

Efecto de la combinación de la acidez con cáscara de xoconostle/temperatura de proceso para el control de *Listeria monocytogenes*

Magallón-Alvaro, A.¹, García-Barrientos, R.² y Minor-Pérez, H.¹

¹División de ingeniería Química y Bioquímica, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Av. Tecnológico s/n Esq. Av. Carlos Hank González (Av. Central), Col. Valle de Anáhuac, C. P. 55210, Ecatepec de Morelos, Estado de México, México, E-mail: hminorperez@yahoo.com.mx.

²Laboratorio de Procesos Biotecnológicos. Universidad Politécnica de Tlaxcala. Av. Universidad Politécnica No. 1, San Pedro Xalcaltzinco, Tepeyanco, CP 90180 Tlaxcala, México.

Palabras Clave: cáscara de xoconostle (*Opuntia matudae*), conservadores naturales, *Listeria monocytogenes*

Introducción

Las tunas ácidas o xoconostles (*Opuntia matudae*) se distinguen de entre otras tunas por su cáscara gruesa, elevada acidez, piel delgada y semillas en el centro del fruto. Estos frutos son una rica fuente de vitaminas y minerales, como Ca, K, además de azúcares, fibra dietética, ácido ascórbico y compuestos como polifenoles, carotenoides, betacianinas y betaxantinas [1]. Algunas investigaciones han reportado que este fruto tiene diversos compuestos biológicos, como los compuestos fenólicos, que pueden tener la capacidad de inhibir el crecimiento microbiano, incluyendo microorganismos patógenos presentes en los alimentos [2,3]. Es de aquí donde surge la idea de utilizar el xoconostle como conservador alimentario, combinado de manera sinérgica con otros factores como la temperatura y el pH. Para evaluar la eficacia de los conservadores naturales en alimentos, es necesario realizar pruebas *in vitro* [4]. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto combinado de la cáscara de xoconostle (CX) a pH 3, 5, 7 y 9 sobre el control de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 a una temperatura de subpasteurización de 55°C para su posible aplicación en el diseño de alimentos y tratados a estas temperaturas.

Metodología

***Preparación de la cáscara de Xoconostle.** Las muestras de cáscaras se sometieron a un proceso de secado a 40°C en un horno de charolas (Felisa FE-294AD, México) durante 48 h. Las CX fueron molidas en una licuadora y tamizadas con una malla número 40 para obtener un tamaño de partícula promedio final de 0.42 mm.

****Listeria monocytogenes* NCTC 11994 y condiciones de crecimiento**

Listeria monocytogenes NCTC 11994 pertenece a la colección microbiana de la Universidad de Murcia, España. Durante este estudio la cepa se conservó en crioviales a -20°C. Ésta se sembró por estría cruzada en medio TSAYE (Tryptic Soy Broth, Bioxon, México) suplementado con 0.6% de extracto de levadura (w/v Bioxon, México) y 1.5% de agar bacteriológico (w/v Bioxon, México). La muestra se incubó a 37°C por 24 h. Una colonia de la bacteria control se utilizó para inocular en caldo TSBYE (Tryptic Soy Broth, Bioxon, México) con 0.6% de extracto de levadura (w/v Bioxon, México) y se incubó a 37°C por 12 h. Se tomaron 100 µL de este pre-cultivo para ser inoculados en 5 mL de TSBYE y la muestra se incubó durante 24 h 37°C para obtener el cultivo de estudio.

**Análisis microbiológico* El cultivo de *Listeria monocytogenes* se diluyó en agua peptonada y se vació un volumen de 100 μL en tubos Eppendorf con 900 μL de una solución amortiguadora de citrato-fosfato a los diferentes valores de pH. Los valores de las variables fijas analizadas fueron: pH 3, 5, 7 y 9, concentraciones de CX: 0 g/mL, 0.05 g/mL y 0.1 g/mL y temperatura de 55°C (TSP). Todos los tratamientos se mantuvieron en agitación a 350 rpm en un vórtex (Labnet, EUA) durante 1 min. Las cuentas microbianas se realizaron a los tiempos de 0 min, 7.5 min, 15 min, 22.5 min y 30 min. Se empleó la técnica de la gota [5] para cuantificar las poblaciones microbianas.

**Análisis estadístico.* Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) y una comparación múltiple de medias con la prueba de Duncan, utilizando el paquete estadístico SAS System, Windows™ Versión 6.12, USA. Además, de una prueba de comparación de medias con la prueba de Bonferroni con el paquete estadístico de GraphPad PRISM, Versión 5.00, 2017. San Diego, California, USA. En esta prueba se utilizó un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

Resultados y discusión

Los resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) (Tabla 1, 2 y 3) muestran que el modelo lineal propuesto tuvo un efecto significativo ($P<0.0001$) sobre la variable respuesta (Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994). Los modelos describen la influencia de los factores investigados en forma independiente: tiempo (T) y la concentración de CX, y el efecto de las interacciones (T*CX). Se observó un efecto significativo del tiempo (T), concentración de cáscara de xonostle (CX) y la interacción T*CX en los tratamientos evaluados (Tabla 2). El coeficiente de determinación para el modelo lineal de estudio a 55°C indica que el 0.73 de la variación total en la respuesta no puede ser de estudio explicado por el modelo desarrollado. Los valores F_0 para los parámetros de cada modelo fueron útiles para explicar el grado de significancia de los efectos de las variables y sus interacciones (Tabla 2). A la temperatura de 55°C el parámetro que tuvo un mayor efecto significativo fue el tiempo. El segundo parámetro más significativo fue la concentración de la CX. Esto significa que los cambios de concentración de CX a la temperatura de 55°C tienen un efecto significativo de inhibición sobre *Listeria monocytogenes* NCTC 11994. Este comportamiento puede ser explicado debido a que conforme la cepa control es expuesta durante mayor tiempo a la temperatura de 55°C posiblemente tenga daño de estructuras celulares como su membrana, lo cual provoca inactivación. Las Figuras 1a, b, c y d muestran gráficamente los resultados sobre inhibición de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 con la combinación de las variables de estudio, a una temperatura de 55°C. En la Figura 1a (pH 3), se observa una disminución de Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, de acuerdo con los datos de la Tabla 1, esta disminución sólo fue significativa ($P<0.001$) para las comparaciones (0 g/mL vs 0.1 g/mL) a los 7.5 y 15 min y (0.05 g/mL vs 0.1 g/mL) a los 7.5 y 15 min. La Figura 1b (pH 5), muestra una reducción de la concentración bacteriana, la Tabla 1, indica que esta disminución es significativa ($P<0.001$) en las comparaciones de CX (0 g/mL vs 0.05 g/mL) al tiempo de 15 y 30 min y (0 g/mL vs 0.1 g/mL) a los 15 y 30 min. En la Figura 1c (pH 7) existe una reducción de Log UFC/mL y la Tabla 1, marca esta reducción como significativa ($P<0.001$) para las comparaciones de los tratamientos (0 g/mL vs 0.05 g/mL) al tiempo de 15, 22.5 y 30 min y (0 g/mL vs 0.1 g/mL) a los 15, 22.5 y 30 min. La Figura 1d (pH 9) marca una disminución en la concentración de Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994, la Tabla 1 indica esta disminución como significativa ($P<0.001$) para la comparación de los tratamientos

(0 g/mL vs 0.05 g/mL) en 30 min, (0 g/mL vs 0.1 g/mL) a los 7.5 y 30 min y (0.05 g/mL vs 0.1 g/mL) al tiempo de 7.5 min.

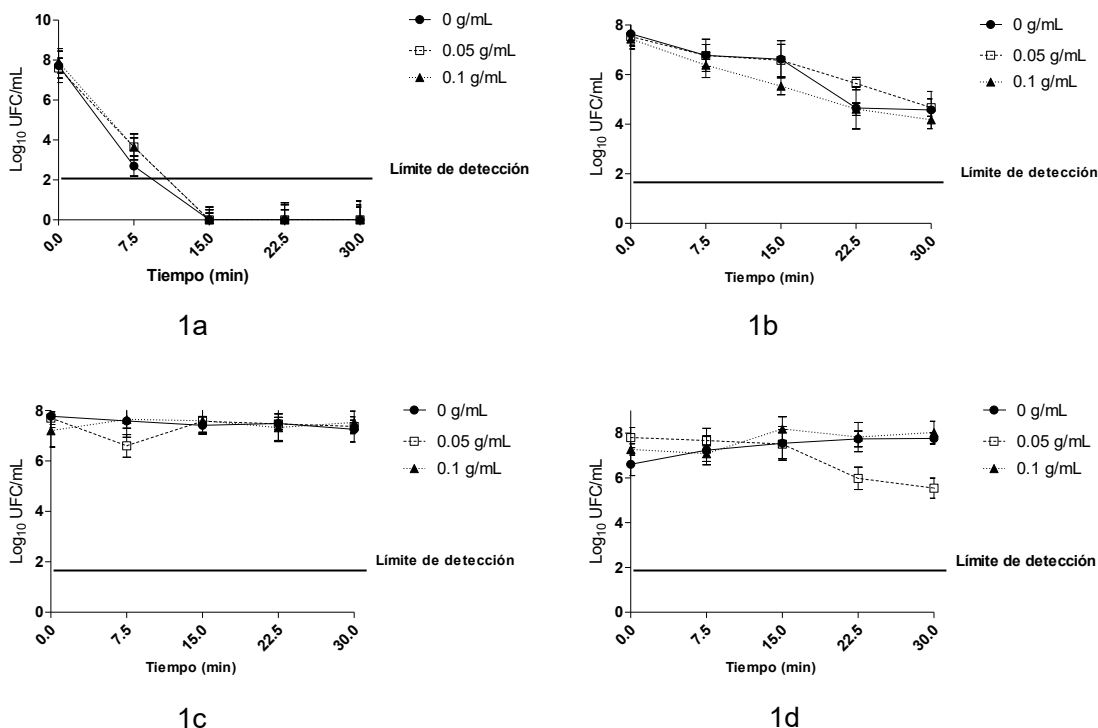


Figura 1. Efecto de la combinación del pH (1a: pH3, 1b: pH5, 1c: pH7 y 1d: pH9), y la concentración de cáscara de xoconostle (CX, *Opuntia matudae*), (0, 0.05 y 0.1 g/mL) a una temperatura de 55°C sobre *Listeria monocytogenes*. (*) El límite de detección para la cuenta en placa es 2 ciclos logarítmicos.

Tabla 1. ANOVA para el efecto de las variables fijas: tiempo (0.0 min, 7.5 min, 15 min, 22.5 min y 30 min). Concentración de cáscara de xoconostle (0 g/mL, 0.05 g/mL y 0.1 g/mL) y pH (3,5,7 y 9) sobre la variable respuesta: Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 a 55°C.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	P > F
Modelo	59	824.67472009	13.97753763	138.74	0.0001
Error	60	6.04484550	0.10074742		
Total	119	830.71956559			
R-Square=	0.992723				

*Los valores de "P > F" menores que 0.050 indican que los parámetros evaluados son significativos

Tabla 2. ANOVA para el efecto de las variables fijas: tiempo (0. min, 7.5 min, 15 min, 22.5 min y 30 min). Concentración de cáscara de xoconostle (0 g/mL, 0.05 g/mL y 0.1 g/mL) y pH (3,5,7 y 9) y las interacciones sobre la variable respuesta: Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 a 55°C.

Fuente de variación	Valor de F	P > F
A-Tiempo	310.66	0.0001
B-Concentración de muestra	4.13	0.0209
C-pH	1606.02	0.0001
A*B	4.14	0.0005
A*C	156.53	0.0001
B*C	6.35	0.0001
A*B*C	6.96	0.0001

*Los valores de "P > F" menores que 0.050 indican que los parámetros evaluados son significativos

Tabla 3. Prueba de Duncan para el efecto de las variables fijas: tiempo (0.0 min, 7.5 min, 15 min, 22.5 min y 30 min). Concentración de cáscara de xoconostle (0 g/mL, 0.05 g/mL y 0.1 g/mL) y pH (3,5,7 y 9) sobre la variable respuesta: Log UFC/mL de *Listeria monocytogenes* a 55°C.

Tiempo (min)	Promedio de Log UFC/mL de <i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Prueba de Duncan*	Concentración de cáscara (g/mL)	Promedio de Log UFC/mL de <i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Prueba de Duncan*	pH	Promedio de Log UFC/mL de <i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	Prueba de Duncan*
0	7.49233	A	0.0	5.80923	A	7	7.32460	A
7.5	6.07079	B	0.1	5.65408	B	9	7.17737	A
15	5.35617	C	0.05	5.61703	B	5	5.93390	B
22.5	4.90304	D				3	2.33790	C
30	4.64488	E						

*Medias con la misma letra no son significativamente diferentes con una $\alpha = 0.05$

Tabla 1. Resumen de la prueba de Bonferroni para la comparación del efecto de la concentración de cáscara de xoconostle (CX) (0 g/mL, 0.05 g/mL y 0.1 g/mL) sobre la variable de respuesta: Log UFC/mL de la cepa de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 a 55°C.

Cepa control	Variables fijas	Tiempo (min)	Tratamientos a comparar con la prueba de Bonferroni	Valor de P	Significancia
--------------	-----------------	--------------	---	------------	---------------

<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC 11994	pH 3.0	0	0 g/mL vs 0.05 g/mL	$P>0.05$	ns
		7.5		$P>0.05$	ns
		15		$P>0.05$	ns
		22.5		$P>0.05$	ns
		30	0 g/mL vs 0.1 g/mL	$P>0.05$	ns
		0		$P>0.05$	ns
		7.5		$P<0.001$	***
		15		$P<0.001$	***
		22.5	0.05 g/mL vs 0.1 g/mL	$P>0.05$	ns
		30		$P>0.05$	ns
		0		$P>0.05$	ns
		7.5		$P<0.001$	***
	15	0 g/mL vs 0.05 g/mL	$P<0.001$	***	
	22.5		$P>0.05$	ns	
	30		$P>0.05$	ns	
	0		$P>0.05$	ns	
	pH 5.0	0 g/mL vs 0.05 g/mL	7.5	$P>0.05$	ns
			15	$P>0.05$	ns
			22.5	$P<0.01$	**
			30	$P>0.05$	ns
		0 g/mL vs 0.1 g/mL	0	$P<0.001$	**
			7.5	$P>0.05$	ns
			15	$P>0.05$	ns
			22.5	$P<0.01$	**
		0.05 g/mL vs 0.1 g/mL	30	$P>0.05$	ns
			0	$P<0.001$	***
			7.5	$P>0.05$	ns
			15	$P>0.05$	ns
	pH 7.0	0 g/mL vs 0.05 g/mL	22.5	$P>0.05$	ns
			30	$P>0.05$	ns
			0	$P>0.05$	ns
			7.5	$P>0.05$	ns
		0 g/mL vs 0.1 g/mL	15	$P<0.001$	***
			22.5	$P<0.001$	***
			30	$P<0.001$	***
			0	$P<0.001$	***
		0.05 g/mL vs 0.1 g/mL	7.5	$P>0.05$	ns
			15	$P>0.05$	ns
			22.5	$P>0.05$	ns
			30	$P>0.05$	ns
	pH 9.0	0 g/mL vs 0.05 g/mL	0	$P>0.05$	ns
			7.5	$P>0.05$	ns
			15	$P>0.05$	ns
			22.5	$P>0.05$	ns
		0 g/mL vs 0.1 g/mL	30	$P<0.001$	***
			0	$P>0.05$	ns
			7.5	$P<0.001$	***
			15	$P<0.001$	***
0.05 g/mL vs 0.1 g/mL		22.5	$P<0.001$	***	
		30	$P<0.001$	***	
		0	$P>0.05$	ns	
		7.5	$P<0.05$	ns	
	0 g/mL vs 0.05 g/mL	15	$P>0.05$	ns	
		22.5	$P>0.05$	ns	
		30	$P>0.05$	ns	
		0	$P>0.05$	ns	
	0 g/mL vs 0.1 g/mL	7.5	$P<0.001$	***	
		15	$P<0.001$	***	
		22.5	$P<0.001$	***	
		30	$P<0.001$	***	
	0.05 g/mL vs 0.1 g/mL	0	$P>0.05$	ns	
		7.5	$P>0.05$	ns	
		15	$P>0.05$	ns	
		22.5	$P>0.05$	ns	
	0 g/mL vs 0.05 g/mL	30	$P>0.05$	ns	
		0	$P>0.05$	ns	
		7.5	$P>0.05$	ns	
		15	$P>0.05$	ns	
	0 g/mL vs 0.1 g/mL	22.5	$P>0.05$	ns	
		30	$P>0.05$	ns	
		0	$P<0.001$	***	
		7.5	$P<0.001$	***	
	0.05 g/mL vs 0.1 g/mL	15	$P>0.05$	ns	
		22.5	$P>0.05$	ns	
		30	$P>0.05$	ns	
		0	$P>0.05$	ns	

ns: no significativo; *** altamente significativo

Conclusiones

En las condiciones experimentales evaluadas a pH 3,5,7 y 9 se encontró un efecto significativo sobre la inhibición de *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 y a la temperatura de 55°C en presencia de diferentes concentraciones de CX (g/mL). La mayor inhibición microbiana se observó a valores de pH

ácidos de 3, con reducción aproximada de 5 ciclos logarítmicos con respecto a una población inicial de 7.334 ciclos.

Referencias

- [1] Gallegos-Vázquez, C., Scheinvar, L., Núñez-Colín, C. A. & Mondragón-Jacobo, C. (2012). Morphological diversity of xoconostles (*Opuntia* spp.) or acidic cactus pears: a Mexican contribution to functional foods. *EDP Sciences, Cambridge University*, 67(2), 109-120. doi: <https://doi.org/10.1051/fruits/2012001174>.
- [2] Rafiq S., Kaul R., Sofi S. A., Bashir N., Nazir, F., Nayik, G. A. (2018). Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 17(4), 351-358. doi:10.1016/j.jssas.2016.07.006
- [3] Bahadur, B., Rajam, M. V., Sahijram, L., & Krishnamurthy, K. V. (Eds.). (2015). *Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement*. Springer.
- [4] Rodríguez-Sauceda, E. N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable: Ra Ximhai*, 7(1), 153-170. [//www.revistas.unam.mx/index.php/rxm/article/view/26675](http://www.revistas.unam.mx/index.php/rxm/article/view/26675)
- [5] Miles A. A. Misra S.S, Irwin J.O. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hyg*, 38, 732-749.