimentos supondría una solución a la actual problemática medioambiental, y la posibilidad de obtener nuevos productos alimenticios que logren satisfacer las necesidades de los consumidores (*Aruoma et al, 2012*). Tradicionalmente, para asegurar la inocuidad de los alimentos y prolongar su vida útil, la aplicación de tratamientos térmicos prolongados y el uso de conservantes químicos han sido las metodologías más empleadas (*Raso y Barbosa-Cánovas, 2003*). Sin embargo, los consumidores actuales son cada vez más conscientes de la relación existente entre una alimentación saludable y una mejora de la calidad de vida (*Hamm y Bellows, 2003*), por ello buscan alimentos frescos o mínimamente procesados sin adicción de aditivos químicos.

Por tanto, y concretamente, en materia de higiene y seguridad alimentaria, es una realidad a la orden del día el desarrollo de nuevas estrategias que permitan reducir y limitar la presencia de patógenos en alimentos, (*Good Hygienic Practices, GHP*) (*Matyjek et al, 2005*) manteniendo la calidad organoléptica y nutricional de los mismos, (p.e. alimentos procesados por altas presiones hidrostáticas), realidad en la que el empleo de sustancias naturales con capacidad antimicrobiana encuentra cabida.

Son diversos los estudios que profundizan en el valor funcional de los compuestos fitoquímicos presentes en diversos vegetales. En este sentido, los subproductos agroindustriales son también fuente de compuestos bioactivos de gran importancia para la dieta humana.

Este es el caso de las frutas cítricas, ricas en fibra, vitaminas y minerales, carotenoides y los flavonoides. (Igal et al, 2013; Trípoli et al, 2007). Los estudios han demostrado una significativa reducción del riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas, por ejemplo el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y Alzheimer asociada al consumo de frutas y vegetales (Ladaniya M.S., 2008). Además, diversos estudios atribuyen propiedades antimicrobianas, bacteriostáticas y/o bactericidas a los aceites esenciales presentes en las frutas (Dembitsky et al, 2012). Este hecho, unido a la revolución que tiene lugar actualmente por parte de las industrias (Saucedo-Reyes et al, 2009) que tratan de satisfacer a un consumidor informado, preocupado por la salud, y el consumo de alimentos saludables, y fáciles de preparar, nos llevan a focalizar esfuerzos en investigar el posible uso de compuestos tan naturales como sea posible, “ingredientes”, que aportando cierto carácter funcional o incrementando la calidad organoléptica del producto, cuando sean incorporados en la matriz alimentaria, aporten además un carácter antimicrobiano (Kneafsey et al, 2013), cumpliendo así con los objetivos de calidad y seguridad alimentaria establecidos por la FAO/OMS.

En este contexto, se plantean los principales objetivos del presente estudio: (i) determinar la capacidad antimicrobiana de subproductos cítricos limón, naranja, y mandarina procedentes de la industria de procesado de zumos, frente a los patógenos *S. typhimurium* y *E.coli* O157:H7; y (ii) evaluar la influencia de los factores, concentración de subproducto y temperatura de incubación, en dicha capacidad antimicrobiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

A partir de liófilos proporcionados por la Colección Española de Cultivos Tipo se obtuvieron múltiples viales en fase estacionaria de ambas cepas de estudio (*Salmonella entérica* serovar *typhimurium* CECT 443 y *Escherichia coli* O157:H7 CECT 4157), siguiéndose el procedimiento descrito por Pina-Pérez et al, (2012). Su concentración celular promedio se determinó por recuento de viables en Agar Triptona Soja (TSA; Scharlab S.L., España). El valor obtenido a partir de cuatro muestras fue de $7,60 \times 10^9$ ufc/mL. El cultivo en fase estacionaria de crecimiento se almacenó a una temperatura de -80 °C hasta su utilización en el laboratorio.

Subproductos cítricos

El siguiente trabajo está centrado en el estudio de las propiedades bacteriostáticas/bactericidas de los subproductos de las frutas cítricas de consumo más frecuente, naranja, mandarina y limón.

Los subproductos cítricos fueron proporcionados en polvo por una empresa externa productora de zumos, y proceden de la piel del limón, la mandarina y la naranja.

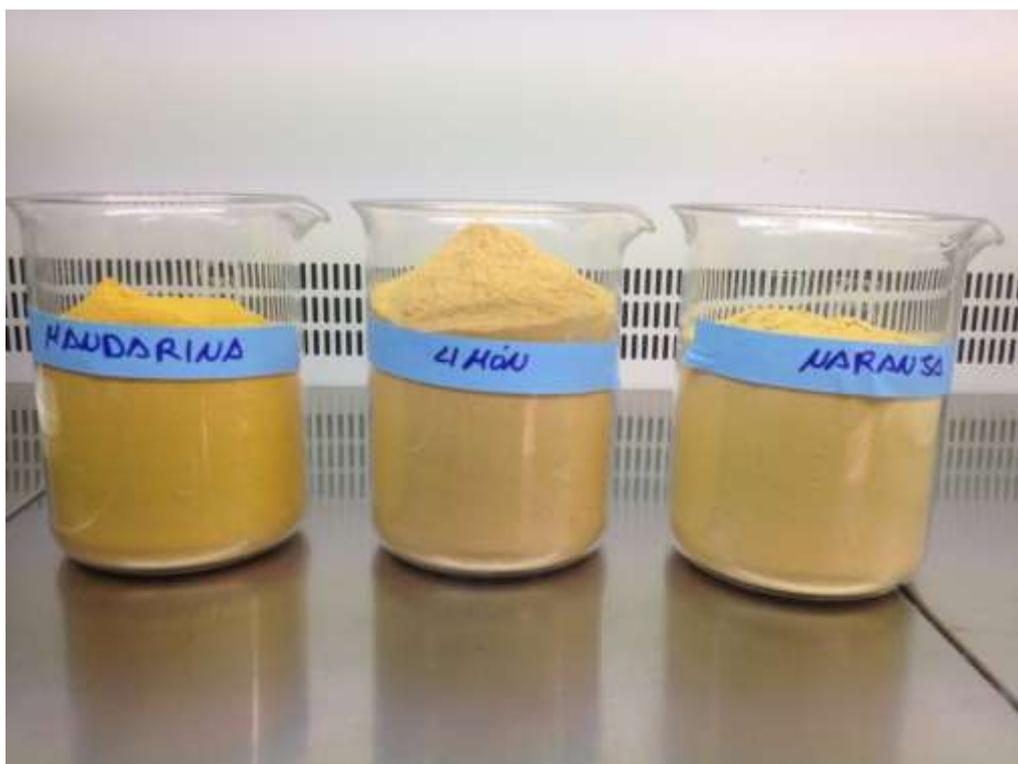


Figura 1. Subproductos de mandarina, limón y naranja en polvo utilizados experimentalmente en laboratorio

El aprovechamiento de estos subproductos por su posible potencial antimicrobiano se enmarca en el proyecto INNPACTO: “NUEVOS PRODUCTOS PARA ALIMENTACIÓN, OBTENIDOS A PARTIR DE LA VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS HORTOFRUTICULAS” IPT-2011-1724-060000. www.valbio.es vigente en el laboratorio de procesos de conservación del IATA.

Evaluación de la capacidad antimicrobiana

La evaluación del potencial antimicrobiano atribuible a los subproductos cítricos en estudio se llevó a cabo en medio de referencia, agua de peptona tamponada (Buffered peptone water, BPW) (Scharlab, S.A., Barcelona, ESPAÑA) 1 ‰ (p/v) (Oyarzabal *et al*, 2007). El sustrato de referencia fue inoculado con los patógenos en estudio hasta una concentración final de 10^8 ufc/mL. Con el objetivo de evaluar la capacidad antimicrobiana de los subproductos, éstos se adicionaron al sustrato en concentraciones de 0.5, 1, 5 y 10 % (p/v) obteniendo curvas de evolución de carga microbiana (ufc/mL) con el tiempo de almacenamiento y bajo diferentes temperaturas de incubación: 5, 10 y 22 °C. El recuento de viables se realizó siguiendo el procedimiento de diluciones seriadas y recuento en placa, y siempre utilizando alícuotas tomadas a intervalos regulares de tiempo dependiendo de la temperatura de almacenamiento, hasta que el crecimiento o la muerte del microorganismos llegó a una situación estable: 96 horas para 5 y 10 °C y 24 horas para 22 °C.

Las diluciones se efectuaron en agua de peptona estéril al 1‰ (Scharlab S.L., España), las siembras por inmersión y los recuentos en TSA (Scharlab S.L., España), transcurridas 24 horas de incubación a 37° C.



Figura 2. Subproductos cítricos en condiciones de trabajo utilizando sustrato de referencia agua de peptona 1 ‰.

La capacidad antimicrobiana de los subproductos en estudio será evaluada en términos de reducción/crecimiento ($\log(N_t/N_0)$) de la población inicial con el tiempo de almacenamiento, siendo N_0 (UFC/mL) el número inicial de microorganismos a tiempo cero, y N_t (UFC/mL) el número final de microorganismos a cada t (h); y bajo las condiciones en estudio: concentración de subproducto [0-10] % (p/v) y temperatura de incubación 5, 10, y 22 °C. Además, con objeto de establecer comparaciones, se caracterizará el comportamiento de cada uno de los microorganismos a la exposición a subproductos cítricos mediante la estimación de las concentraciones mínima inhibitoria (MIC) y mínima bactericida (MBC) definidas a continuación:

Concentración mínima inhibitoria MIC: concentración más baja de una sustancia antimicrobiana en el rango testado, capaz de inhibir completamente el crecimiento microbiano (*Guillier et al, 2007*)

Concentración mínima bactericida (MBC): concentración más baja de una sustancia antimicrobiana en el rango testado capaz de ejercer un efecto bactericida sobre el microorganismo en estudio (*Bär et al, 2009*).

Análisis Estadístico de Resultados.

Empleando el programa Statgraphics® Centurion XV (StatPoint Technologies Inc., USA) se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para valorar si los factores analizados han influido de forma significativa en el proceso.

Posteriormente, se construyeron gráficos de barras para representar los resultados obtenidos empleando el software Microsoft Office Excel® 2010 (Microsoft® Corporation, USA).

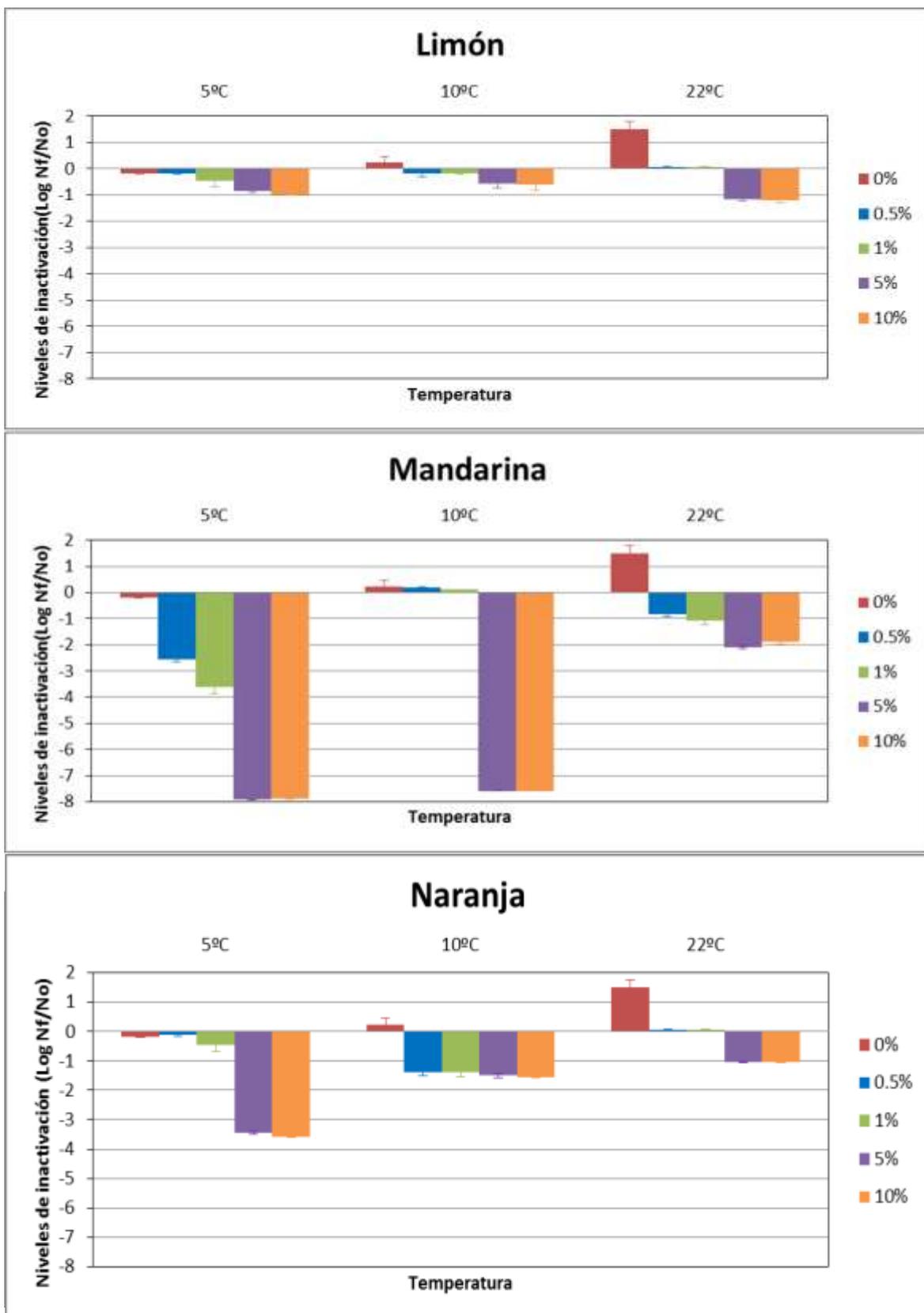
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capacidad antimicrobiana de los subproductos limón, mandarina y naranja frente a *S. typhimurium*.

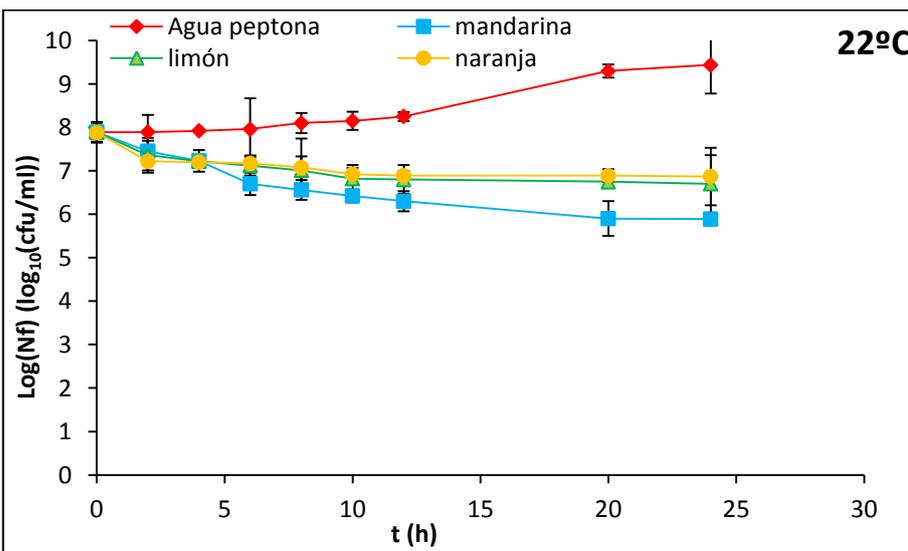
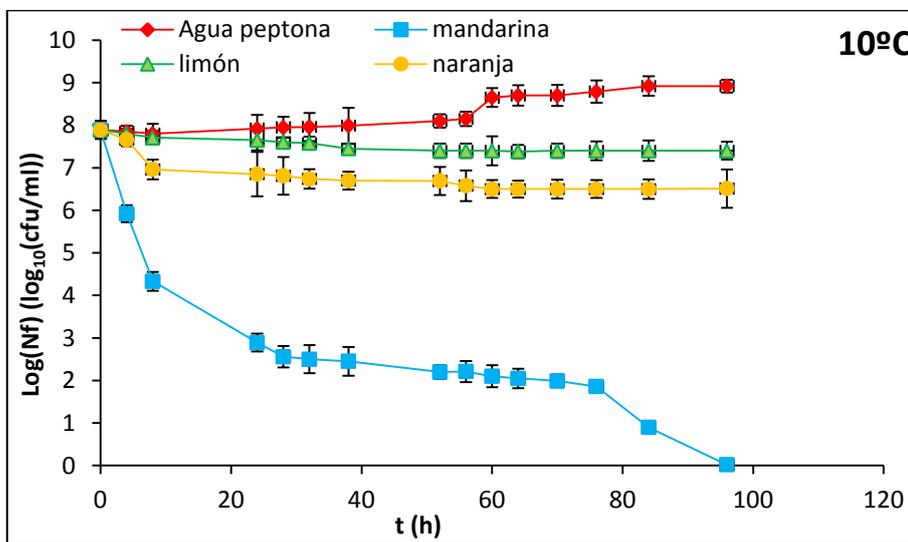
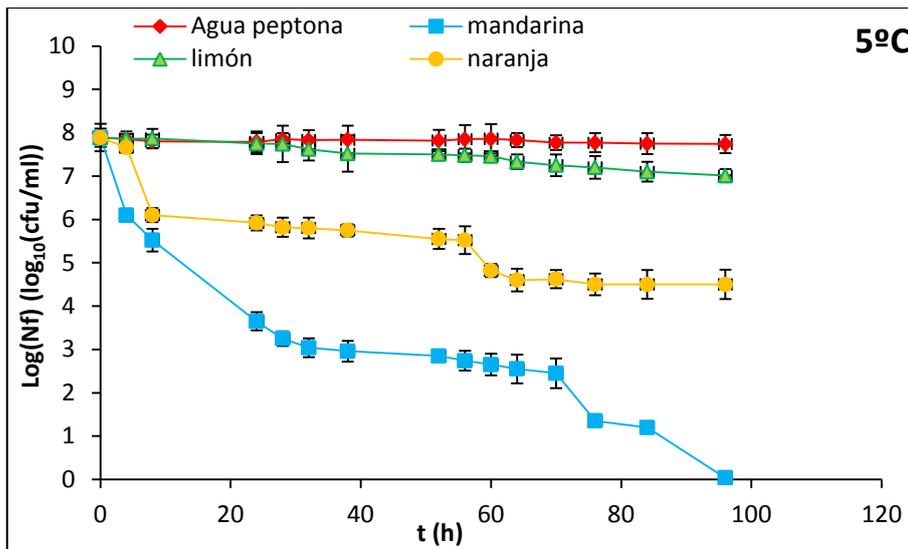
La gráfica 1 muestra el efecto de la temperatura de incubación (5, 10 y 22°C) y de la concentración (0, 0.5, 1, 5 y 10% (p/v)) de cada subproducto, limón, mandarina y naranja, sobre el crecimiento de células de *Salmonella typhimurium* tras 96h y 24h de incubación a 5 y 10°C y 22°C, respectivamente. De acuerdo a un análisis de ANOVA se obtuvo que, para todos los subproductos estudiados, tanto la temperatura de incubación como la concentración de subproducto adicionada al medio, influyen significativamente ($p \leq 0.05$) en la capacidad antimicrobiana observada, de modo que una mayor concentración de subproducto produce una mayor inhibición del crecimiento. La adición de un 5% (p/v) de subproducto produce, en general, el mayor efecto sobre el crecimiento de *Salmonella* no existiendo diferencias significativas entre las concentraciones 5 y 10%.

La gráfica 2 muestra la evolución de los recuentos de células de *S. typhimurium* incubadas a 5°C, 10°C y 22°C y expuestas a un 5% (p/v) de los diferentes subproductos, y los compara con los obtenidos en la muestra control (0% de subproducto). Los resultados muestran que 5°C es una temperatura de inhibición del crecimiento de *Salmonella* incluso en ausencia de subproducto (Yang et al, 2001; Mañas et al, 2003). Sin embargo, a esta temperatura la adición de un 5% del subproducto de naranja y mandarina tiene efecto bactericida provocando la muerte progresiva de *Salmonella*, llegando a inactivar un máximo de 8 ciclos logarítmicos en el caso del subproducto de mandarina.

A 10°C, temperatura de cierto abuso de refrigeración, *Salmonella* es capaz de comenzar a crecer. En estas condiciones, la adición del subproducto de limón inhibe el crecimiento, mientras que los subproductos de naranja y mandarina presentan de nuevo un carácter bactericida, inactivando hasta 8 ciclos logarítmicos en el caso de mandarina. En ausencia de refrigeración (22°C), se observa crecimiento de *Salmonella*, sin embargo, la adición de un 5% (p/v) de cualquiera de los subproductos cítricos estudiados inhibe el crecimiento de dicho microorganismo. Es en el caso de temperaturas de ligero abuso de refrigeración (10°C) o de ruptura absoluta de la cadena de frío (22°C) donde resulta más interesante la acción de los subproductos de cítricos ya que actúan como medida adicional del control del crecimiento de *S. typhimurium*.



Gráfica 1. Ratios de reducción ($\text{Log}_{10}(N_f/N_0)$) en los niveles de población de *S. typhimurium* para las concentraciones de 0, 0.5, 1, 5 y 10 % y para las diferentes temperaturas de incubación (5°C, 10°C y C 22°C) aplicadas a los diferentes subproductos en estudio: limón, mandarina y naranja.



Gráfica 2. Evolución de la población de células de *S. typhimurium* bajo el efecto de los diferentes subproductos adicionados al 5 % (p/v), a las distintas temperaturas de incubación.

Desglosando la efectividad bactericida/bacteriostática de cada uno de los subproductos destaca el potencial del subproducto de mandarina, que resultó ser el más efectivo frente a *S. typhimurium*. A 5-10°C presentó efecto bactericida, llegando a inactivar hasta 8 ciclos logarítmicos, mientras que a 22 °C es capaz de inhibir el crecimiento de *Salmonella* a cualquier concentración estudiada e inactivar hasta 2 ciclos logarítmicos para concentraciones del 5%. En cuanto al subproducto de naranja, presenta las mejores propiedades bactericidas frente a *S. typhimurium* a temperatura de refrigeración (5°C), consiguiéndose un máximo de 3.6 ciclos log₁₀ para una concentración del 5% de subproducto. A 10 °C los niveles de inactivación alcanzados se sitúan en valores entre [1.40-1.55] ciclos log₁₀ para concentraciones de subproducto 0.5-10% (p/v) respectivamente, mientras que a 22 °C la adición de naranja inhibe el crecimiento de *S. typhimurium* a cualquiera de las concentraciones estudiadas. El subproducto de limón es el que menor efecto presenta, sin embargo, es capaz de inhibir el crecimiento de *Salmonella* a cualquiera de las concentraciones y temperaturas estudiadas. La tabla 1 incluye la caracterización del microorganismo *S. typhimurium* en función de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima bactericida requerida bajo cada una de las condiciones estudiadas.

Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) en condiciones ensayadas. Ausencia de efectos significativos (--).

<i>Salmonella typhimurium</i>			
Temperatura(°C)	Subproducto	MIC (%)	MBC (%)
5	Naranja	-	1
	Limón	-	1
	Mandarina	-	0,5
10	Naranja	-	0,5
	Limón	-	0,5
	Mandarina	0,5	5
22	Naranja	0,5	5
	Limón	0,5	5
	Mandarina	-	0,5

Como se puede observar a partir de los resultados obtenidos en los ensayos experimentales, *S. typhimurium* presenta una elevada sensibilidad a las propiedades antimicrobianas de los subproductos cítricos, siendo efectivas en concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de 0.5% (p/v) en todo caso, y MBC en el rango [0.5-5] % (p/v). Sin embargo, la sensibilidad de este microorganismo en términos de MIC y MBC viene claramente condicionada por la temperatura de incubación, y el subproducto cítrico de que se trate en cada caso. Así bien, el subproducto de mandarina muestra la mayor efectividad frente a *S. typhimurium*, con un valor de MBC más bajo para la temperatura de 5°C.

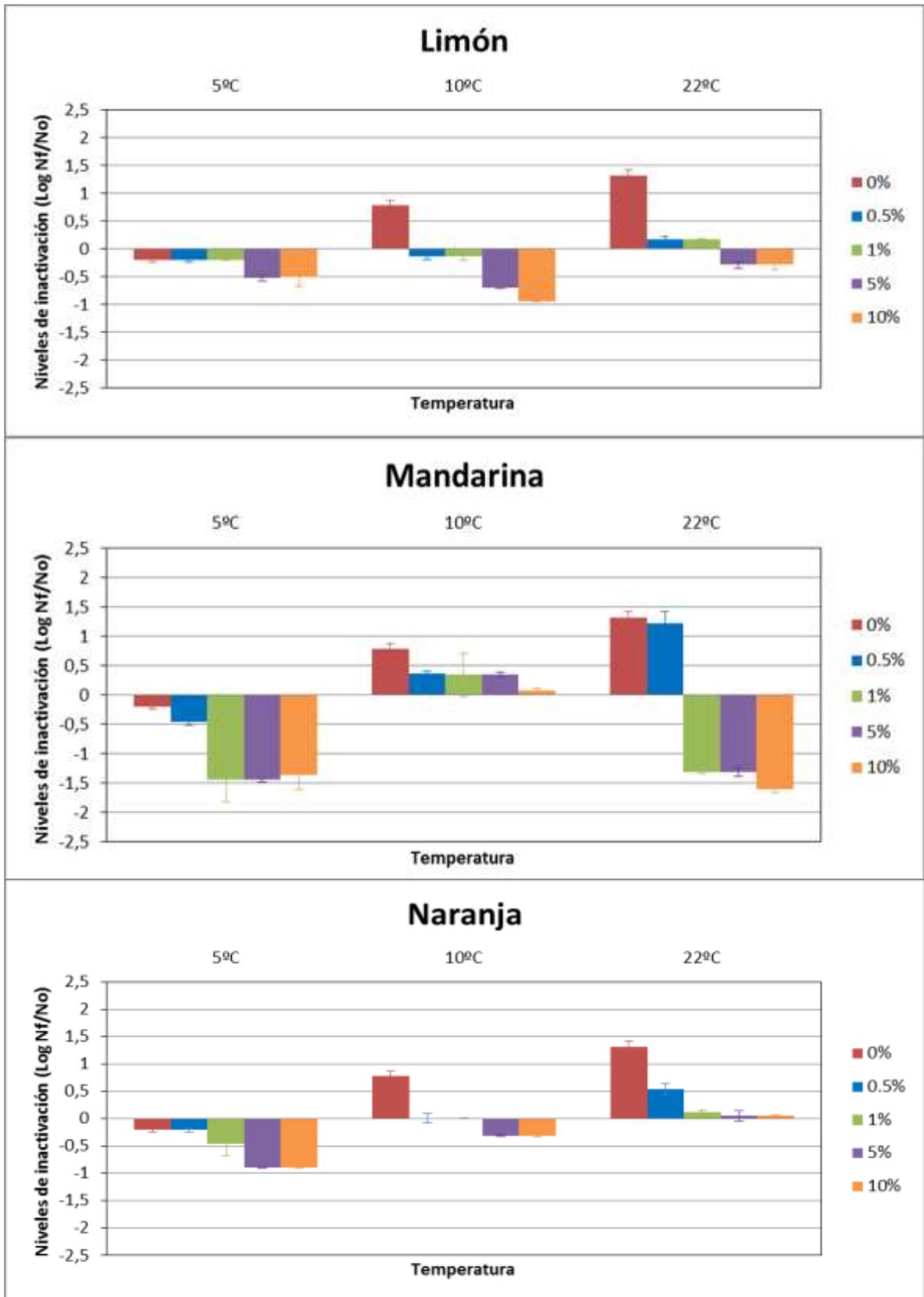
La contribución de las temperaturas de refrigeración a la capacidad antimicrobiana de los subproductos es clara. Para todos los subproductos, las temperaturas de refrigeración 5 y 10 °C ejercen un cierto efecto sinérgico con la concentración de subproducto adicionada al medio, siendo la MBC requerida a estas temperaturas, inferior a la requerida a temperatura ambiente. El efecto bacteriostático de la temperatura ha sido previamente estudiado por otros autores quienes atribuyen a las bajas temperaturas un efecto respuesta al estrés por parte de los microorganismos, correspondiente a la activación de mecanismos de defensa metabólica, y cambios moleculares, entre otros (*Shaphiro y Cowen, 2012*).

Capacidad antimicrobiana de los subproductos limón, mandarina y naranja frente a *Escherichia coli* O157:H7.

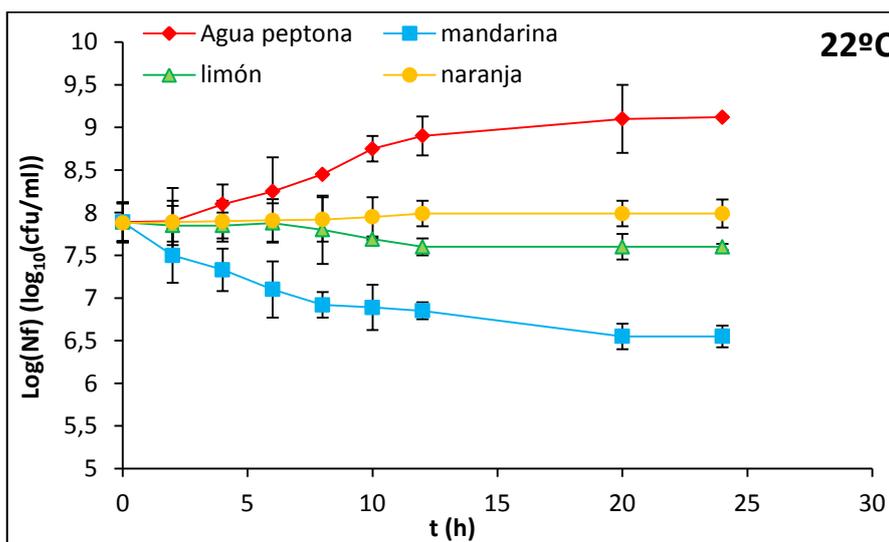
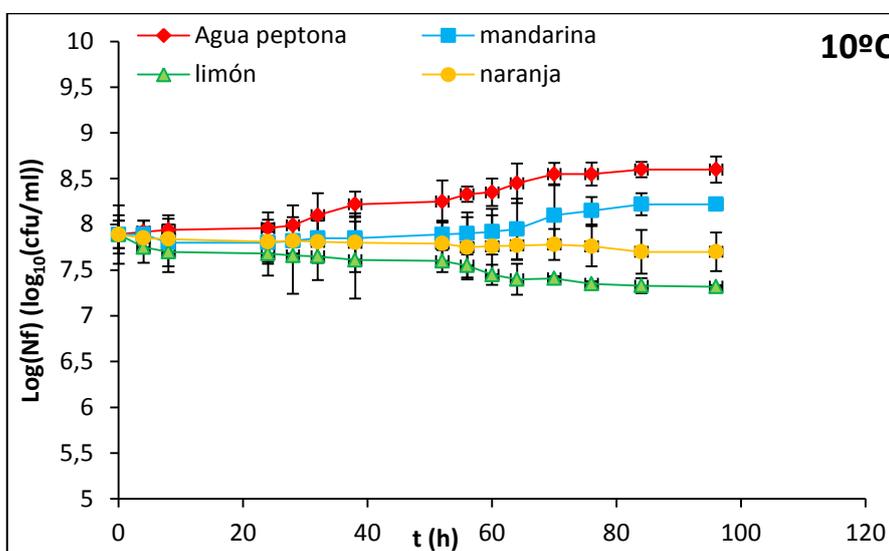
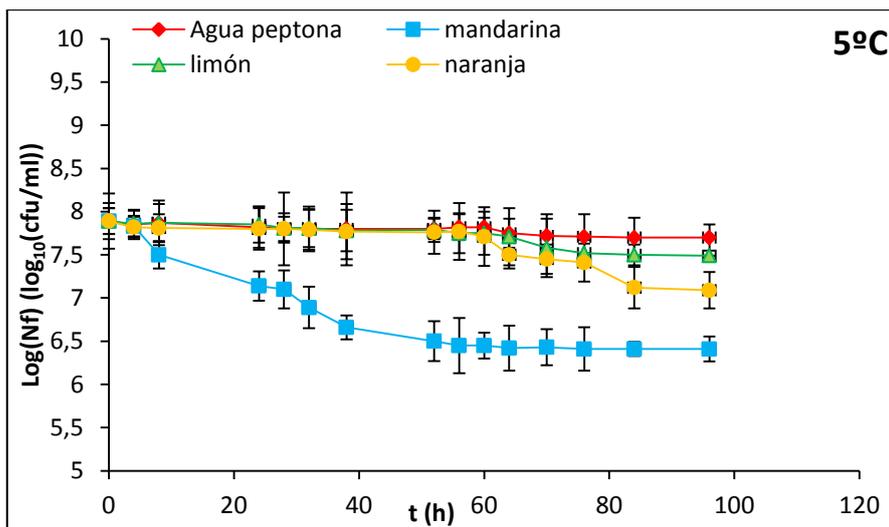
La gráfica 3 muestra los resultados obtenidos experimentalmente tras la exposición de células de *Escherichia coli* O157:H7 a concentraciones de 0, 0.5, 1, 5 y 10 % (p/v) de los subproductos estudiados, limón, mandarina y naranja, a las diferentes temperaturas de incubación 5 °C, 10 °C, y 22 °C. De acuerdo a un análisis de ANOVA se obtiene que, para todos los subproductos estudiados, tanto la temperatura de incubación como concentración de subproducto adicionada al medio, influyen significativamente ($p \leq 0.05$) en la capacidad antimicrobiana observada frente a *E.coli* O157:H7. El mayor efecto antimicrobiano se alcanza para concentraciones del 5 y 10% no existiendo diferencias significativas entre ellos.

La gráfica 4 muestra la evolución de los recuentos de células de *E. coli* incubadas a 5°C, 10°C y 22°C y expuestas a un 5% (p/v) de los diferentes subproductos, y los compara con los obtenidos en la muestra control (0% de subproducto). Como en el caso de *S. typhimurium*, los resultados muestran que 5°C es una temperatura de inhibición del crecimiento de *E. coli* incluso en ausencia de subproducto. Sin embargo, a esta temperatura la adición de un 5% del subproducto de naranja y mandarina tiene efecto bactericida provocando la muerte progresiva de *E. coli* llegando a inactivar hasta 1.6 ciclos logarítmicos en el caso del subproducto de mandarina.

A 10°C, temperatura de cierto abuso de refrigeración, *E. coli* es capaz de comenzar a crecer. En estas condiciones, la adición del subproducto de limón y naranja presenta efecto bacteriostático. En ausencia de refrigeración (22°C), se observa crecimiento de *E. coli* sin embargo, la adición de un 5% (p/v) de cualquiera de los subproductos cítricos estudiados inhibe el crecimiento de dicho microorganismo, siendo bactericida la adición de mandarina, inactivando un máximo de 1.6 ciclos logarítmicos. Como en el caso de *Salmonella*, es en las situaciones de ligero abuso de refrigeración (10°C), o de ruptura absoluta de la cadena de frío (22°C), donde resulta más interesante la acción de los subproductos cítricos estudiados, ya que actúan como medida adicional del control del crecimiento.



Gráfica 3. Ratios de reducción ($\text{Log}_{10}(N_f/N_o)$) en los niveles de población de *E.coli* O157:H7, para las concentraciones de 0,0.5,1,5 y 10 % y para las diferentes temperaturas de incubación (5°C, 10°C y C 22°C) aplicadas a los diferentes subproductos en estudio; limón, mandarina y naranja.



Gráfica 4. Evolución de la población de células de *E. coli* O157:H7 bajo el efecto de los diferentes subproductos adicionados al 5 % (p/v), a las diferentes temperaturas de incubación.

El subproducto de mandarina resultó ser el más efectivo en cuando a reducir los niveles de *E.coli* O157:H7, [1.30-1.60] ciclos log₁₀, a las temperatura de 5 y 22 °C, respectivamente. En cuanto a los subproductos del limón y naranja, a temperaturas de refrigeración (5-10°C) presentan carácter bactericida (0.50-1 ciclo logarítmico), mientras que a 22°C presentan carácter bacteriostático.

La tabla 2 incluye la caracterización de *E. coli* O157:H7 en función de la concentración mínima inhibitoria (MIC) y de la concentración mínima bactericida (MBC) requerida bajo cada una de las condiciones estudiadas.

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) en condiciones ensayadas. Ausencia de efectos significativos (--).

<i>Escherichia coli</i>			
Temperatura(°C)	Subproducto	MIC (%)	MBC (%)
5	Naranja	-	1
	Limón	-	5
	Mandarina	-	5
10	Naranja	0.5	5
	Limón	-	5
	Mandarina	0,5	-
22	Naranja	0,5	-
	Limón	-	5
	Mandarina	0.5	5

Los subproductos cítricos en estudio son efectivos frente a *E.coli* O157:H7 con valores de MIC de 0.5% (p/v) a las diferentes temperaturas estudiadas, y valores de MBC en el rango comprendido entre [0.5-5] % (p/v), cuando los subproductos en estudio son adicionados al medio de referencia. No obstante, la sensibilidad de *E.coli* O157:H7 en términos de MIC y MBC viene condicionada, al igual que en el caso de *S. typhimurium*, por la temperatura de incubación y por el tipo de subproducto cítrico utilizado en cada caso. Si bien el subproducto de mandarina posee efecto bactericida a 5°C, bacteriostático a 10°C y ambos efectos a 22°C, los subproductos de naranja y limón, aunque con idénticos valores de MIC y MBC que la mandarina (a 10-22°C), poseen una menor capacidad en términos de reducción de la población microbiana.

En términos generales, y de acuerdo a los valores obtenidos en cuanto a MIC y MBC para *E.coli* O157:H7 podemos concluir que la sensibilidad de este microorganismo a los subproductos cítricos estudiados es inferior a la observada frente a *S. typhimurium*, bajo las mismas condiciones de estudio.

Justificación de la capacidad antimicrobiana de los subproductos cítricos frente a *S. typhimurium* y *E. coli* O157:H7

La sensibilidad de los microorganismos estudiados a los subproductos cítricos es debida a diversos factores.

De entre los factores más importantes implicados en este proceso destacan la temperatura, el pH (Gabriel y Nakano, 2010), la composición del subproducto (Bajpai, 2012), y la propia especie microbiana. Ambos patógenos pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, y son microorganismos mesófilos, con temperatura óptima 37°C, (Olaimat y Holley, 2012), por este motivo el crecimiento microbiano es limitado a las temperaturas de refrigeración y de abuso de refrigeración, observándose un efecto sinérgico temperatura-concentración de mandarina en lo que respecta a la reducción de la población microbiana a 5 y 10 °C (Alali et al 2012).

En general, el pH es un factor de control destacable en alimentos ácidos ya que inhibe el transporte celular y la actividad enzimática de los microorganismos. La tabla 3 muestra los valores de pH medidos para los subproductos estudiados para las concentraciones 5 y 10% en agua de peptona.

Tabla 3. Valores de pH medidos de las concentraciones de subproducto que han manifestado efectos bacteriostático/bactericida

	Mandarina		Naranja		Limón	
	5%	10%	5%	10%	5%	10%
pH	4.39±0.02	4.24±0.01	4.85±0.04	4.54±0.02	3.92±0.06	3.77±0.06

Como puede observarse el subproducto de limón es aquel que presenta un menor valor de pH, sin embargo es la mandarina el subproducto frente al cual los microorganismos en estudio muestran la mayor sensibilidad, por lo que se podría concluir que el pH no es el factor más condicionante en cuanto a definir la capacidad antimicrobiana de los subproductos incluidos en el presente trabajo.

Posiblemente el efecto que más condiciona las propiedades bacteriostáticas/bactericidas de los subproductos sea la propia composición de los mismos. En este sentido, son muchos los estudios que destacan la capacidad antimicrobiana de los compuestos terpénicos y flavonoides presentes en frutas cítricas (Espina et al, 2011; Viuda-Martos et al, 2008; Burt, 2004). Se trata de compuestos localizados mayoritariamente en la piel y semillas de las frutas y su composición es variable dependiendo de la variedad. Son compuestos lipídicos responsables de las propiedades aromáticas de los productos cítricos, además poseen propiedades antimicrobianas de interés para la industria alimentaria y farmacéutica (Sobrino-López et al, 2006; Quintavalla et al, 2002).

Dichas propiedades antimicrobianas, han sido testadas tanto frente a bacterias Gram positivas como Gram negativas siendo especialmente eficaces frente a las Gram negativas, como en este caso *S. typhimurium* y *E. coli* O157:H7 (Raybaudi-Massilia et al, 2009). Sin embargo, hasta la fecha el mecanismo responsable de la actividad antimicrobiana de los terpenos y los flavonoides no está totalmente claro.

La hipótesis generalmente establecida afirma que los componentes hidrófobos de los aceites esenciales tienen capacidad para romper los componentes lipídicos de la membrana y las mitocondrias de las bacterias por lo que se ocasiona la liberación del contenido celular (Trípoli et al, 2007).

Entre las principales condiciones que favorecen estas acciones se encuentran la baja temperatura y el bajo pH (Burt, 2004). Los aceites esenciales más frecuentes en los productos cítricos son la naringina y la neohesperidina. La tabla 4 muestra la composición mayoritaria de aceites esenciales presentes en cada uno de los subproductos estudiados. Aunque el contenido en aceites esenciales presentes en la mandarina, se diferencia escasamente del obtenido para la naranja, la actividad antimicrobiana de la mandarina puede ser debida a la interacción sinérgica de otros constituyentes presentes en cantidades menores (Tiwari et al, 2009).

Tabla 4. Distribución porcentual de terpenos presentes en aceites esenciales de limón, naranja y mandarina procedentes de España (Adams, 2001).

Compuestos	Porcentajes (%)		
	Limón	Mandarina	Naranja
Mirceno	0.84	0.73	0.92
Limoneno	59.10	74.38	85.50
γ-Terpineno	9.66	--	--
Carvona	0.06	1.87	0.65

Los resultados obtenidos en el presente estudio evaluando capacidad antimicrobiana de subproductos cítricos frente a *S. typhimurium* y *E coli* O157:H7, coinciden con los resultados obtenidos por Espina et al, 2011 trabajando con frutas cítricas. Sin embargo, tendencias actuales apuntan a la búsqueda de simbiosis específicas [sustancia antimicrobiana-patógeno objetivo-condiciones de exposición] que resulten específicamente eficaces bien individualmente, (p.e. prolongando la vida útil de productos pasteurizados), o bien combinados con otras técnicas de conservación de alimentos, pensando en tratamientos más suaves, consiguiendo sinergias en inactivación. Es en este sentido, en el que la posible utilización de subproductos cítricos encuentra una potencial cabida, no sólo desde un punto de vista de calidad, utilizando estos ingredientes como aditivos saborizantes y aromatizantes, sino desde un punto de vista de seguridad alimentaria, como medida de control adicional frente a microorganismos de riesgo.

CONCLUSIONES

Este trabajo ha estado centrado en el aprovechamiento de subproductos de frutas cítricas de gran consumo; naranja, limón y mandarina, como posibles ingredientes naturales con propiedades antimicrobianas, y considerando además su carácter orgánico y difícil degradabilidad, dicho aprovechamiento reduciría los problemas medioambientales de las empresas productoras.

Los resultados obtenidos demuestran que los tres subproductos cítricos poseen propiedades antimicrobianas efectivas frente a *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* O157:H7 en las condiciones de temperatura y concentraciones ensayadas, siendo un 5% (p/v) la concentración más efectiva para todos los subproductos.

Los resultados han demostrado que *S. typhimurium* posee una mayor sensibilidad a las propiedades antimicrobianas de los subproductos cítricos en comparación con *E.coli* O157:H7, alcanzándose reducciones de 8 y 1.6 ciclos logarítmicos, respectivamente.

El subproducto que mayor capacidad antimicrobiana presenta es la mandarina, tanto por su carácter bacteriostático como bactericida.

La adición de estos subproductos cítricos resulta de interés en el caso de productos refrigerados, en las situaciones de ligero abuso (10°C) o de ruptura absoluta de la cadena de frío (22°C), ya que actúan como medida adicional de control del crecimiento de los microorganismos estudiados.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo no hubiera podido llevarlo a cabo sin la inestimable colaboración de muchas personas que con sus conocimientos y su apoyo. En primer lugar, quiero agradecer a mis dos directores de tesis; María Dolores Rodrigo Aliaga y Antonio Martínez López, por darme la oportunidad de colaborar con ellos durante estos meses. A María Consuelo Pina-Pérez, tutora experimental de la tesina, le agradezco especialmente su inestimable ayuda y recomendaciones a lo largo de desarrollo de la tesina. A todos los compañeros del laboratorio 206 (Nieves, Alejandro, Clara, Sofía y María). Agradecer a mis amigos de la carrera y del master por todo su apoyo desde el primer momento, aun estando muchos de ellos en la distancia. Por último, agradecer a mi familia y especialmente a mis padres por todo el apoyo y cariño desde siempre. Sinceramente, gracias a todos.

REFERENCIAS

- Adams, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadruple mass spectroscopy. 2001. Illinois: Allured Publishing Corporation.
- Alali W.Q., Mann D.A, Beuchat L.R. 2012. Viability of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in delicatessen salads and hummus as affected by sodium content and storage temperature. *Journal of Food Protection*, 75(6): 1043-1056.
- Aruoma O.I., Stephen Coles L., Landes B., Repine J.E. 2012. Functional benefits of ergothioneine and fruit- and vegetable- derived nutraceuticals: Overview of the supplemental issue contents. *Preventive Medicine*, 54(1):S4-S8.
- Arvanitoyannis S. y Varzakas H. 2008. Fruit/Fruit Juice Waste Management: Treatment Methods and Potential Uses of Treated Waste. *Waste Management for the Food Industries*:569–628.
- Bajpai V.K., Kwang-Hyun B., Kang S.C. 2012. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45: 722-734.
- Bär W., Både-Schumann U., Krebs A., Cromme L. 2009. Rapid method for detection of minimal bactericidal concentration of antibiotics. *Journal of Microbiological Methods*, 77(1). 85-89.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. *International Journal of Food Microbiology*. 94(3):223-253

- Dembitsky V.M., Poovarodom S., Leontowicz H., Leontowicz M., Vearasilp S., Trakhtengerb S., Gorinstein S. 2012. The multiple nutrition properties of some exotics fruits: Biological activity and active metabolites. *Food Research International*, 44:1671-1701.
- Espina L., Somolinos M., Lorán S., Conchello P., García D., Pagán R. 2011. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22: 896-902.
- Guillier L., Nazer A.I., Dubois-Brissonnet F. Growth Response of *Salmonella typhimurium* in the Presence of Natural and Synthetic Antimicrobials: Estimation of MICs from Three Different Models. *Journal of Food Protection*, 70(10): 2243-2250.
- Gracia R.A. 2004. Evolución de la Industria Agroalimentaria Española en las dos últimas décadas. *Economía Industria*, 355(6): 197-200.
- Gabriel A. A., Nakano H. 2010. Responses of *E.coli* O157:H7, *L. monocytogenes* 1/2 c and *Salmonella enteritidis* to pH, a_w and temperature stress combinations. *Food Control*, 21:644-650.
- Hamm M.W., Bellows A. C. 2003. Community Food Security and Nutrition Educators. *Journal of Nutrition Education and Behavior*, 35(1): 37-43.
- Igual M., García-Martínez E., Camacho M.M., Martínez-Navarrete N. 2013. Jam processing and storage effects on β -carotene and flavonoids content in grapefruit. *Journal of Functional Foods*. 5(2): 736-744.
- Kneafsey M., Dowler E., Lambie-Mumford H., Inman A., Collier R. 2013. Consumers and food security: Uncertain or empowered?. *Journal of Rural Studies*. 29:101-112.
- Matyjek E., Turlejska H., Pelzner U., Szponar L. 2005. Actual situation in the area of implementing quality assurance systems GMP, GHP and HACCP in Polish food production and processing plants. *Food control*, 16:1-9.
- Ladaniya M.S. 2008. Nutritive and medicinal value of citrus fruits. *Citrus Fruit: Biology, Technology and Evaluation*. 501-504
- Mañas P., Pagán R., Raso J., Condón S. 2003. Predicting thermal inactivation in media of different pH of *Salmonella* grown at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 87: 45-53.
- Martín-Belloso O. 2009. Control of pathogenic and spoilage microorganism in fresh-cut fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3): 157-18.
- Martin-Luengo M.A., Yates M., Diaz M., Saez Rojo E., Gonzales Gil L. 2011. Renewable fine chemicals from rice and citric subproducts: Ecomaterials. *Applied Catalysis B: Environmental*, 106(3-4):488-493.
- Olaimat A.N., Holley R.A. 2012. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: A review. *Food Microbiology*, 32: 1-19.
- Oyarzabal O.A., Backert S., Nagaraj M., Miller R.S., Hussain S.K., Oyazarbal E.A. 2007. Efficacy of supplemented buffered peptone water for the isolation of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from broiler retail products. *Journal of Microbiological Methods*, 69(1).129-136.
- Pina-Pérez M.C., Martínez-López A., Rodrigo D. 2012. Cinnamon antimicrobial effect against *Salmonella typhimurium* cells treated by pulsed electric fields (PEF) in pasteurized skim milk beverage. *Food Research International*, 48 : 777-783.
- Quintavalla S., Vicini L. 2002. Antimicrobial food packaging in meat industry. *Meat Science*, 62:373-380.
- Raybaudi-Massilia R.M., Mosqueda-Melgar J., Martín-Belloso O. 2009. Antimicrobial activity of essential oils on *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli*, and *Listeria innocua* in Fruit Juices. *Journal of Food Protection*, 69(7): 1579 -1586.
- Raso J., Barbosa-Cánovas G. 2003. Nonthermal Preservation of Foods Using Combined Processing Techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(3):265-285.
- Shapiro R.S., Cowen L.E. 2012. Thermal Control of Microbial Development and Virulence: Molecular Mechanisms of Microbial Temperature Sensing. *American Society for Microbiology*, 3(5): 212-238.

- Saucedo-Reyes D., Marco-Celdrán A., Pina-Pérez M.C., Rodrigo D., Martínez-López A. 2009. Modeling survival of high hydrostatic pressure treated stationary-and exponential-phase *Listeria innocua* cells. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*,10(2):135-141.
- Sobrino-López Á., Raybaudi-Massilia R., Martín-Belloso O. 2006. High-intensity pulsed electric field variable affecting *staphylococcus aureus* inoculated in milk. *American Dairy Science Association*, 89: 3739-3748
- Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O'Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P.J. 2009. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.57:5987-6000.
- Trípoli E., La Guardia M., Giammanco S., Di Majo D., Giammanco M. 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 204:466-479.
- Viuda-Martos M., Ruiz-Navajas Y., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J. 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus Lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils. *Food Control*,19: 1130-1138.
- Yang S., Yu R., Chou C. 2001. Influence of holding temperature on the growth and survival of *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* and the production of staphylococcal enterotoxin in egg products. *International Journal of Food Microbiology*, 63: 99-107.

RECURSOS WEB

- http://www.ine.es/inebmenu/mnu_agricultura.htm (Consulta 22 marzo de 2013)
- <http://www.valbio.es> (Consulta: 31 mayo de 2013)