



**MASTER OFICIAL EN
SEGURIDAD Y BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIAS.
2006-2007**

TESIS DE MASTER,

**“ESTUDIO DE ESTABILIDAD
Y ALGUNAS PROPIEDADES TECNOLÓGICAS
DE PIGMENTOS SINTETIZADOS POR
Epicoccum nigrum”**

Mihaela Bleoju

Burgos, Septiembre de 2007

Tutora: M^a Luisa González San José

1. Introducción

El color es la primera sensación que se percibe de un alimento, y la que determina el primer juicio sobre su calidad. Es también un factor importante en el conjunto de sensaciones que aporta el alimento y tiende, a veces, a modificar subjetivamente otras sensaciones como el sabor y el olor. Gran parte de estos efectos está unido a que los consumidores esperan, exigen y prefieren colores determinados en alimentos específicos, además de esperar que éstos sean constantes entre lotes de fabricación, así como estables en el tiempo de conservación.

Los alimentos tienen su propio color debido a los pigmentos que contiene, por lo que en principio lo ideal es el mantenimiento de los pigmentos a lo largo del proceso tecnológico, o favorecer la formación de aquellos de interés para el producto final. Sin embargo esto no es siempre posible. Debe considerarse que muchas sustancias colorantes naturales presentes en los alimentos (ejemplo las clorofilas) son muy sensibles a los tratamientos utilizados en el procesado (calor, acidez, luz, oxígeno, etc.) destruyéndose parcialmente, mientras que otros se forman en distinta cantidad y tipo (ejemplo las melanoidinas) dependiendo de las condiciones del proceso y de la composición inicial de la matriz tratada. Además, la variabilidad natural de las materias primas induce grandes modificaciones del color. Todo ello hace que el color homogéneo de los alimentos, sobre todo de los procesados, solo pueda obtenerse por modificación, al menos parcial, recurriendo a la adición de colorantes alimentarios que intensifiquen, homogenicen, e incluso modifiquen el color, consiguiendo que el alimento sea aceptado por el consumidor.

Teniendo en cuenta todo eso los especialistas de la industria alimentaria tratan ajustar las pérdidas de color debidas a las transformaciones que pasan durante el procesado y las técnicas de conservación, añadiendo compuestos que pueden aportar un color apropiado.

Los colorantes alimentarios han tenido y tienen un papel muy importante en la producción de los alimentos. Históricamente se sabe que usan desde antiguo, habiendo vestigios ó documentación al respecto desde al menos el siglo V. En el devenir histórico se han usado tanto colorantes naturales como sintéticos, si bien en la actualidad la tendencia más aceptada por consumidores e incluso abalada legalmente es la de uso de pigmentos naturales.

La tendencia al empleo de colorantes naturales proviene entre otras cosas de que muchos de ellos, además de sus acciones tecnológicas, son compuestos antioxidantes con efectos saludables, en algunos casos muy bien estudiados. Así la industria ha tendido a usarlos también como respuesta a la demanda del consumidor de alimentos no solo seguros y sanos, sino también con claros beneficios saludables, (Poudlove, 1994). De este modo, la legislación ha sido adaptada de tal modo que el uso de pigmentos o colorantes dentro de la industria alimentaria quede regulado de tal modo que se evite el uso fraudulento de la publicidad sobre las propiedades funcionales ó saludables.

El continuo crecimiento del mercado de pigmentos para el uso en alimentos, bebidas, cosméticos y detergentes, hace necesario desarrollar nuevas estrategias de producción entre las que se encuentra la búsqueda de nuevas fuentes de pigmentos. En este sentido, aunque se conoce desde antiguo que los microorganismos son productores de una amplia variedad de pigmentos, es relativamente reciente su utilización como fuente de colorantes alimentarios (Downham et al., 2000). Según (Mc Dougall, 2002) algunos microorganismos constituyen una de las fuentes más novedosas y menos estudiadas, ofreciendo grandes posibilidades para la obtención de nuevas estructuras y actividades biológicas. Además, su uso presenta también otras ventajas como el crecimiento rápido y producción intensiva.

Entre los microorganismos destacan los hongos, que al presentar un alto crecimiento y desarrollo, permiten la obtención de metabolitos secundarios, por medio de procesos biotecnológicos, lo cual ha generado una alta expectativa en su uso (Henry, 1996).

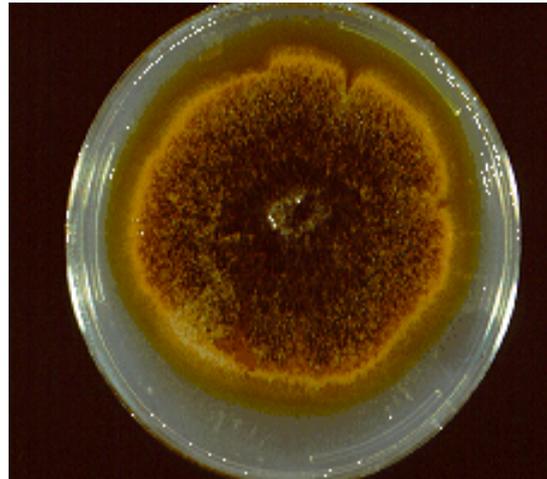
El *Epicoccum nigrum* es uno de los hongos con capacidad de síntesis de compuestos colorantes, y se ha propuesto como una buena fuente de colorantes alimentarios (Bahrim et al., 2005a). El género *Epicoccum* contiene una sola especie. Es un hongo mitospórico distribuido extensamente y aislado comúnmente del aire, del suelo, de una gran variedad de plantas e insectos, de la piel humana, de textiles, etc. Se considera saprofito, en algunos casos se presenta como oportunista, siendo un invasor secundario de plantas (William et al., 1976). Las colonias jóvenes (figura 1a) son amarillo-anaranjadas, o anaranjadas-rojizas. Sus colonias son de crecimiento rápido y forman un micelio suave. Al esporular presenta color negrozco debido a los agregados de conidios que son fácilmente visibles (Figura 1 b y 2).

Se cultiva fácilmente, lo que le hace muy atractivo a nivel industrial. Crece tanto en medio líquido (Tuttobello et al., 1969), como en semisólidos, y a diversos valores de actividad de agua (Tuttobello et al., 1969, Bahrim et al., 2005b y Pascualli et al. 1999).

Los primeros datos bibliográficos que hacen referencia a los pigmentos de este hongo datan de inicios del siglo pasado. En 1911, Naumann describió la producción de pigmentos rojos cuando este hongo crecía sobre raíces. Los pigmentos eran soluble en etanol y metanol, y muy poco solubles en agua. Posteriormente, unos 50 años más tarde, se identificaron algunos de los pigmentos presentes en el micelio y en el medio de cultivo, fueron: β -caroteno, γ -caroteno, rodoxantina, torularodina y licopeno (Gribanovski Sassu y Floppen, 1967), flavipina con propiedades antifúngicas (Bamford et al., 1961), así como polímeros marrones de tipo ácido "húmico" (Martín et al., 1967 y Foppen, 1969).



a)



b)

Figura 1. Colonia de *Epicoccum nigrum* sobre el medio con mosto de malta con agar: a) colonia joven y b) colonia madura



Figura 2. Conidias de *Epicoccum nigrum*

Desde los años 60 pasaron otros casi 40 años más hasta que se publicasen nuevos datos relativos a este hongo. Los estudios mas recientes se han centrado en las aplicaciones de los colorantes de *Epicoccum nigrum* en el control biológico de frutas (Larena et al., 2004), así como en su acción sinérgica con *Xanthophyllomyce dendrorhus* favoreciendo la síntesis de astaxantina (Echavarri et al., 2004), un potente antioxidante.

Teniendo como referencia todos estos datos, el Grupo de Investigación de la Dra. Bahrim G. del área de Biotecnología de los Alimentos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de los Alimentos de la Universidad "Dunarea de Jos", Galati, (Rumania) comienzan a trabajar con este hongo para obtener colorantes amarillos-anaranjados (Bahrim et al., 2004). Este grupo además ha estudiado medios de cultivo económicos y alternativos, como las melazas de las azucareras, con el doble fin de reducir costes de producción y rentabilizar subproductos de la

industria alimentaria. Sus estudios han evidenciado que la obtención de pigmentos es viable y rentable, y que además estos están presentes tanto en el micelio, como en el medio, alcanzándose rendimientos de hasta 800 mg de pigmentos por gramo de materia seca. En la actualidad este grupo está interesado en conseguir el permiso de uso alimentario para estos pigmentos.

Entre otras cosas, para que el complejo colorante sea aceptado como colorante alimentario es necesario que sea saludable. En lo que a la toxicidad se refiere, hasta el día de hoy, no hay casos documentados de infecciones o alergias causadas por *Epicoccum nigrum* en los seres humanos o animales (Fassatiouva, 1986), pero aún queda mucho por hacer y documentar.

Por otra parte, el interés tecnológico del complejo depende de su estabilidad en las condiciones de procesado y almacenamiento típicas de la industria alimentaria, así como de su solubilidad y capacidad para difundir y mezclar con las matrices alimentarias.

Para estudiar la estabilidad del extracto colorante se debe conocer cual son los factores que influyen la estabilidad de los pigmentos. Teniendo en cuenta que *Epicoccum nigrum* produce una mezcla compleja de carotenoides y flavonoides en ratio 20:1 (Bahrim et al., 2005 b), los factores que mas influirán en la estabilidad del complejo son los ampliamente descritos en la bibliografía relativos a la estabilidad de los citados pigmentos y que son la temperatura, el pH del medio, la actividad del medio, la presencia de agentes oxidantes y antioxidantes, y la exposición a la luz, como principales.

Se ha descrito que los pigmentos de *E. nigrum* son bastante estables cuando se mantienen en el medio de cultivos, pero cuando se extraen con solventes orgánicos se vuelven mucho más sensibles, así como cuando se añaden a los alimentos y estos se calientan (Delgado-Vargas et al., 2000).

La degradación de los pigmentos se debe fundamentalmente a reacciones de oxidación, que pueden ser enzimáticas o no. En los alimentos procesados, el mecanismo de oxidación es complejo y depende de muchos factores. Los pigmentos pueden autooxidarse por reacción con oxígeno atmosférico a velocidades que dependen de la luz, el calor y la presencia de agentes prooxidantes. Debido a estos procesos, p.e. los carotenoides, tras perder su color y sus propiedades beneficiosas para la salud, dan lugar a compuestos aromáticos que en algunos casos son agradables (té, vino) y en otros no (zanahoria deshidratada).

La mayoría de los pigmentos son muy susceptibles de oxidarse y por ello, en general, se comportan como antioxidantes. Su propia inestabilidad se corresponde con una alta protección de otros compuestos frente a agentes oxidantes (Martín et al., 1999).

La influencia de la temperatura en la estabilidad de los pigmentos es clara, tanto en ausencia de agua, reacciones anhidras, como en su presencia, productos hidratados, la temperatura siempre actúa como acelerador de la reacción de degradación.

En relación con los alimentos, la estabilidad térmica se debe estudiar en diferentes intervalos de temperatura, empezando por la temperatura de refrigeración, hasta las temperaturas altas específicas a los procesos tecnológicos (pasteurización, esterilización) hay que tener en cuenta que los estudios “*in vitro*” no demuestran fehacientemente los cambios que los pigmentos sufrirán durante el procesado del alimento (Khachik et al., 1992).

La acción intensa de la luz sobre los pigmentos induce su ruptura con la consiguiente formación de compuestos incoloros de bajo peso molecular. Estas reacciones tienen mucha importancia en la industria alimentaria ya que los pigmentos pierden, además de su función biológica, su color característico, (Schwartz, 1998).

Aunque los pHs propios de los alimentos no son muy extremos, si es conveniente que los pigmentos sean resistentes a grandes rangos de pH. Lo habitual es que tanto pHs ácidos como alcalinos provoquen isomerizaciones *cis/trans* de ciertos dobles enlaces, reagrupamientos, desesterificaciones, etc., lo cual debe ser tenido en cuenta a la hora de manipular los pigmentos.

A parte de las consideraciones relativas a la estabilidad, debe tenerse en cuenta que el aprovechamiento tecnológico de un producto depende también de su extrahibilidad. La extracción de los pigmentos de los tejidos vegetales suele hacerse con solventes orgánicos. Los solventes empleados para el proceso dependen de la naturaleza de los pigmentos y de su polaridad.

El gran número de compuestos colorantes en la naturaleza y su amplia variedad estructural hace imposible la descripción de una metodología general para su extracción (Schiedt, 1998), aunque pueden darse algunas pautas generales. Así, los solventes más empleados para la extracción de carotenoides y pigmentos fenólicos son: acetona, metanol, etanol, mezclas de ellos o mezclas con agua. Para facilitar el contacto entre la matriz y el solvente, es importante realizar una reducción de tamaño intentando romper las paredes celulares, además conviene facilitar el contacto y la difusión dinámicas por ejemplo por agitación. El extracto obtenido se puede filtrar o centrifugar y el filtrado o el sobrenadante representan el extracto útil, que podrá/deberá ser purificado o no dependiendo de su composición.

Un estudio previo (González-Sanjosé et al., 2006) permitió poner a punto un proceso de extracción adecuado para este producto y sus pigmentos, siendo el etanol el solvente orgánico que dio los mejores resultados.

Objetivo

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar la estabilidad de extractos acuosos y etanolicos del colorante amarillo-anaranjado sintetizado por *Epicoccum nigrum*, así como evaluar algunas propiedades tecnológicas, como la capacidad antioxidante y la antimicrobiana.

2. Materiales y Métodos de análisis

1. Materiales

- **Bioproducto fúngico.** – Polvo tipo Koji obtenido tras el secado y molido del medio de cultivo en SSF de la cepa seleccionada MIUG2.11 de *Epicoccum nigrum*. Producto cedido por el equipo la Dra. Bahrim G. del área de Biotecnología de los Alimentos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de los Alimentos de la Universidad "Dunarea de Jos", Galati, (Rumania)

- **Reactivos.**- agua Milli-Q, etanol (96%), ácido clorhídrico, hidróxido sódico, metanol, éter etílico, dicloro-metano, acetona, acetato de etilo, 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato), tiosulfato potasio, acetato sódico, ácido acético, 2, 4, 6-tris-2-piridil-s-triazina, cloruro férrico, 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, resina AXD₂.

- **Cepas test para el estudio de la actividad antimicrobiana.**- *Epicoccum nigrum* MIUG 2.15, *Aspergillus niger* (An), *Aspergillus glaucus* (Ag), *Fusarium sp.*(F), *Geotricum candidum* (Gc), *Candida mycoderma* (Cm), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Rodothorula* (R), *Bacillus subtilis* (Bs), *Sarcina* (S).

- **Aparatos.**- Columna cromatográfica de vidrio 25x0.46 cm, rotavapor Heidolph WB 2000; espectrofotómetro Beckman DU 650, centrifuga Kontron modelo Centrikon T-124, agitador Agimatic- E, lámpara Philips L565, lámpara UV.

2.- Métodos

2.1 Extracción de los pigmentos producidos por el hongo

La extracción se realizó siguiendo el protocolo establecido por (Bahrim y Soptica, 2004) usándose como extractantes agua Milli-Q y etanol 96%, para obtenerse así un extracto etanólico y otro acuoso.

0.05 g polvo tipo Koji se maceraron con 10 mL del solvente en agitación continua durante una hora. La extracción se realizó en oscuridad y a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de maceración las mezclas se centrifugaron a 11000 gss durante 10 minutos a 20°C. Los sobrenadantes constituyeron los extractos objeto de estudio.

La decisión de usar estos extractantes se basó en la solubilidad de los pigmentos, comprobada en un estudio previo, y en la compatibilidad de ambos con las posibles aplicaciones alimentarias.

2.2 Evaluación de la estabilidad de los extractos

Se evaluó la estabilidad de los extractos a diversos pHs: 3,0 / 6,0 / 9,0, que se alcanzaron por adición de pequeñas cantidades de disoluciones de hidróxido sódico y de ácido clorhídrico

1M. Además, se estudió el efecto de la temperatura, manteniéndose los extractos a 5°C, 20°C y 60°C. También se hizo un estudio parcial de la estabilidad ante la luz, ensayándose la estabilidad en exposición a la luz solar, a la luz UV de 256 nm, y a la oscuridad.

Por impedimentos logísticos no fue posible estudiar todas las combinaciones posibles de los tres factores bajo estudio. Así se optó por las siguientes combinaciones:

- Estabilidad a temperatura ambiente: se ensayan los tres pHs, y el efecto de la oscuridad la luz solar natural y la UV.
- Estabilidad a temperatura de refrigeración (cámaras a 5°C): los tres pHs y el efecto oscuridad y luz solar de lámpara Philips L565 (24h).
- Estabilidad a 60°C: los tres pHs en oscuridad (estufa) y luz solar natural (baño arena termostatzado).

Los ensayos se realizaron por triplicado, es decir existían tres extractos y tres replicas de cada extracto en cada una de las condiciones indicadas. Para las representaciones gráficas se consideraron valores medios y la desviación estándar. En su caso, se aplicó el test LSD para detectar diferencias significativas.

La estabilidad se monitorizó durante 21 días, registrándose el espectro de absorción UV-VIS (200-600 nm) de cada extracto, y anotándose la longitud de onda de máxima absorción en cada momento y la absorción a 430nm, longitud de máxima absorción de los extractos recién obtenidos.

2.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos

La evaluación del efecto antimicrobiano se realizó por el **método disco-placa de cultivo**, que se basa en la difusión radial del/os principio/s activos, desde discos de papel estériles ($\Phi=1\text{cm}$) que han sido previamente empapados con los extractos del complejo colorante. Si las sustancias tienen efecto antimicrobiano se evita el crecimiento de un determinado microorganismo en la zona de difusión formándose un halo visible y medible (figura 3). Se considera que la actividad antimicrobiana esta directamente relacionada con el diámetro de la zona de inhibición del crecimiento de la cepa analizada.

La evaluación se llevó a cabo con las diferentes cepas de bacterias, levaduras y hongos que se han indicado previamente, empleándose para cada tipo de microorganismo un medio de cultivo adecuado para ellos. En función de ensayos previos realizados se decidió usar un medio base de mosto de malta y agar para levaduras y hongos, y para las bacterias se optó por una mezcla de pasta de carne y agar. El tiempo de incubación fue de una semana a 25°C.

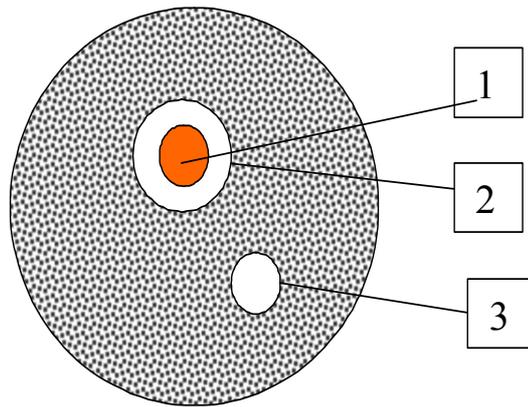


Figura 3: Ensayo disco-placa. 1.- Disco empapado en extracto. 2.- Halo de inhibición del crecimiento microbiano. 3.- Disco empapado en el extractante (control).

De nuevo por razones de logística hubo que limitar los ensayos y en este caso sólo se estudiaron los extractos etanólicos que en principio fueron los más ricos en pigmentos y por tanto cabría esperar que fueran los de máxima actividad microbiana.

2.4 Aislamiento de los pigmentos de los extractos

Atendiendo a datos publicados se parte de la idea de que los pigmentos producidos por *E. nigrum* son una mezcla de pigmentos de naturaleza carotenoide y fenólica. Considerando la distinta polaridad de ambos grupos de pigmentos se intentaron separar aprovechando las técnicas cromatográficas de columna que habitualmente se usan para la separación de los pigmentos fenólicos (Di Stefano y Cravero, 1990). Así los extractos etanólicos previa eliminación del etanol y redisolución en agua, se fraccionaron por cromatografía en columna sobre resina XAD₂ usando como eluyentes de forma consecutiva éter de petróleo, acetato de etilo y metanol.

Las fracciones separadas se llevaron a sequedad en un rotavapor trabajando a temperatura controlada siempre menor de 35° C. Posteriormente, se redisolvieron en agua Milli-Q. La separación se comprobó evaluando el espectro de absorción UV-Vis de cada fracción.

2.5 Determinación de la capacidad antioxidante de las fracciones de pigmentos

De cara a posibles aplicaciones de los pigmentos objeto de estudio en la industria alimentaria se consideró interesante evaluar la actividad antioxidante de cada fracción por separado, ya que presumiblemente cada una de ellas debe tener una afinidad mayor por medios diferentes.

La capacidad antioxidante de las fracciones se evaluó aplicando métodos químicos relacionados con el poder reductor puro como el método FRAP, y con la capacidad de captar ó bloquear diversos radicales (scavenger) como los métodos ABTS y DPPH. Los tres son métodos SET (de transferencia de e⁻), pero en los dos últimos puede existir cierta participación de la

transferencia de H, considerándose también como métodos HAT secundarios o marginales (Sánchez- Moreno, 2002).

ABTS (Millar y Rice –Evans, 1997)

Este método se fundamenta en la decoloración del radical catión ABTS⁺ (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfonato). El radical se genera por adición de un agente oxidante K₂O₈S₂ (2.5 mM). Este radical presenta un máximo de absorción espectrofotométrica a 734 nm. En presencia de un agente oxidante se produce una decoloración del compuesto y por tanto la disminución de la absorbancia.

Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox, antioxidante de referencia universal, a través de la correspondiente recta de calibrado.

DPPH (Bran –Williams y los compañeros, 1995)

El reactivo utilizado es el radical estable DPPH (2,2-difenil-1-picrylhidrazil) que tiene su máximo de absorbancia a 517 nm. En presencia de un agente oxidante el radical desaparece reduciéndose la absorción. Así, el efecto protector del antioxidante es proporcional a la absorción que se evita que se pierda.

Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox, antioxidante de referencia universal, a través de la correspondiente recta de calibrado.

FRAP (Benzie y Strain, 1996)

Este método se fundamenta en la capacidad de reducir el Fe (III) hasta Fe (II), mediante la reacción: $Fe^{3+}TPTZ + 1e^{-} \longrightarrow Fe^{2+}TPTZ$

Así, el donante de electrones (el antioxidante) propicia la formación de un compuesto de color azul con un máximo de absorción a 593 nm, siendo la medida espectrofotométrica a esa longitud de onda proporcional a la capacidad reductora de la muestra.

Los resultados se expresan en equivalentes de Fe (II), usando la recta de calibrado correspondiente obtenida desde una sal de Fe (II) de referencia.

3.- Resultados y discusión

3.1.- Estabilidad de los extractos

En primer lugar se quiere indicar que los espectros de absorción de los extractos acuosos y etanólicos fueron muy parecidos presentando esencialmente diferencias cuantitativas y no cualitativas.

Los extractos recién obtenidos presentaron máximo de absorción entorno a 430nm correspondiente al color amarillo-ligeramente anaranjado que presentan.

Se detectó cierto efecto del pH sobre el color de los extractos, sobre todo sobre la intensidad de color (absorbancia máxima alcanzada por cada extracto), que disminuyó al hacerlo el pH. Inicialmente se pensó que estas variaciones podrían ser asociadas al uso de ácido clorhídrico como agente acidulante. Este, al ser un ácido fuerte, podría haber inducido ciertos daños en los pigmentos. Este hecho se descartó por dos motivos: 1º) el efecto fue dispar en extractos acuosos y etanólicos; 2º) el uso de otros ácidos como fosfórico y fórmico produjo efectos similares.

Se evaluó y se comparó la evolución de los extractos entre si considerando los cambios de la absorbancia a 430nm durante el almacenamiento, usando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

En general los resultados mostraron que la estabilidad de los extractos fue dependiente del extractante, del pH, de la temperatura y de la luz (figuras 4 y 5).

3.1.1.- Efecto del medio sobre la estabilidad de los extractos

En general, se puede afirmar que los extractos etanólicos fueron más estables que los extractos acuosos, con la salvedad de los extractos alcalinos (figuras 4).

Estos resultados eran los esperados ya que en general la extracción con alcohol paraliza o reduce los riesgos de alteraciones enzimáticas, así como es un medio menos propicio para el desarrollo de reacciones degradativas.

A pesar de la estabilidad conferida por el etanol, en las condiciones más desfavorables de temperatura se llegaron a producir pérdidas superiores al 90%.

3.1.2.- Efecto del pH sobre la estabilidad de los extractos

En general se obtuvo una mejor estabilidad de los extractos cuando estos fueron ajustados a pH alcalinos (figura 4), observándose descensos bruscos de la intensidad colorante de muchos de los extractos ajustados a pH ácidos (figura 5).

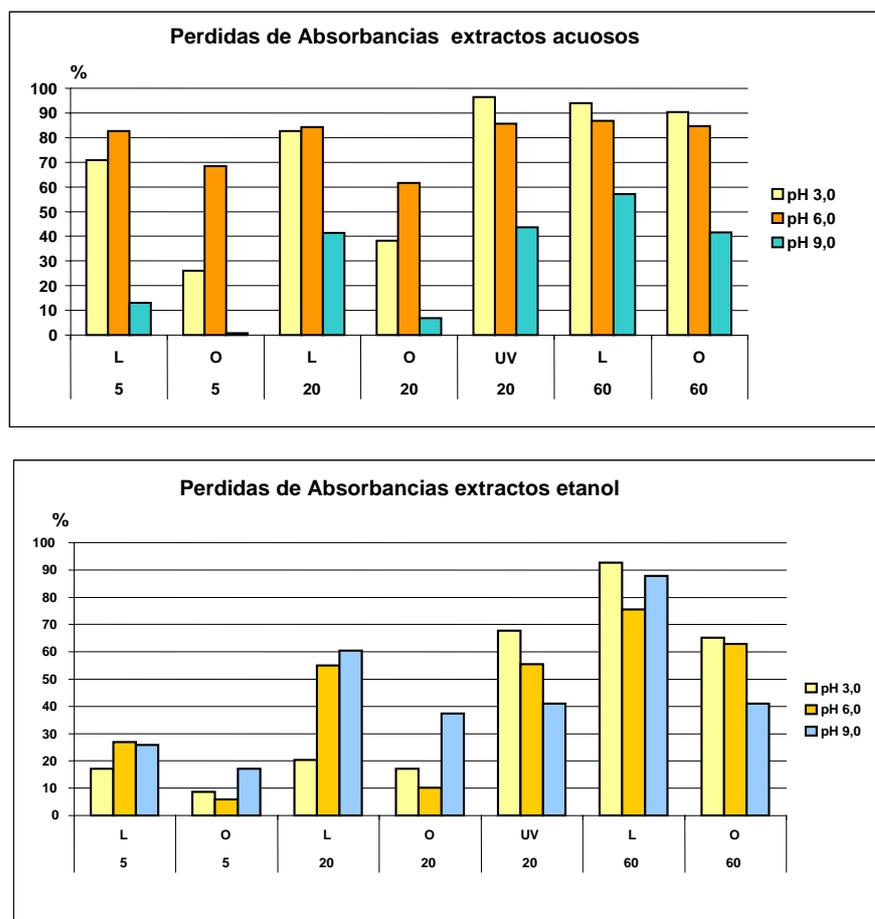


Figura 4. Pérdidas de color de los extractos acuosos e etanólicos tras 21 días de almacenamiento, expresadas como % de pérdida de absorbancia a 430nm. L = luz solar; O = oscuridad; UV = luz UV de 256nm.

Las mayores pérdidas de color a pH ácido sorprendieron ya que lo más habitual y lo más citado en la bibliografía es que los pH ácidos estabilizan los pigmentos, generalmente porque reducen la posibilidad de desarrollo de reacciones degradativas.

Cabría la posibilidad de que al menos parcialmente estos resultados estuvieran influenciados por la agresividad del ácido clorhídrico, que se pondría de manifiesto durante un almacenamiento más o menos prolongado. Este ácido puede producir la hidrólisis de algunos de los enlaces internos de los pigmentos, como la hidrólisis de los enlaces ester entre azúcares y ácidos de los pigmentos flavonoideos, y otros similares de las estructuras carotenoides. El efecto “alterante” del ácido, no pudo ser comprobado y queda pendiente de estudio.

Algunas pruebas iniciales no pusieron de manifiesto problemas de este tipo y además al ser muchos los trabajos que usan éste ácido como agente acidulante sin que describan ningún efecto negativo colateral, no se esperaba este tipo de interferencia y por ello se usó este ácido.

Unido al efecto protector del etanol ya comentado se observó que los extractos etanólicos ácidos fueron más estables que sus homólogos acuosos. Además, a temperaturas de

refrigeración, e incluso en algunos del almacenamiento a temperatura ambiente, sufrieron pérdidas de color muy reducidas..

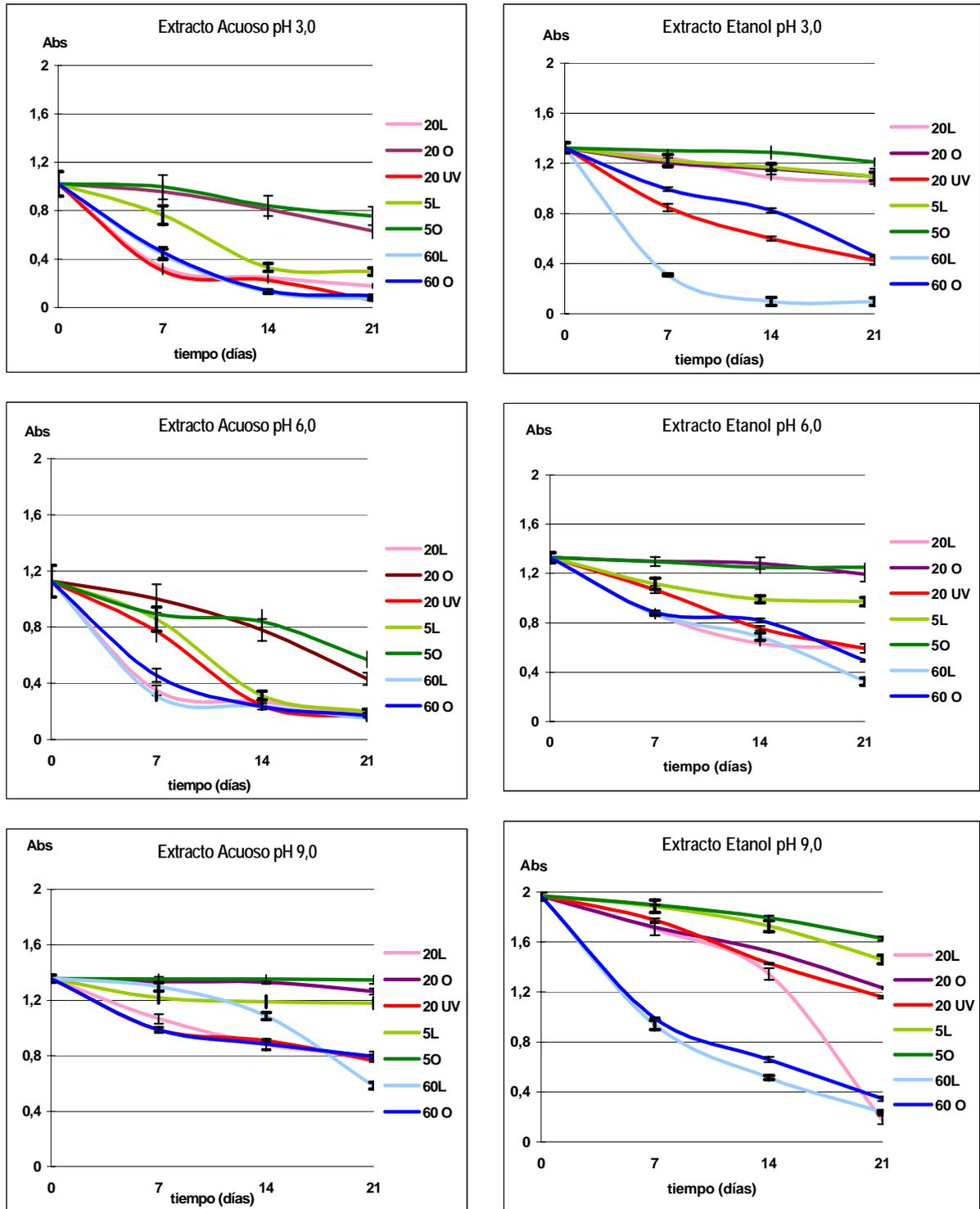


figura 5: Evolución de las absorbancias a 430nm de los extractos acuosos y etanólicos en las condiciones estudiadas. L = Luz solar; O = Oscuridad; UV= luz ultravioleta 256nm. 5, 20 y 60 las temperaturas ensayadas.

Se detectó efecto pH sobre las variaciones del espectro de absorción detectadas y que se evidencian fácilmente al analizar las variaciones de la longitud de onda de absorción máxima de cada extracto (figura 6) que permanecieron estables sólo para los pH más altos.

3.1.3.- Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de los extractos

Los resultados encontrados fueron bastante razonables, con la salvedad de la poca estabilidad detectada de los extractos acuosos almacenados en refrigeración, que es muy reducida a pH ácidos y sobre todo en presencia de luz (figura 4).

En general las pérdidas de color se produjeron más lentamente en los extractos refrigerados, siendo rápidas y en muchos casos muy bruscas cuando el almacenamiento fue a 60°C.

Estos datos indican que los pigmentos aislados son termodegradables lo que podría significar cierta limitación en sus aplicaciones tecnológicas. Por otra parte su estabilidad a baja temperatura los hace adecuados para su uso en productos que se manipulen, conserven y consuman en frío.

3.1.4.- Efecto de la luz sobre la estabilidad de los extractos

Como era esperable los extractos conservados en oscuridad presentaron mayor estabilidad que sus homólogos conservados bajo la acción de la luz, lo que está asociado a la fotosensibilidad de la mayoría de los pigmentos naturales.

De nuevo los extractos acuosos fueron menos estables o más sensibles a la acción de la luz que los alcohólicos.

Los extractos no fueron muy estables a la exposición continua a la luz ultravioleta, aunque en muchos casos la estabilidad fue similar a la mostrada para la luz solar.

Lo expuesto hasta este momento puede resumirse en que las pérdidas de color más altas se registraron a las temperaturas más altas, en presencia de luz y a pH ácidos, llegando a alcanzarse valores de pérdidas mayores del 90%. Sin embargo, a la temperatura de refrigeración y en ausencia de luz, las pérdidas fueron mínimas, oscilando entre el 5- 17% en las condiciones más favorables (5°C y oscuridad).

De todo ello puede inferirse que el hongo *Epicoccum nigrum* produce una mezcla de pigmentos de estabilidad media, aunque ésta depende claramente de las condiciones de extracción y de almacenamiento, hecho que deberá tenerse claramente en cuenta si se quieren aplicar en la industria alimentaria.

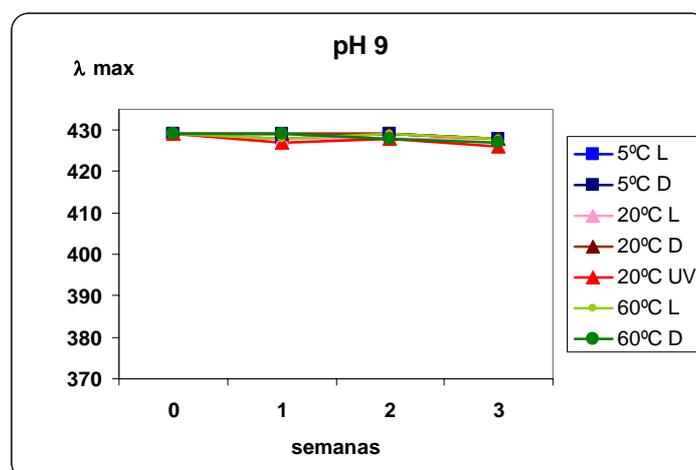
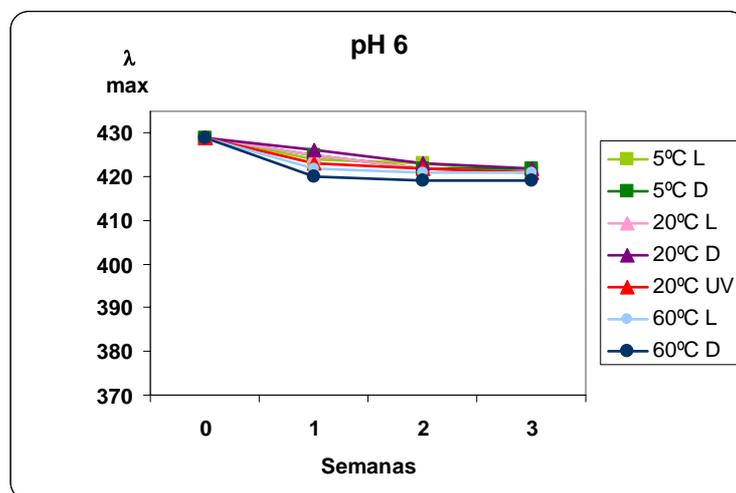
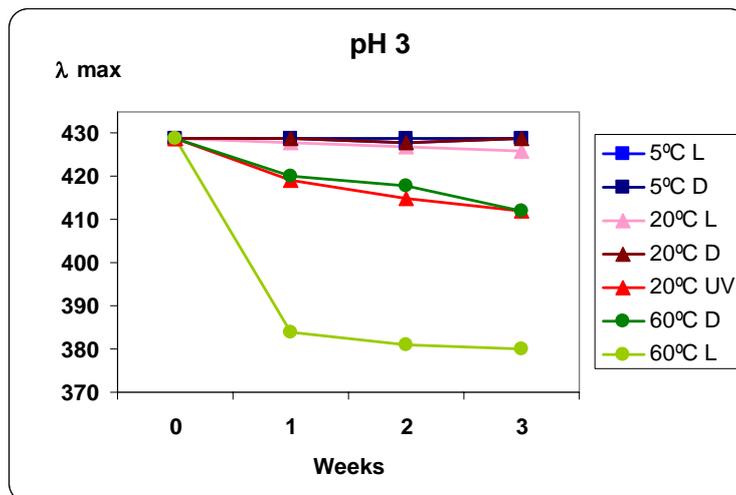


Figura 6. Evolución de la Longitud de onda de absorción máxima en cada extracto durante el almacenamiento

3.2.- Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos

Los resultados de la actividad o efecto antimicrobiano se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Grado de inhibición del crecimiento de las diferentes cepas producido por la difusión de los compuestos presentes en los extractos etanólicos

Cepa test	Grado de inhibición del crecimiento	Observaciones
<i>Aspergillus niger</i>	+++	Zona de inhibición d= 2.5 cm
<i>Aspergillus glaucus</i>	+++	Zona de inhibición d=2.5 cm
<i>Fusarium sp.</i>	- ¿?	Inhibición sólo bajo la superficie del disco
<i>Geotricum candidum</i>	- ¿?	Inhibición sólo bajo la superficie del disco
<i>Candida mycoderma</i>	+++	Zona de inhibición d= 2.2 cm
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	---	No presenta zona de inhibición
<i>Rodothorula glutinis</i>	***	Efecto sinérgico
<i>Bacillus subtilis</i>	++-	Presenta inhibición moderada = 1.7 cm
<i>Sarcina flava</i>	---	No presenta zona de inhibición

Observaciones:

El diámetro de los discos estériles empleados fue de 1.0 cm;

+++ Inhibición del crecimiento y esporulación; ++ inhibición media del crecimiento; + inhibición baja; -¿? Inhibición débil y dudosa: --- no se detectó inhibición.

Los discos empapados en etanol solo mostraron inhibición bajo su superficie y no siempre total.

En general destaca que los extractos presentaron acción antimicrobiana ante *Bacillus subtilis*, así como se detectó acción antifúngica para *Aspergillus niger* y *glaucus*, así como para *Candida mycoderma*, siendo menos intensa para la última. El efecto antimicrobiano puede deberse a la presencia del compuesto flavipina en el complejo colorante, que según la bibliografía es sintetizado por *E. nigrum* y del que ya se sabe que tiene efecto antifúngico.

Por todo lo contrario, llamó la atención el efecto sinérgico sobre el crecimiento de *Rodothorula glutinis*.

Cabría la posibilidad de obtener mejores resultados con extractos más concentrados, pero este hecho no fue comprobado por limitaciones de tiempo.

3.3 Separación de los pigmentos sintetizados por *Epicoccum nigrum*

Tal y como ya se ha comentado los estudios publicados sobre la caracterización del complejo colorante de este hongo (Bahrim y Soptica, 2005 b) indican que *Epicoccum nigrum* produce carotenoides y flavonoides en altas concentraciones (ratio 20:1). La polaridad y solubilidad de estos dos grupos de pigmentos permite poder separarlos para obtener fracciones diferenciadas por cromatografía en columna.

El objetivo de esta separación es poder dar a cada grupo de pigmentos su destino más adecuado en función de sus propiedades o características propias que pueden conferirles distintos intereses tecnológicos. Es por ello que también se evaluaron algunas de estas propiedades sobre las fracciones aisladas.

Los espectros de absorción de los extractos correspondientes a cada fracción indican que se consiguió separar, al menos a grosso modo, dos grupos diferenciados de pigmentos (figura 7), los que se aíslan en las fracciones de éter etílico y de acetato de etilo, y los que son arrastrados por el metanol.

Aunque el espectro UV-Vis no es suficiente para determinar los tipos de compuestos presentes en cada caso, se intuye que las primeras fracciones albergan los pigmentos de naturaleza fenólica (máxima absorción entorno a 280 nm) y la de metanol los carotenoides (máxima absorción en el visible).

3.3.1.- Capacidad antioxidante (CAO) de los extractos fraccionados

Se evaluó la CAO por la repercusión tecnológica de la misma ya que sería interesante combinar en un aditivo la capacidad colorante, la estabilidad y la preservación, no sólo a nivel de microorganismos si no también a nivel químico bloqueando reacciones oxidativas de deterioro del alimento.

Los resultados relativos a la evaluación de la CAO (tabla 2), ponen claramente de manifiesto que la fracción más activa fue la de metanol, que presentó los valores más altos en los 3 métodos ensayados. En general las tres fracciones dieron valores de CAO satisfactorios y las diferencias cuantitativas pueden deberse a la presencia de compuestos distintos en cada fracción, y/o a la diferencia de concentración de pigmentos en cada fracción. Estos factores tienen que ser estudiados en futuros estudios.

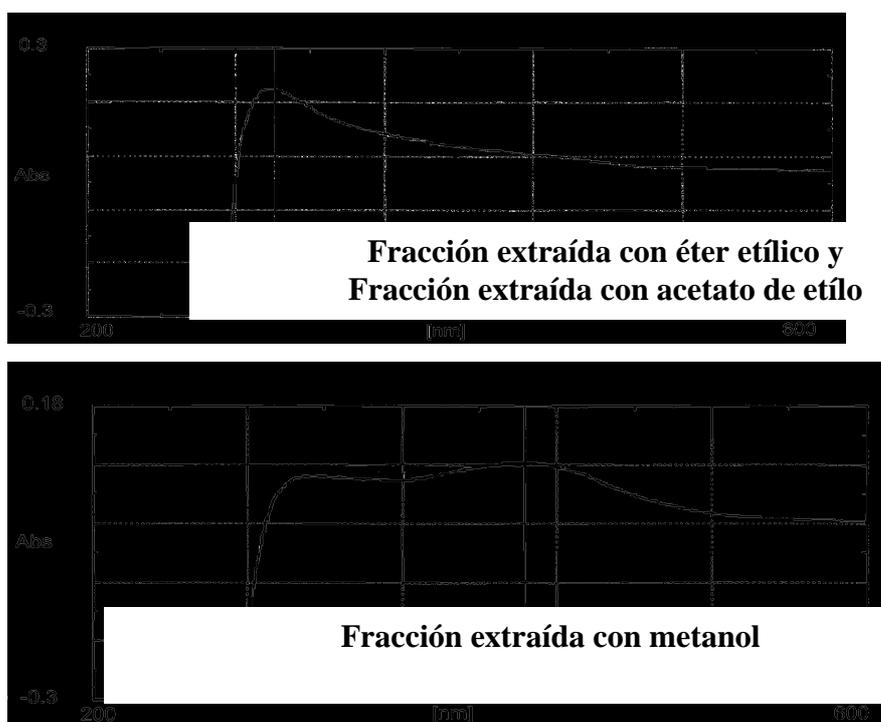


Figura 7. Espectros de absorción de las fracciones aisladas por cromatografía en columna sobre resina AXD₂

Tabla 2. Datos experimentales sobre la actividad antioxidante

Fracción	Método de análisis		
	ABTS, $\mu\text{g trolox}$	DPPH, $\mu\text{g trolox}$	FRAP, mM Fe^{2+}
Éter etílico	1,754 \pm 0,115 b	1,188 \pm 0,1744 b	0,883 \pm 0,071 b
Acetato de etilo	1,344 \pm 0,146 a	0,928 \pm 0,1042 a	0,658 \pm 0,0612 a
Metanol	2,575 \pm 0,241 c	1,283 \pm 0,1562 c	1,348 \pm 0,012 c

Valores de la misma columna con distinta letra son estadísticamente distintos para un α de 0,05 según el test LSD, (n = 9).

Conclusiones:

La cepa seleccionada de *Epicoccum nigrum* presenta ciertas posibilidades para llegar a ser una nueva fuente de colorantes naturales de uso alimentario, que además de capacidad colorante presenten propiedades tecnológicas adicionales de interés. Sin embargo la puesta a punto de este aprovechamiento debe pasar entre otras cosas:

- Por una mejor caracterización de los pigmentos sintetizados por el hongo.
- Comprobar su inocuidad.
- Ver como se comporta en la matriz alimentaria.

Para una extracción exitosa se recomienda siempre que sea posible proceder a la misma en medio alcohólico y evitar los pHs demasiado ácidos.

Agradecimientos

La autora de este trabajo quiere expresar su agradecimiento a la Dra. Bahrim G. del área de Biotecnología de los Alimentos de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de los Alimentos de la Universidad "Dunarea de Jos", Galati, (Rumania), por su asesoría y dirección durante el tiempo de mi formación en ese Centro, así como por permitirme iniciar mi actividad investigadora en un tema tan interesante como son los pigmentos naturales.

Bibliografía

- Bahrim G., Rapeanu G., Soptica F., Croitor N., Alexandru A., Bulancea M. (2005 a). Plant and fungal flavonoides as potential functional food aditives, *Innovations in Traditional Foods*. 25-28 oct: 1155-1158, *INTRAFood*.
- Bahrim G., Socaciu C. (2005 b). Making a safe and functional food colorant by fungal sources, *Roumanian Biotechnological Letters*, **10**.
- Bahrim G., Şoptică F. (2004). Correlative effect of solid media on yellow pigment genesis at an *Epicoccum nigrum* sp. Strain, *Roumanian Biotechnological Letters*, **9** (4):1757-1763.
- Bamford P.C., Norris G.L.F., Ward G. (1961). Flavipin production by *Epicoccum spp.*, *Transaction of the British Mycological Society*, 44: 354- 356.
- Benzie I.F., Strain F. (1997). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measurement of antioxidant power: the frap assay, *Analytical Biochemistry*.
- Brand-Williams, Cuvelier M.E., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*.
- Delgado-Vargas F., Jimeney A. R., Paredes-Lopez O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains – characteristics, biosynthesis, processing and stability, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40 (3): 173–289.
- Di-Estefano, R. y Cravero, M.C., Frazionamento dei polifenoli dei vini rossi, *L'Enotecnico*, 26:99-106, 1990.
- Downham A., Collins P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium, *International Journal Food Science Technology*, 35: 5–22.
- Echavarri C., Johnson A. (2004). Stimulation of astaxanthin formation in the yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous* by the fungus *Epicoccum nigrum*, *FEMS yeast research*, 4: 511-519.
- Fassatiova O. (1986) Moulds and filamentous fungi, *Technical Microbiology*, Elsevier, 189-190.
- Foppen F.H. (1969). *Ann. Ist. Super Sanita*, 5: 439
- Gribanovski- Sassu O., Foppen F.H. (1968). Lipids produced by *Epicoccum nigrum* in submerged culture, *Biochemistry Journal*, 106:97.
- González-SanJosé M.L., Bleoju M.M., Bahrim G. y Muñoz P. (2006). Studies about the extraction and colorant potential of the pigment produced by the fungi *E. nigrum*, *Pigments in Food a challenge to life sciences*, pag: 191-193.
- Henry B.S. (1996). Natural food colors, in *Natural Food Colorants*, cap. 2: 40–79.
- Khachik F., Beecher G.R., Goli M.B., Lusby W. R. (1992). Separation and quantification of carotenoids in foods, *Methods Enzymology*, 213: 347– 359.
- Larena I., De Cal A, Melgarejo P. (2004). Solid substrate production of *Epicoccum nigrum* conidia for biological control of brown rot on stone fruits, *International Journal of Food Microbiology*, 94:161–167.
- MacDougall D. (2002). Colour in food, *Improving quality*, Woodhead Publishing.

- Mari M., Torres R., Casalini L., Lamarca N., Mangrin J.F., Lichou J., Larena I., De Cal M.A., Melgarejo P., Usall J. (2007). Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoccum nigrum* and physico-chemical treatments, *Journal of Science Food and Agriculture*, 87:1271–1277.
- Martin H.D., Jäger C., Ruck C., Schmidt M., Walsh R., Paust J. (1999). Anti- and prooxidant properties of carotenoids, *Journal of Praktical Chemistry*, 341:302–308.
- Martin J.P., Richards S. J., Haider K. (1967). Properties, decomposition and binding action in soil of humic acid synthesized by *Epicoccum nigrum*, *Process Soil Science Society American*, 31: 657- 662.
- Neeser J. R., German J.B. (2004). Bioprocesses and biotechnology for functional foods and nutraceuticals, *Marcel Dekker, Inc.*, New York.
- Pascual S., Malgarejo P., Magan N. (1999). Production of the fungal biocontrol agent *Epicoccum nigrum* by solid substrate fermentation: effect of water activity on accumulation of compatible solutes, *Mycopathologia*, 146: 83–89.
- Poudlove, R. K. (1994). *The Science and Technology of Foods*, Forbes Publications
- Reyes-González G., Franco-Correa M. (2006). Producción biotecnológica de sabores, pigmentos y aromas a partir de hongos miceliales y levaduras, *Universitas Scientiarum, Revista de la Facultad de Ciencias*, Vol. 11, Nº 2:23-30.
- Rojas A., Hernández L. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 35: 275-283.
- Sanchez- Moreno C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food Science and Technology International*, Vol. 8, No. 3: 121-137.
- Schiedt K. (1998). Isolation and analysis, *Carotenoids, Vol. 3: Biosynthesis*, cap. 7: 285–355.
- Schwartz S. J. (1998). Pigment analysis, *Food analysis: Introduction to chemical analysis of foods*, 261.
- Tuttobello L., Foppen F.H., Carilla A. (1969) Growth and pigmentation of *Epicoccum nigrum* in submerged culture, *Applied Microbiology*, No. 6, Vol. 17: 847-852.
- William R. B., Burge W.R., Buckley L.J., Sullivan J.D., Mc Grattan C.J. (1976) Isolation and Biological Activity of the Pigments of the Mold *Epicoccum nigrum*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 24, No. 3: 555-559.