



Estudio del potencial antimicrobiano de melanoidinas de pan sobre bacterias alterantes y patógenas

A stack of four clear glass petri dishes, some overlapping, used for microbiological studies.

CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

2018/2019

Autor: Marcos Montalvo Martínez

Tutoras: Ana María Diez Maté
Beatriz Melero Gil



Universidad de Burgos
Facultad de Ciencias

**VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL
TRABAJO FIN DE GRADO**

**GRADO EN: Ciencia y Tecnología de los Alimentos
CURSO: 2018/2019**

Dña. Ana María Diez Maté y Dña. Beatriz Melero Gil informan de que el alumno D Marcos Montalvo Martínez, ha realizado el trabajo "Estudio del potencial antimicrobiano de melanoidinas de pan sobre bacterias alterantes y patógenas" bajo su tutela, y considera que la Memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO *

(*) En caso negativo, indíquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Fdo.: Ana María Diez Maté

Burgos, a 8 de Julio de 2019

Fdo.: Beatriz Melero Gil

ARCHIVO DE LAS MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN RIUBU

D Marcos Montalvo Martínez, Dña. Ana María Diez Maté y Dña. Beatriz Melero Gil, autor y tutoras del Trabajo Fin de Grado autorizan que esta memoria sea transferida al Repositorio Institucional de la Universidad de Burgos (RIUBU) en la siguiente modalidad:

Acceso restringido

Acceso abierto Acceso abierto con periodo de embargo

Fdo.: Marcos Montalvo Martínez

Fdo.: Ana María Diez Maté

Fdo.: Beatriz Melero Gil

Índice

Resumen	1
Abstract	1
Introducción	1
Objetivos	4
Material y métodos	5
• Melanoidinas	5
• Microorganismos estudiados	5
• Procedimiento	6
Estado microbiológico de las melanoidinas	6
Estudio de la capacidad antimicrobiana de las melanoidinas.....	6
Resultados y discusión	10
• Estado microbiológico de las melanoidinas	10
• Estudio de la capacidad antimicrobiana de las melanoidinas	10
<i>Bacillus cereus</i>	11
<i>Pseudomonas putida</i>	12
<i>Lactobacillus brevis</i>	13
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	14
<i>Weissella viridescens</i>	15
<i>Salmonella</i> spp.	16
<i>Escherichia coli</i>	17
<i>Enterococcus faecalis</i>	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	19
<i>Listeria monocytogenes</i>	20
<i>Clostridium perfringens</i>	21
Resumen de resultados.....	23
Conclusiones	24
Bibliografía	25

Resumen

Las melanoidinas, productos resultantes de la reacción de Maillard, pueden presentar propiedades interesantes para la industria alimentaria, por ello este trabajo se centra en el estudio de su potencial antimicrobiano. Para este estudio se utilizó la técnica de microdilución en caldo mediante el cual se pusieron en contacto 8 microorganismos patógenos y 3 alterantes con las melanoidinas y posteriormente se realizó el recuento en placas de agar y el seguimiento del crecimiento en un espectrofotómetro de placas. Los resultados mostraron que las melanoidinas tienen distinto efecto para cada bacteria, obteniéndose un efecto bactericida total en 4 de las 11 bacterias analizadas. Por tanto, las melanoidinas obtenidas a partir de subproductos de la industria panadera, presentan un importante potencial para la industria alimentaria pudiendo ayudar a mejorar la seguridad alimentaria de los productos alimentarios.

Abstract

The melanoidins, products resulting from the Maillard reaction, can present interesting properties for the food industry, so this work focuses on the study of its antimicrobial potential. For this study, the broth microdilution technique was used, whereby 8 pathogenic and 3 altering microorganisms were contacted with the melanoidins and subsequently the count was carried out on agar plates and the growth monitoring was carried out in a plate spectrophotometer. The results showed that the melanoidins have different effect for each bacterium, obtaining a total bactericidal effect in 4 of the 11 bacteria analyzed. Therefore, the melanoidins obtained from subproducts of the baking industry, present an important potential for the food industry and can help to improve the food safety of food products.

Introducción

En la industria alimentaria existe una gran variedad de **aditivos alimentarios**, que son las sustancias que se añaden a los alimentos para mantener o mejorar su inocuidad, sabor, frescura, textura o aspecto. Estas sustancias se pueden obtener de forma natural (de plantas, animales o minerales) o producirse sintéticamente, pero su empleo solo está justificado si responde a una necesidad tecnológica definida y no induce a error al consumidor. Para su empleo, tienen que ser evaluados por distintos organismos (OMS y FAO) que comprueben la inocuidad de estos y den el visto bueno para la utilización de aquellos que no presentan riesgos sanitarios apreciables para los consumidores, además de determinar las dosis específicas de empleo y los alimentos concretos sobre los que se pueden emplear. El problema de estos aditivos para la salud viene cuando se ingieren en cantidades superiores a las recomendadas, lo que se ve favorecido hoy en día por la gran cantidad de productos procesados que los contienen [1].

Esto ha supuesto un nuevo reto para la industria alimentaria, que está buscando alternativas naturales que cumplan las mismas funciones y no aporten efectos negativos para la salud. De entre todas las sustancias que se están estudiando para mejorar esta situación, encontramos las **melanoidinas**, que son unos compuestos poliméricos largos producidos en la reacción de Maillard por medio de la combinación de un grupo aldehído o cetona de azúcares reductores y los grupos amino de aminoácidos o proteínas cuando son sometidos a altas temperaturas. Las melanoidinas se forman en el paso final de esta reacción de pardeamiento no oxidativo, y dan lugar a aromas, sabores y coloraciones agradables en algunos alimentos como es el pan, en concreto en la corteza de este, que es la capa más externa y la que está sometida a mayores temperaturas [2]. En este caso, se han obtenido de la corteza de pan, con el fin de estudiar si tienen función tecnológica como conservante.

El empleo de este tipo de productos que no contienen aditivos artificiales o apuestan por ingredientes lo más naturales posibles es denominado "**clean label**". Esta apuesta busca una alternativa natural a conservantes artificiales como sorbatos, sulfitos, y/o nitratos y nitritos, como podría ser el caso de las melanoidinas, si presentaran capacidad para eliminar los microorganismos alterantes y patógenos que deterioran los productos y afectan a su seguridad alimentaria. Estudios anteriores han mostrado como otros ingredientes naturales han conseguido ya este efecto, por ejemplo, algunas moléculas proteicas como la lactoferrina (proteína de la leche), lisozima o lactoperoxidasa (enzimas) o distintos tipos de péptidos más pequeños. La principal causa por la cual no se emplean estas sustancias es su coste, ya que no son fáciles de obtener, por lo que hay que buscar fuentes de materia prima baratas. También se han empleado algún tipo de ácidos orgánicos o aceites esenciales para este fin [3].

Existe una gran cantidad de microorganismos alterantes y patógenos que influyen en la calidad y seguridad de los alimentos. Las bacterias utilizadas para el experimento han sido escogidas por ser una representación de aquellas bacterias que más problemas o incidentes causan en la industria alimentaria por estar asociadas a los alimentos:

-*Bacillus cereus*: este microorganismo es uno de los más problemáticos en los alimentos, ya que se trata de una bacteria presente en el suelo y la vegetación capaz de formar esporas. Estas son peligrosas porque son capaces de resistir a tratamientos térmicos de uso habitual, siendo capaces de germinar, multiplicarse y producir toxinas. Si estas bacterias consiguen colonizar el intestino humano producen una enterotoxina diarreica que provoca diarreas acuosas y dolores abdominales (toxiinfección alimentaria), pero si la bacteria consigue desarrollarse en el alimento, produce una toxina emética termoestable que al ingerirla provoca vómitos (intoxicación alimentaria). Este segundo caso se da cuando un alimento que contiene esporas de *B. cereus* no ha sido enfriado rápidamente tras el tratamiento térmico, y por tanto, han germinado y producido la toxina en el alimento. El síndrome diarreico es más fácilmente transmitido por cepas que se encuentran en alimentos de origen vegetal o cárnico, y el síndrome emético por cepas que se encuentran en alimentos ricos en almidón, como arroz o pasta [4].

-*Pseudomonas putida*: es un patógeno oportunista que puede ser aislado tanto en el suelo como en el agua. Su transmisión se da principalmente por vía parenteral, sobre todo en el ámbito doméstico, y produce una infección nosohusial [5].

-*Lactobacillus brevis*: la presencia de esta bacteria en un alimento, a diferencia del resto, muchas veces es beneficiosa, como es el caso de los productos fermentados, ya que es la encargada de aportar muchas de sus características específicas por medio de la fermentación ácido-láctica. Además, su presencia en algunos alimentos mejora sus propiedades para la salud, ya que mejora la función inmunitaria en el organismo humano actuando como probiótico, es decir, regulando el equilibrio de la microbiota intestinal normal. En cambio, en otros alimentos su presencia es negativa, sobre todo en productos frescos o productos que no son sometidos a fermentación, ya que la formación de ácido láctico les aporta sabores no deseados [4].

-*Leuconostoc mesenteroides*: está ampliamente diseminado en el entorno natural, sobre todo en frutas y verduras, y es responsable de la fermentación de algunos productos elaborados con estas materias primas. Su poder alterante radica en la formación de polisacáridos viscosos (limo) que causan pérdidas de producto [7].

-*Weissella viridescens*: es una de las principales bacterias ácido lácticas (BAL) asociadas al deterioro de la morcilla de Burgos y de otros productos cárnicos cocidos [8].

-*Salmonella spp.*: estas bacterias producen gastroenteritis de origen alimentario, y se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza (agua, suelo o vegetales), siendo el intestino de los hombres y los animales su principal reservorio. La única descrita como patógena humana es la *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, habiendo dentro de este género más de 200 serotipos. Dentro de estos serotipos podemos encontrar 2 que solo afectan a los humanos, que son la *S. Typhi* y la *S. Paratyphi*, que provocan fiebre tifoidea o paratifoidea respectivamente. Pero la mayoría de los serotipos son ubicuítarios y producen toxiinfecciones alimentarias y gastroenteritis. Normalmente *Salmonella* está asociada al consumo de huevos crudos, que se pueden contaminar fácilmente por contaminación externa, por infección del ovario y el oviducto o por manipulación incorrecta del alimento [9].

-*Escherichia coli*: se trata de una bacteria coliforme fecal, indicador de contaminación fecal, y por lo tanto de posible presencia de otros patógenos entéricos. No todos sus serotipos son patógenos, ya que por ejemplo un 80 % de nuestra microbiota intestinal aerobia está constituida por esta especie. Aquellas cepas de *E. coli* que son enteropatógenas se pueden clasificar en 4 grupos:

- **Enterotoxigénica (ETEC)**: Producen una toxiinfección por la secreción de dos tipos de toxinas que hacen que el enterocito produzca una hipersecreción de agua y sales minerales. Provoca diarreas, dolor abdominal o vómitos.
- **Enteroinvasiva (EIEC)**: También produce una toxiinfección, pero en este caso las bacterias colonizan el enterocito y lo destruyen. Sus síntomas son más graves, como diarreas sanguinolentas.
- **Enteropatógena (EPEC)**: En este caso, la toxiinfección viene causada por la destrucción de las microvellosidades intestinales, que provoca la aparición de diarreas con moco.
- **Enterohemorrágica (EHEC)**: Esta es la toxiinfección más peligrosa, ya que puede llegar a producir colitis hemorrágica, síndrome urémico-hemolítico o púrpura trombótica trombocitopénica. Su causante es la Verotoxina [9].

-*Enterococcus faecalis*: esta bacteria está presente en restos fecales, y su presencia en el alimento indica su contaminación de origen fecal. En general, su actividad patógena viene dada por su capacidad de provocar distintas infecciones. [4].

-*Staphylococcus aureus*: los efectos negativos de esta bacteria se producen por intoxicación alimentaria, ya que su acción se da por la ingestión directa de la toxina producida en el alimento. Estas bacterias habitan en las mucosas y piel humanas, por lo que la contaminación de los alimentos es muy sencilla. Los alimentos en los que se desarrolla son aquellos con baja a_w como el jamón o los embutidos, o la crema de pasteles. Sus efectos son vómitos y diarreas [9].

-*Listeria monocytogenes*: se trata de un microorganismo ubicuo (suelo y agua), pudiendo ser el ser humano o los animales portadores asintomáticos. La listeriosis se produce por la entrada de esta bacteria a las células, pero la verdadera causa de su patogenicidad es que son capaces de pasar de una célula a otra formando vacuolas de doble membrana, por lo que los anticuerpos no pueden eliminarlas. Sus efectos van desde fiebre, dolores abdominales y calambres, hasta bacteriemia, septicemia y meningitis [9].

-*Clostridium perfringens*: especie bacteriana capaz de formar esporas, por lo que son bastante difíciles de eliminar. Su poder patógeno reside en que algunas cepas producen toxinas. Estas se producen en el intestino por ingestión de alimentos con elevada cantidad de formas vegetativas, aunque los únicos toxinotipos patógenos para el ser humano son el A, el C y el D. Los síntomas pueden ir desde diarreas y dolores abdominales agudos, hasta enteritis necrótica. Este microorganismo se encuentra muy distribuido en la naturaleza, pero en los alimentos se suele encontrar en aquellos ricos en proteínas [9].

Objectives

- Study the antimicrobial effect of melanoidins in different spoilage and pathogenic bacteria commonly found food products.

- Study the microbiological status of melanoidins.
- Study the Minimal Inhibitory Concentration "in vitro".

Material y métodos

• Melanoidinas

Para la obtención de estos compuestos ha sido necesario contar con la ayuda del área de bioquímica y biología molecular, ya que han sido el grupo encargado de realizar el proceso de extracción. Para ello han partido de barras de pan común de propia elaboración, de las cuales han extraído su corteza por medio de raspado, intentando obtener aquellas partes más oscuras, que son las que presentan mayor cantidad de melanoidinas. Una vez separada esta parte de la corteza, es necesario molerla y tamizarla para obtener un polvo con el tamaño de partícula más pequeño y homogéneo. Este polvo es secado en estufa a 37 °C durante 1h, y a continuación se le somete a digestión química (ácido tricloroacético 40 %) y enzimática (pronasa E de *Streptomyces griseus*) para poder separar el compuesto de interés (melanoidinas) del resto de compuestos presentes en la corteza. Por último, se filtra el resultado de la digestión, obteniéndose las melanoidinas mayores de 10000 Da por rascado del retenido. Estas melanoidinas son guardadas a -20 °C para conservar sus propiedades y evitar su deterioro, además de protegerlas contra el ataque de microorganismos.

Antes de comenzar el experimento es importante comprobar que la sustancia que vamos a emplear como posible antimicrobiano no esté contaminada, ya que podrían interferir en los resultados y además podría limitar su uso en alimentos.

• Microorganismos estudiados

Las bacterias utilizadas para el experimento son las descritas en la tabla 1.

Tabla 1. Características de las bacterias empleadas en el estudio

Microorganismo	Gram	Morfología	Respiración	Origen
<i>Bacillus cereus</i>	+	Bacilo	Anaerobio facultativo	CECT 148
<i>Pseudomonas putida</i>	-	Bacilo	Aerobio estricto	CECT 324
<i>Lactobacillus brevis</i>	+	Bacilo	Microaerófila	CECT 324
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	Coco	Anaerobio facultativo	66*
<i>Weissella viridescens</i>	+	Coco	Anaerobio facultativo	132*
<i>Salmonella spp.</i>	-	Bacilo	Anaerobio facultativo	CECT 132
<i>Escherichia coli</i>	-	Bacilo	Anaerobio facultativo	CECT 99
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Coco	Anaerobio facultativo	CECT 481
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Coco	Anaerobio facultativo	CECT 976
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	Bacilo	Anaerobio facultativo	CECT 934
<i>Clostridium perfringens</i>	+	Bacilo	Anaerobio	CECT 376

-CECT: Colección española de cultivos tipo

*: Cepa aislada de morcilla por el área de Tecnología de los alimentos de la Universidad de Burgos.

En el caso de *Clostridium perfringens*, que necesita condiciones de anaerobiosis, las placas serán incubadas en jarras de anaerobiosis con un sobre de anaerobiosis AnaeroGen (Thermo Scientific, EEUU) en su interior que produce las condiciones necesarias para que se puedan desarrollar correctamente.

● Procedimiento

Estado microbiológico de las melanoidinas

Para asegurarse de que las melanoidinas son estables microbiológicamente, se prepara una disolución al 10 % de estas en un caldo de cultivo general en el que crezcan todos los microorganismos, como por ejemplo BHI (Oxoid, UK). A partir de este caldo se realizan diferentes diluciones 1/10 en agua de peptona y se realizan las siembras en los medios correspondientes a los parámetros microbiológicos a estudiar (Tabla 2). Además, con el fin de saber si estas melanoidinas son estables microbiológicamente se deja incubando un volumen necesario (2,5 mL) de la disolución con 10 % de melanoidinas a 37 °C durante 24 horas para repetir el experimento, ya que durante este tiempo y a esta temperatura se favorece el crecimiento y desarrollo de los posibles microorganismos que puedan presentar, además de permitir el desarrollo y germinación de aquellos microorganismos esporulados.

Tabla 2. Características de los medios de cultivo sólidos empleados en el análisis del estado microbiológico de las melanoidinas.

Medio	Tipo	Microorganismos	Siembra
PCA*	General	Aerobios mesófilos totales	Profundidad
MRS**	Selectivo	Bacterias ácido lácticas	Superficie
Mc Conkey**	Selectivo	Coliformes	Superficie
MyP agar**	Selectivo	<i>Bacillus cereus</i>	Superficie
Sabouraud*	Selectivo	Mohos y levaduras	Superficie
Baird Parker***	Selectivo	<i>Staphylococcus aureus</i>	Superficie

-*:Scharlau, Spain; -**: Oxoid,UK; -***:Biolife,Italy.

Estudio de la capacidad antimicrobiana de las melanoidinas

1. Revivificación de los microorganismos

En primer lugar, hay que revivificar las bacterias, ya que se encuentran conservadas a -80 °C en un 15 % de glicerol que actúa como crioprotector. Para revivificarlas, se parte del glicerinado realizando una siembra por agotamiento en una placa Petri con el medio específico de cada bacteria (Tabla 3).

Tras 24-48 horas (Tabla 3), en función de lo que requiera cada microorganismo para su correcto crecimiento, se toma una colonia aislada de cada placa y se resuspende en 5 mL de un caldo de cultivo específico para cada una de ellas (Tabla 3). Estos tubos se incuban a la temperatura particular de crecimiento (Tabla 3) de cada microorganismo durante 20 horas, lo que se denomina “over/night (o/n)”.

Tabla 3. Medios de cultivo sólidos y líquidos y condiciones de cultivo empleados para el crecimiento de las distintas bacterias.

Microorganismo	Medio de cultivo sólido	Medio de cultivo líquido	Temperatura	Tiempo
<i>Bacillus cereus</i>	TSA*	BHI*	30 °C	24 h
<i>Pseudomonas putida</i>	TSA*	TSB**	30 °C	24 h
<i>Lactobacillus brevis</i>	MRS Agar*	MRS Broth*	30 °C	48 h
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	MRS Agar*	MRS Broth*	30 °C	24 h
<i>Weissella viridescens</i>	MRS Agar*	MRS Broth*	30 °C	24 h
<i>Salmonella spp.</i>	TSA*	TSB**	37 °C	24 h
<i>Escherichia coli</i>	TSA*	BHI*	37 °C	24 h
<i>Enterococcus faecalis</i>	TSA*	BHI*	37 °C	24 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	TSA*	BHI*	37 °C	24 h
<i>Listeria monocytogenes</i>	TSA*+YE*	BHI*	37 °C	48 h
<i>Clostridium perfringens</i>	NUTRIENT* + 5 % Sangre*	BHI*	37 °C	24-48 h

-*: Oxoid, UK; -**: Millipore, Germany

2. Ajuste de la OD

Tras las 20 horas, se mide la absorbancia a 610 nm del o/n. Esto permite conocer la densidad óptica del caldo de partida con microorganismos, y así poder ajustarla a una concentración conocida. Para ello se puede diluir la muestra hasta una OD específica (Tabla 4) para la cual se conoce la concentración de cada uno de los microorganismos en log ufc/mL. En este experimento se ajustaron todos los microorganismos a una concentración de 8 log ufc/mL, para así poder hacer las réplicas más exactas y estudiar todos los microorganismos en las mismas condiciones.

Tabla 4. Valores de OD para cada bacteria correspondiente con una concentración de 8 log ufc/mL.

Microorganismo	OD _{610 nm}	Microorganismo	OD _{610 nm}
<i>Bacillus cereus</i>	0,70	<i>Escherichia coli</i>	0,20
<i>Pseudomonas putida</i>	0,70	<i>Enterococcus faecalis</i>	0,12
<i>Lactobacillus brevis</i>	0,50	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,50
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,30	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,12
<i>Weissella viridescens</i>	0,30	<i>Clostridium perfringens</i>	1,00
<i>Salmonella spp.</i>	0,30		

3. Preparación de las muestras

Las concentraciones a las que se testó el poder antimicrobiano de las melanoidinas fueron al **4 %**, **2 %**, **1 %** y **0,5 %**, por lo que se prepararon distintas disoluciones a estas concentraciones para ponerlas en contacto con los distintos microorganismos. Los microorganismos, a su vez, tienen que estar a una concentración final en el caldo de 6 log ufc/mL, por lo que el o/n ajustado a 8 log ufc/mL se diluyó 1/100.

Para preparar las diferentes muestras de melanoidinas con los microorganismos se parte de un eppendorf con un 4 % de melanoidinas, y a partir de este se obtienen las concentraciones inferiores mediante dilución (Imagen 1). Hay que tener en cuenta que tras las diluciones se ha de añadir el volumen necesario de inóculo (1 %) para que la concentración final de los microorganismos sea de 6 log ufc/mL, por lo que las concentraciones de melanoidinas se verán modificadas. Por este motivo se prepararon inicialmente unas disoluciones de melanoidinas mayores (4,020 %, 2,010 %, 1,005 % y 0,502 %).



Imagen 1. Proceso de dilución de las melanoidinas

Por otro lado, también se debe preparar las muestras de:

-Control +, la cual está compuesta por el caldo de cultivo (Tabla 3) y un 1 % de inóculo (concentración final de 6 log ufc/mL), al igual que en las muestras. Este control sirve para conocer el crecimiento real de los microorganismos sin la presencia de melanoidinas, y así poder compararlo con el crecimiento que hemos obtenido de cada muestra.

-Control -, el cual está compuesto únicamente por el caldo de cultivo (Tabla 3), útil para conocer la turbidez aportada por este, y así poder restarla a la de los controles + y determinar la turbidez propia de los microorganismos.

-Controles antimicrobianos, están compuestos por caldo de cultivo (tabla 3) y melanoidinas en las mismas concentraciones de que las muestras (4 %, 2 %, 1 % y 0,5 %). El valor de absorbancia aportado por estos controles es restado al valor obtenido de las muestras para conocer la turbidez aportada únicamente por los microorganismos.

Estos dos últimos controles se realizan para comprobar que tanto el caldo como las melanoidinas no presentan contaminación derivada de la preparación de la placa Microtiter. Tras la incubación se comprobará que a lo largo de las 24h de no haya aumento de turbidez en este tipo de controles.

4. Estudio del efecto antimicrobiano en microdilución en caldo

➤ Siembra a Tiempo 0 (T0)

Una vez obtenidas las mezclas de las bacterias con cada una de las concentraciones de melanoidinas y los controles +, se realiza la siembra en superficie en placa de todas ellas para comprobar que la inoculación se ha realizado de forma correcta y para ver el efecto que las melanoidinas producen sobre las bacterias cuando solo han estado en contacto directo durante unos minutos.

Cada una de las muestras y controles + se siembra en duplicado. Pasado el tiempo de incubación (Tabla 3) se realiza el recuento de colonias y se expresan los resultados como la media de log ufc/mL junto con su desviación estándar.

➤ Incubación

Posteriormente, se estudia el efecto de las melanoidinas incubando las muestras, los controles +, los controles – y los controles antimicrobianos en una microplaca Microtiter de 96 pocillos (Brand plates, Germany), en un espectrofotómetro (Thermo scientific, EEUU) que permite hacer lecturas de la turbidez a 600 nm de cada uno de los pocillos cada 15 minutos durante 24h. De esta forma podemos conocer la evolución del crecimiento de los microorganismos en cada una de las muestras.

De cada una de las muestras y controles se ponen 150 µl en los correspondientes pocillos. Un ejemplo de composición de la placa Microtiter se muestran en la imagen 3. Para el diseño de esta plantilla hay que tener en cuenta varios factores:

- Es recomendable que los pocillos de los bordes la placa estén rellenos con los controles, ya que al estar en los laterales se puede producir un mayor calentamiento y una mayor evaporación de su contenido.
- Las muestras a estudiar con melanoidinas deben estar por triplicado, ya que dos pocillos van a ser utilizados para hacer las diluciones y sembrar en placas, y el tercero va a ser sembrado directamente en placa.
- En una misma placa solo puede haber bacterias cuya temperatura óptima de crecimiento sea la misma (Tabla 3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CONTROL AntiM. MP 4% TSB	CONTROL AntiM. MP 4% TSB	CONTROL AntiM. MP 2% TSB	CONTROL AntiM. MP 2% TSB	CONTROL AntiM. MP 1% TSB	CONTROL AntiM. MP 1% TSB	CONTROL AntiM. MP 0,5% TSB	CONTROL AntiM. MP 0,5% TSB	CONTROL - TSB	CONTROL - TSB	CONTROL - TSB	CONTROL - TSB
B	CONTROL - BHI	Sal. MP 4% (1)	Sal. MP 4% (2)	Sal. MP 4% (3)	Sal. MP 2% (1)	Sal. MP 2% (2)	Sal. MP 2% (3)	Sal. MP 1% (1)	Sal. MP 1% (2)	Sal. MP 1% (3)	Sal. MP 0,5% (1)	CONTROL + Sal.
C	CONTROL - BHI	Sal. MP 0,5% (2)	Sal. MP 0,5% (3)	E.f. MP 4% (1)	E.f. MP 4% (2)	E.f. MP 4% (3)	E.f. MP 2% (1)	E.f. MP 2% (2)	E.f. MP 2% (3)	E.f. MP 1% (1)	E.f. MP 1% (2)	CONTROL + Sal.
D	CONTROL - BHI	E.f. MP 1% (3)	E.f. MP 0,5% (1)	E.f. MP 0,5% (2)	E.f. MP 0,5% (3)	S.a. MP 4% (1)	S.a. MP 4% (2)	S.a. MP 4% (3)	S.a. MP 2% (1)	S.a. MP 2% (2)	S.a. MP 2% (3)	CONTROL + E.f.
E	CONTROL - BHI	S.a. MP 1% (1)	S.a. MP 1% (2)	S.a. MP 1% (3)	S.a. MP 0,5% (1)	S.a. MP 0,5% (2)	S.a. MP 0,5% (3)	E.c. MP 4% (1)	E.c. MP 4% (2)	E.c. MP 4% (3)	E.c. MP 2% (1)	CONTROL + E.f.
F	CONTROL - BHI	E.c. MP 2% (2)	E.c. MP 2% (3)	E.c. MP 1% (1)	E.c. MP 1% (2)	E.c. MP 1% (3)	E.c. MP 0,5% (1)	E.c. MP 0,5% (2)	E.c. MP 0,5% (3)	L.m. MP 4% (1)	L.m. MP 4% (2)	CONTROL + S.a.
G	CONTROL - BHI	L.m. MP 4% (3)	L.m. MP 2% (1)	L.m. MP 2% (2)	L.m. MP 2% (3)	L.m. MP 1% (1)	L.m. MP 1% (2)	L.m. MP 1% (3)	L.m. MP 0,5% (1)	L.m. MP 0,5% (2)	L.m. MP 0,5% (3)	CONTROL + S.a.
H	CONTROL AntiM. MP 4% BHI	CONTROL AntiM. MP 4% BHI	CONTROL AntiM. MP 2% BHI	CONTROL AntiM. MP 2% BHI	CONTROL AntiM. MP 1% BHI	CONTROL AntiM. MP 1% BHI	CONTROL AntiM. MP 0,5% BHI	CONTROL AntiM. MP 0,5% BHI	CONTROL + L.m.	CONTROL + L.m.	CONTROL + E.c.	CONTROL + E.c.

Imagen 3. Ejemplo de plantilla de microplaca Microtiter de 96 pocillos

➤ Siembra a Tiempo Final (TF)

Tras las 24 horas de incubación de las muestras en la microplaca Microtiter, se realizan las diluciones decimales necesarias y se siembra en superficie en los medios de cultivo sólido correspondientes (Tabla 3).

Como ya se ha indicado, se harán por duplicado y el tercer pocillo se sembrará directamente para reducir el límite de cuantificación a 1 log ufc/mL. Después de la incubación de las placas se contarán las colonias y se expresarán los resultados como la media de log ufc/mL junto con su desviación estándar.

5. Estudio estadístico de los resultados

Los resultados de log ufc/mL fueron sometidos al análisis de la varianza (ANOVA) y al test de Tukey con un nivel de significancia del 95 % para ver las diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de melanoidinas (4 %, 2 %, 1 % y 0,5 %) y los distintos tiempos (T0 y TF) para cada microorganismo. Para ello se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVII Versión 17.1.12 (StatPoint Technologies, EEUU).

Resultados y discusión

● Estado microbiológico de las melanoidinas

Para todos los parámetros estudiados los recuentos se situaron por debajo del límite de cuantificación tanto a tiempo 0 como después de 24 h de incubación, por lo que podemos determinar que el estado microbiológico de las melanoidinas era correcto para seguir adelante con el estudio de su efecto antimicrobiano.

● Estudio de la capacidad antimicrobiana de las melanoidinas

El **crecimiento a tiempo final (TF)**, en caso de que las melanoidinas no ejerzan efecto antimicrobiano, será mayor que a tiempo inicial, ya que las bacterias han podido desarrollarse y multiplicarse durante más tiempo. Pero en caso de que las melanoidinas estén en concentración suficiente como para tener efecto antimicrobiano, los recuentos a tiempo final pueden llegar a ser incluso menores que a tiempo inicial, indicando un efecto bactericida de las melanoidinas o tener recuentos iguales lo que indicaría un efecto bacteriostático.

Los **límites de detección** son distintos para tiempo inicial (T0) y tiempo final (TF). A tiempo inicial, la concentración mínima de microorganismos que se puede contar es de 3 log ufc/mL debido a que la dilución más pequeña que se sembró fue la -2, y a tiempo final, la concentración mínima de microorganismos que se puede contar es de 1 log ufc/mL, ya que se sembró la muestra de partida. Esto quiere decir, que tanto en T0 como en TF no se puede llegar a conocer si el efecto bactericida de las melanoidinas es total, es decir, si las elimina por completo (0 log ufc/mL). Por ello, en este caso se va a establecer la **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)** como la menor concentración de melanoidinas que es capaz de reducir los recuentos bacterianos por debajo del límite de detección del experimento.

La muestra de **control +**, que no presenta melanoidinas, sirve para conocer el crecimiento normal de los microorganismos y para comparar su crecimiento con el del resto de muestras. Las muestras que presenten valores de concentración similares a los de esta muestra indicarán un efecto bactericida mínimo o nulo.

En los casos en los que se obtengan muestras cuyas **réplicas no sean homogéneas**, se escoge aquella réplica más desfavorable para el fin del experimento, es decir, los datos de aquella réplica con un mayor recuento microbiano (o una menor capacidad antimicrobiana) para no dar lugar a falsos positivos. La causa de esta diferencia de recuentos no queda muy clara, pero se pueden deber a algún tipo de error durante la experimentación.

Bacillus cereus

En la tabla 6 se presentan los resultados del efecto de diferentes concentraciones de melanoidinas extraídas de pan frente a *B. cereus*. Se observa que a tiempo 0 las melanoidinas al 4 % redujeron significativamente ($p < 0,05$) el inóculo del microorganismo en 1,87 log ufc/mL respecto al control + de forma inmediata. A tiempo final se aprecia que, nuevamente al 4 % las melanoidinas ejercieron un efecto bactericida reduciendo significativamente ($p < 0,05$) la población inicial en 1,33 log ufc/mL. Además, se observa que comparando con el crecimiento de *B. cereus* sin presencia de melanoidinas la reducción del microorganismo fue de 5,96 log ufc/mL ($p < 0,05$). Sin embargo, el resto de concentraciones probadas no tuvieron efecto inmediato y a pesar de que se encuentran diferencias significativas pasadas las 24 h de incubación frente al control +, se puede considerar esa diferencia como despreciable a la hora de establecer un efecto sobre la bacteria. Como no se observa una eliminación total del microorganismo no se puede establecer una CMI, aunque se observa un efecto bactericida al 4 %.

Tabla 6. Efecto de melanoidinas extraídas de pan frente a *Bacillus cereus*.

Concentración Melanoidinas	T0		TF	
	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar
4 %	^a 4,25 _B	0,15	^a 2,92 _A	0,54
2 %	^b 6,01 _A	0,14	^b 8,05 _B	0,27
1 %	^b 6,04 _A	0,30	^{bc} 8,47 _B	0,22
0,5 %	^b 6,15 _A	0,24	^{cd} 8,65 _B	0,16
0 %	^b 6,12 _A	0,23	^d 8,88 _B	0,07

-a,b,c,d: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de un mismo tiempo (T0 o TF).

-A,B: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de una misma concentración (4 %, 2 %, 1 %, 0,5 % y 0 %).

Esta bacteria no ha sido estudiada en el espectrofotómetro puesto que suponía un riesgo de contaminación para el propio equipo de espectrofotometría.

Pseudomonas putida

En la tabla 7 se presentan los resultados del efecto de diferentes concentraciones de melanoidinas extraídas de pan frente a *P. putida*. Se observa que a tiempo 0 (T0) una concentración de 4 % de melanoidinas redujo el inóculo por debajo del límite de cuantificación (3 log ufc/mL). Sin embargo, las diferencias significativas observadas a T0 para las otras concentraciones con respecto al microorganismo sin melanoidina no se tienen en consideración por la poca diferencia que suponen y que pueden deberse a errores en el pipeteo. Después de la incubación se observa que con una concentración de 4 % los recuentos también estuvieron por debajo del límite de cuantificación (1 log ufc/mL). Observando que a esta concentración y para esta cepa el efecto bactericida que se observa inmediato se mantuvo durante el estudio. Además, se observa que a un 2 % las melanoidinas también tuvieron un efecto bactericida a las 24 h de incubación con una reducción significativa ($p < 0,05$) de 3,33 log ufc/mL con respecto al control + y de 1,77 log ufc/mL con respecto a la misma concentración a T0. Sin embargo, el resto de concentraciones no tuvieron ningún efecto. Se puede concluir que, para esta cepa, la CMI es de 4 %.

Tabla 7. Efecto de melanoidinas extraídas de pan frente a *Pseudomonas putida*.

Concentración Melanoidinas	T0		TF	
	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar
4 %	-*	-	-**	-
2 %	^b 6,75 _B	0,06	^a 4,98 _A	0,17
1 %	^b 6,77 _A	0,15	^b 8,39 _B	0,37
0,5 %	^{ab} 6,65 _A	0,21	^b 8,23 _B	0,49
0 %	^a 6,47 _A	0,25	^b 8,31 _B	0,44

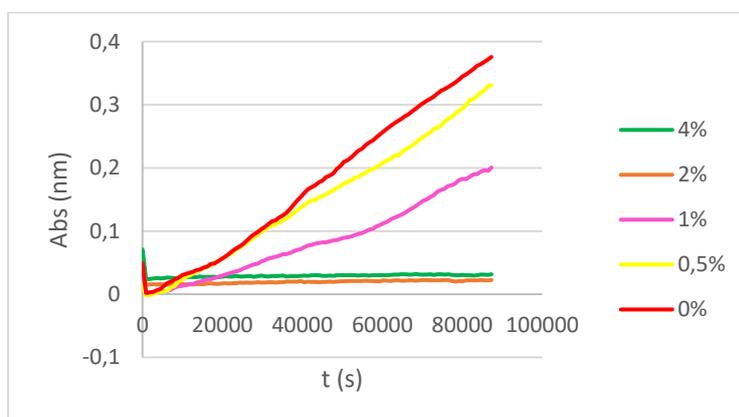
-a,b.: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de un mismo tiempo (T0 o TF).

-A,B: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de una misma concentración (4 %, 2 %, 1 %, 0,5 % y 0 %).

-*: Por debajo del límite de detección 3 log ufc/mL

-**: Por debajo del límite de detección 1 log ufc/mL

P. putida es uno de los casos en los que las réplicas diferían mucho entre sí. En este caso fue la concentración del 2 % la que presentaba problemas entre las réplicas de T0 y TF, por lo que los datos mostrados pertenecen a una sola réplica, la que presentaba la menor capacidad antimicrobiana.



Gráfica 1. Evolución de la absorbancia (600 nm) durante la incubación de *Pseudomonas putida* con diferentes concentraciones de melanoidinas.

Los resultados de la gráfica 1 se correlacionan con los resultados obtenidos del recuento en placas (tabla 7). Se observa como la muestra con un 4 % no presenta aumento de turbidez, y esto es debido a que ejerce un efecto bactericida total eliminando a las bacterias. Por otro lado, la concentración del 2 % de melanoidinas tampoco presenta aumento de turbidez puesto que a pesar de que no se eliminó el microorganismo del todo, a esta concentración ya hay efecto bactericida, obteniendo recuentos a TF menores que a T0. El resto de concentraciones de melanoidinas presentan una evolución de la turbidez más o menos similar, lo mismo que se puede apreciar en los recuentos de la tabla 7, aunque en el caso del 1 % parece que la velocidad de crecimiento fue menor a pesar de alcanzar una concentración similar a TF.

Lactobacillus brevis

En la tabla 8 se presentan los resultados del efecto de diferentes concentraciones de melanoidinas extraídas de pan frente a *L. brevis*. Se observa que a tiempo 0 no hay diferencias significativas entre los recuentos de las distintas concentraciones, por lo que no ha habido ningún tipo de efecto antimicrobiano. A tiempo final solo se observa un efecto significativo ($p < 0,05$) al 4 % de melanoidinas, produciéndose un descenso de 2,86 log ufc/mL respecto al control +. Comparando los resultados al 4 % en ambos tiempos, aunque se observan diferencias significativas entre ambos ($p < 0,05$), realmente se ve que los valores expresados en log ufc/mL son muy parecidos, por lo que se concluye que ha habido un efecto bacteriostático, ya que se han mantenido los recuentos microbianos, es decir, no se han reducido notablemente (< 1 log ufc/mL).

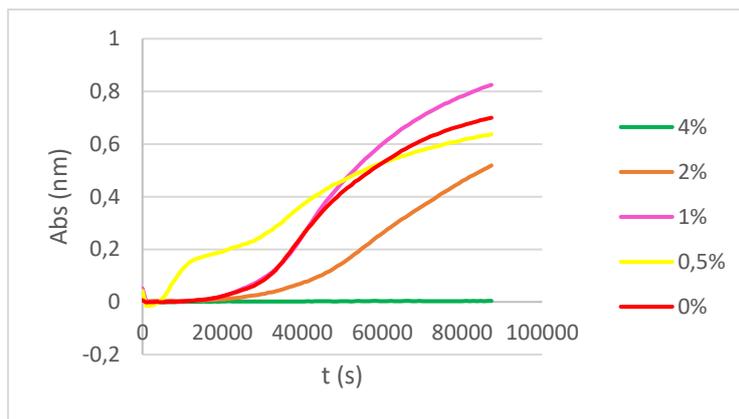
Tabla 8. Efecto de melanoidinas extraídas de pan frente a *Lactobacillus brevis*.

Concentración Melanoidinas	T0		TF	
	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar
4%	^a 6,36 _B	0,26	^a 5,90 _A	0,13
2%	^a 6,36 _A	0,21	^b 8,35 _B	0,27
1%	^a 6,48 _A	0,23	^{bc} 8,71 _B	0,33
0,5%	^a 6,35 _A	0,25	^d 9,12 _B	0,15
0%	^a 6,46 _A	0,20	^c 8,76 _B	0,24

-^{a,b,c,d}: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de un mismo tiempo (T0 o TF).

-_{A,B}: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de una misma concentración (4 %, 2 %, 1 %, 0,5 % y 0 %).

Esta bacteria es otra de las cuales ha presentado problemas en las réplicas, concretamente al 4 % de melanoidinas de tiempo final. Por lo que para esta muestra solo partimos de los datos de una réplica, de nuevo los que presentan menor capacidad antimicrobiana.



Gráfica 2. Evolución de la absorbancia durante la incubación de *Lactobacillus brevis* a diferentes concentraciones de melanoidinas.

En la gráfica 2 vemos como claramente la línea del 4 % no presenta aumento de turbidez, pero sí hemos visto recuentos en placa, esto es debido a que se ha ejercido un efecto bacteriostático, es decir, que los recuentos a T0 y TF son muy similares y constantes en el tiempo. El resto de concentraciones sí que muestran un aumento de la turbidez, y este es acorde con los resultados encontrados en las placas. Cabe destacar la línea de 0,5 % de melanoidinas, en la que se aprecian diferencias en la fase lag, la cual es más corta, pasando más rápidamente a la fase exponencial.

Leuconostoc mesenteroides

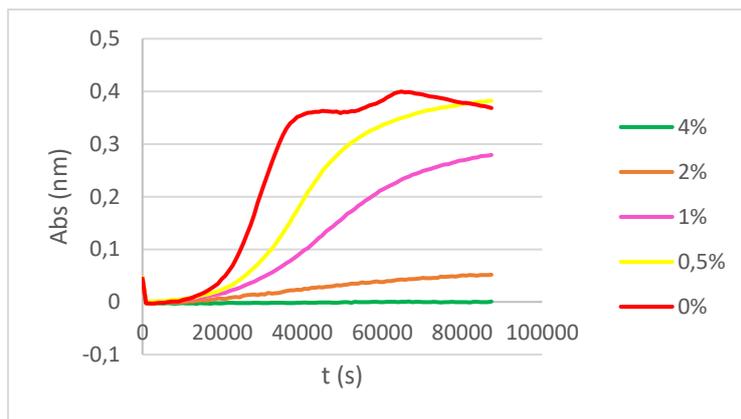
En la tabla 9 se presentan los resultados del efecto de diferentes concentraciones de melanoidinas extraídas de pan frente a *L. mesenteroides*. A tiempo inicial se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre algunas de las concentraciones de melanoidinas, pero se puede considerar que las melanoidinas no tuvieron efecto inmediato, ya que los valores difieren entre sí en muy pocos decimales. A tiempo final se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) al 4 % de melanoidinas, donde la reducción ha sido de 4,11 log ufc/mL con respecto al control +. Comparando las muestras al 4 % se observa una diferencia significativa ($p < 0,05$), obteniéndose una reducción de 1,65 log ufc/mL a tiempo final respecto a tiempo inicial, por lo que se confirma el efecto bactericida. Para el resto de concentraciones los recuentos a T0 y TF son diferentes significativamente ($p < 0,05$) indicando que las melanoidinas en esos casos no fueron capaces de controlar el crecimiento de *L. mesenteroides*.

Tabla 9. Efecto de melanoidinas extraídas de pan frente a *Leuconostoc mesenteroides*.

Concentración Melanoidinas	T0		TF	
	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar
4 %	^a 6,50 _B	0,23	^a 4,85 _A	1,06
2 %	^{ab} 6,65 _A	0,15	^b 7,45 _B	0,13
1 %	^{ab} 6,73 _A	0,32	^c 8,41 _B	0,27
0,5 %	^b 6,80 _A	0,21	^c 8,62 _B	0,17
0 %	^{ab} 6,75 _A	0,20	^c 8,96 _B	0,28

-^{a,b,c}: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de un mismo tiempo (T0 o TF).

-^{A,B}: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de una misma concentración (4 %, 2 %, 1 %, 0,5 % y 0 %).



Gráfica 3. Evolución de la absorbancia durante la incubación de *Leuconostoc mesenteroides* a diferentes concentraciones de melanoidinas.

En la gráfica 3 podemos ver como la muestra del 4 % no presenta aumento de turbidez, ya que esta concentración de melanoidinas ejerce un efecto bactericida importante que reduce los recuentos iniciales. El resto de concentraciones presentan una evolución de absorbancias bastante similares, ya que no presentan diferencias significativas, destacando la del 2% en la que se consigue ralentizar su crecimiento.

Weissella viridescens

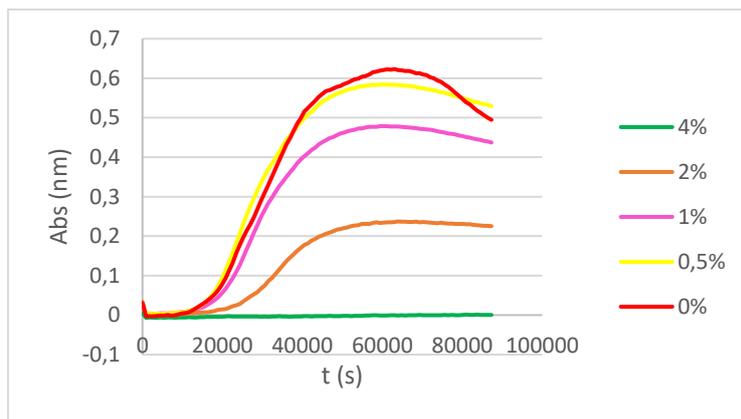
En la tabla 10 se presentan los resultados del efecto de diferentes concentraciones de melanoidinas extraídas de pan frente a *W. viridescens*. A tiempo inicial no se observan diferencias significativas entre los recuentos de ninguna concentración de melanoidinas, por lo que no ha habido ningún tipo de efecto antimicrobiano inmediato. A tiempo final la única concentración que verdaderamente ejerce un efecto significativo ($p < 0,05$) es la del 4 % de melanoidinas, que consigue una diferencia en los recuentos microbianos de 3,51 log ufc/mL con respecto al control + y una leve reducción de 0,71 log ufc/mL respecto a tiempo inicial, por lo que consideramos que tiene efecto bacteriostático, ya que no se consiguen reducir más de 1 log ufc/mL los recuentos respecto a los recuentos iniciales. El resto de concentraciones, aunque muestran diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a la muestra control, estas son muy pequeñas, por lo que consideramos que solo la concentración del 4 % ejerce algún efecto notable.

Tabla 10. Efecto de melanoidinas extraídas de pan frente a *Weissella viridescens*.

Concentración Melanoidinas	T0		TF	
	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar
4 %	^a 6,36 _B	0,20	^a 5,65 _A	0,20
2 %	^a 6,50 _A	0,31	^b 8,50 _B	0,22
1 %	^a 6,73 _A	0,35	^c 8,85 _B	0,16
0,5 %	^a 6,57 _A	0,31	^c 8,83 _B	0,28
0 %	^a 6,67 _A	0,41	^d 9,16 _B	0,14

^{a,b,c,d}: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de un mismo tiempo (T0 o TF).

^{-A,B}: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de una misma concentración (4 %, 2 %, 1 %, 0,5 % y 0 %).



Gráfica 4. Evolución de la absorbancia durante la incubación de *Weissella viridescens* a diferentes concentraciones de melanoidinas.

En la gráfica 4 se confirma como al 4 % se ejerce un efecto bactericida, ya que no hay aumento de turbidez. Al 2 % se observa un aumento de turbidez más ligero que en el resto de concentraciones debido a que esta concentración es capaz de ralentizar el crecimiento. El resto de concentraciones son bastantes similares entre ellas, correspondiéndose con los resultados obtenidos en placas.

Salmonella spp.

En la tabla 11 se presentan los resultados del efecto de diferentes concentraciones de melanoidinas extraídas de pan frente a *Salmonella* spp. A tiempo inicial la única concentración de melanoidinas cuyo recuento microbiano es diferente significativamente ($p < 0,05$) del resto es la del 4 %. Esta concentración es 1,07 log ufc/mL inferior a la muestra sin melanoidinas, por lo que ya se observa un efecto inmediato sobre la bacteria. A tiempo final todas las muestras presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellas, pero realmente la muestra que tiene un valor relevante es la del 4 %, ya que no ha presentado recuentos. Al 4 % de melanoidinas entre los dos tiempos se observa una diferencia clara, mientras que a T0 solo se han reducido un poco los recuentos (efecto bactericida leve), a TF no se han llegado a encontrar recuentos en placa (efecto bactericida total). Por tanto, se establece que para *Salmonella* la CMI es de 4 % de melanoidinas.

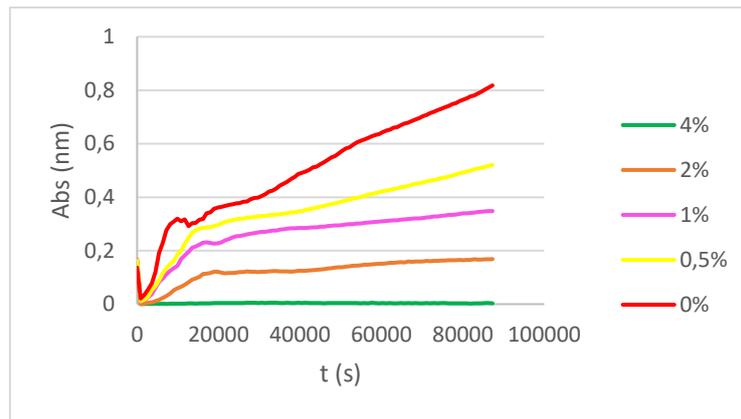
Tabla 11. Efecto de melanoidinas extraídas de pan frente a *Salmonella* spp.

Concentración Melanoidinas	T0		TF	
	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar
4 %	^a 6,26	0,19	-**	-
2 %	^b 7,01 _A	0,27	^a 8,33 _B	0,11
1 %	^b 7,10 _A	0,41	^b 9,18 _B	0,11
0,5 %	^b 7,19 _A	0,23	^c 9,41 _B	0,09
0 %	^b 7,33 _A	0,30	^d 9,96 _B	0,13

^{a,b,c,d}: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de un mismo tiempo (T0 o TF).

^{-A,B}: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de una misma concentración (4 %, 2 %, 1 %, 0,5 % y 0 %).

-**: Por debajo del límite de detección 1 log ufc/mL



Gráfica 5. Evolución de la absorbancia durante la incubación de *Salmonella spp.* a diferentes concentraciones de melanoidinas.

Esta gráfica 5 muestra como la concentración al 4 % de melanoidinas no aumenta de turbidez, y gracias al recuento en placa sabemos que es porque se produce un efecto bactericida total. En cuanto al resto de concentraciones hemos considerado que no tienen diferencias verdaderamente relevantes entre sí, pero en esta gráfica podemos ver como cada concentración aporta un valor de turbidez diferente, y esto es debido a que a medida que se aumenta la concentración de melanoidinas, se consigue reducir más la velocidad de crecimiento del microorganismo.

Escherichia coli

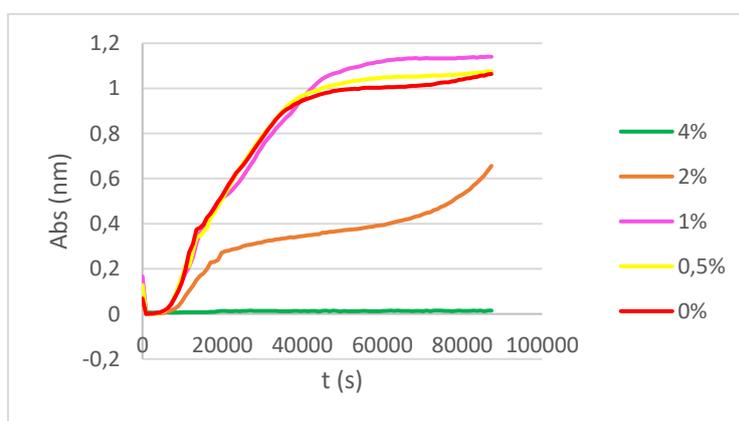
En la tabla 12 se presentan los resultados del efecto de diferentes concentraciones de melanoidinas extraídas de pan frente a *E. coli*. A tiempo inicial el análisis de la varianza determina que todas las concentraciones de melanoidinas distintas de 0 % tienen un efecto similar entre ellas y diferente significativamente ($p < 0,05$) de la muestra control +. Pero en realidad no es un efecto importante sobre la bacteria ya que a tiempo final estas muestras continúan creciendo. A tiempo final las diferencias significativas ($p < 0,05$) las encontramos a concentraciones de melanoidinas de 4 % y 2 % respecto del resto de concentraciones. Mientras que la del 4 % vemos que consigue una disminución en el crecimiento de 7,45 log ufc/mL con respecto al control +, en la del 2 % es solo de 0,48 log ufc/mL. Comparando los resultados de las muestras al 4 % de melanoidinas en ambos tiempos, se ve como a tiempo final la concentración microbiana es significativamente inferior, difiriendo entre ellos 4,25 log ufc/mL. Por lo que a esta concentración de melanoidinas se confirma un efecto bactericida, mientras que al resto de concentraciones no se ve ningún efecto.

Tabla 12. Efecto de melanoidinas extraídas de pan frente a *Escherichia coli*.

Concentración Melanoidinas	T0		TF	
	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar
4 %	^a 6,57 _B	0,12	^a 2,32 _A	0,15
2 %	^a 6,65 _A	0,09	^b 9,29 _B	0,22
1 %	^a 6,59 _A	0,12	^c 9,87 _B	0,13
0,5 %	^a 6,40 _A	0,29	^c 9,78 _B	0,05
0 %	^b 7,12 _A	0,08	^c 9,77 _B	0,08

-^{a,b,c}: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de un mismo tiempo (T0 o TF).

-^{A,B}: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de una misma concentración (4 %, 2 %, 1 %, 0,5 % y 0 %).



Gráfica 6. Evolución de la absorbancia durante la incubación de *Escherichia coli* a diferentes concentraciones de melanoidinas.

En la gráfica 6 observamos como los resultados en placa nuevamente se ven perfectamente reflejados, ya que al 4 % la turbidez no aumenta por el efecto bactericida que presenta esta concentración. El resto de concentraciones aumentan su turbidez ajustándose a la curva de la muestra patrón. Para la concentración de un 2 % se observa una curva diferente, lo que podría indicar que influye o retarda el crecimiento normal de la bacteria, pero acaba desarrollándose tal como se ha visto en los resultados en placa, no mostrando cambios los recuentos con respecto al control.

Enterococcus faecalis

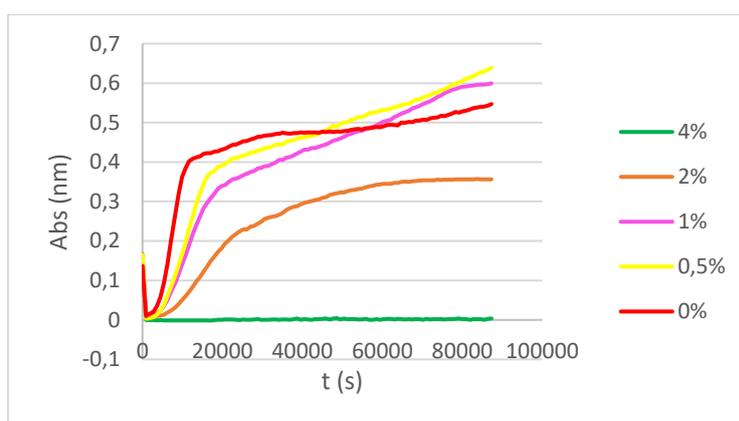
En la tabla 13 se presentan los resultados del efecto de diferentes concentraciones de melanoidinas extraídas de pan frente a *E. faecalis*. A tiempo inicial se encuentran diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distintas concentraciones de melanoidinas, pero solo vamos a considerar un efecto inmediato importante en la muestra con un 4 % de melanoidinas, ya que difiere en 1,04 log ufc/mL de la concentración microbiana de la muestra control +. Y a tiempo final la única muestra que presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) del resto es la del 4 % de melanoidinas, ya que difiere de la muestra control + en 3,6 log ufc/mL. Por lo que el efecto que se ejerce es un efecto bacteriostático.

Tabla 13. Efecto de melanoidinas extraídas de pan frente a *Enterococcus faecalis*.

Concentración Melanoidinas	T0		TF	
	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar
4 %	^a 6,45 _A	0,29	^a 6,12 _A	1,36
2 %	^b 6,97 _A	0,12	^b 9,18 _B	0,16
1 %	^b 7,03 _A	0,08	^b 9,56 _B	0,12
0,5 %	^b 7,14 _A	0,14	^b 9,62 _B	0,22
0 %	^c 7,49 _A	0,25	^b 9,75 _B	0,18

-^{a,b,c}: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de un mismo tiempo (T0 o TF).

-^{A,B}: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de una misma concentración (4 %, 2 %, 1 %, 0,5 % y 0 %).



Gráfica 7. Evolución de la absorbancia durante la incubación de *Enterococcus faecalis* a diferentes concentraciones de melanoidinas.

La gráfica 7 muestra perfectamente como la concentración del 4 % de melanoidinas no experimenta ningún aumento de la turbidez del medio, ya que esta concentración ejerce un efecto bacteriostático. Pero el resto de concentraciones evolucionan en su absorbancia a la par que la muestra control + o muestra con un 0 % de melanoidinas.

Staphylococcus aureus

En la tabla 14 se presentan los resultados del efecto de diferentes concentraciones de melanoidinas extraídas de pan frente a *S. aureus*. A tiempo inicial los resultados son un poco dispares, ya que según su análisis de varianza hay alguna diferencia significativa ($p < 0,05$), pero en realidad los valores son muy similares por lo que no se va a considerar ningún efecto inmediato de las melanoidinas. A tiempo final la muestra con un 4 % de melanoidinas es la única que presenta una diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al resto de muestras, ya que difiere de estas en 5,08 log ufc/mL. Comparando las muestras con un 4 % de melanoidinas entre ambos tiempos, se observa que son diferentes significativamente ($p < 0,05$), siendo menor la concentración microbiana a tiempo final (2,46 log ufc/mL menos). Por lo tanto, se ejerce efecto bactericida frente a este microorganismo.

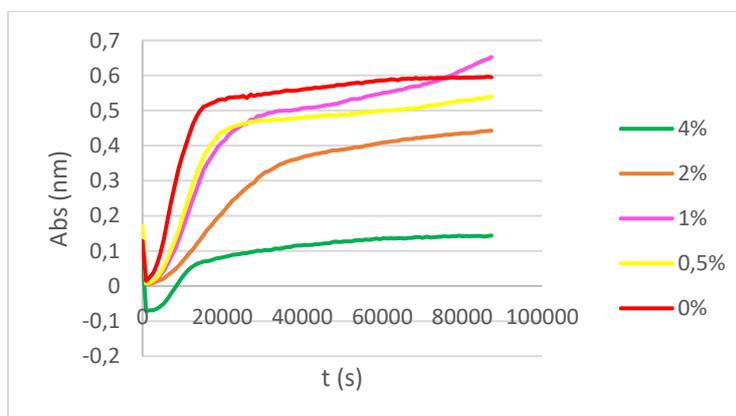
Tabla 14. Efecto de melanoidinas extraídas de pan frente a *Staphylococcus aureus*.

Concentración Melanoidinas	T0		TF	
	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar
4 %	^a 6,45 _B	0,20	^a 3,99 _A	0,15
2 %	^{ab} 6,59 _A	0,27	^b 9,11 _B	0,22
1 %	^{abc} 6,72 _A	0,19	^b 8,89 _B	0,47
0,5 %	^c 6,87 _A	0,29	^b 9,04 _B	0,17
0 %	^{bc} 6,73 _A	0,16	^b 9,07 _B	0,37

-a,b,c: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de un mismo tiempo (T0 o TF).

-A,B: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de una misma concentración (4 %, 2 %, 1 %, 0,5 % y 0 %).

Esta bacteria es otra de las cuales ha presentado problemas en las réplicas, concretamente al 4% de melanoidinas de tiempo final. Por lo que para esta muestra solo partimos de los datos de una réplica, la de menor efecto.



Gráfica 8. Evolución de la absorbancia durante la incubación de *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones de melanoidinas.

La gráfica 8 muestra la curva al 4 % de melanoidinas por encima de la línea de 0 nm, siendo un resultado que no concuerda con los resultados observados en placa, en los que se observa un efecto bactericida importante. En cuanto al resto de concentraciones se observa que mantienen más o menos la misma tendencia que el control + y concuerda con los resultados observados en placa.

Listeria monocytogenes

En la tabla 15 se presentan los resultados del efecto de diferentes concentraciones de melanoidinas extraídas de pan frente a *L. monocytogenes*. A tiempo inicial el análisis de varianza muestra que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la muestra con un 4 % de melanoidinas, las muestras con un 2 %, 1 % y 0,5 %, y la muestra con un 0 % de melanoidinas. Pero de nuevo son pequeñas variaciones en los recuentos como para considerar un efecto inmediato. A tiempo final se observa que la muestra con un 4 % de melanoidinas tuvo un efecto bactericida completo, no obteniéndose recuentos. Por otro lado, el resto de concentraciones probadas no tienen un efecto relevante respecto a la muestra control +. Al 4 % de melanoidinas se consiguen eliminar los recuentos a tiempo final, lo que indica un efecto bactericida completo, ya que estos recuentos se sitúan por debajo del límite de cuantificación (1 log ufc/mL). Por lo tanto, se puede establecer la CMI de esta bacteria en un 4 % de melanoidinas.

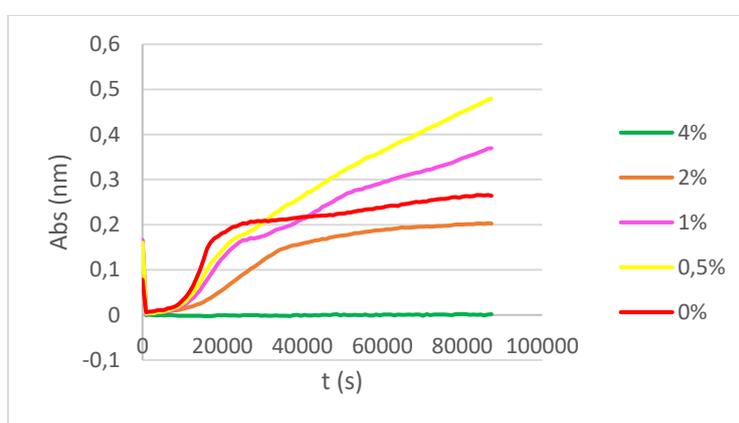
Tabla 15. Efecto de melanoidinas extraídas de pan frente a *Listeria monocytogenes*.

Concentración Melanoidinas	T0		TF	
	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar
4 %	^a 6,53	0,11	-**	-
2 %	^b 6,83 _A	0,23	^a 8,80 _B	0,14
1 %	^b 6,93 _A	0,11	^b 9,23 _B	0,15
0,5 %	^b 6,89 _A	0,40	^c 9,53 _B	0,22
0 %	^c 7,28 _A	0,16	^c 9,44 _B	0,11

-^{a,b,c}: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de un mismo tiempo (T0 o TF).

-_{A,B}: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de una misma concentración (4 %, 2 %, 1 %, 0,5 % y 0 %).

-**: Por debajo del límite de detección 1 log ufc/mL



Gráfica 9. Evolución de la absorbancia durante la incubación de *Listeria monocytogenes* a diferentes concentraciones de melanoidinas.

En la gráfica 9 podemos ver como la muestra al 4 % no experimenta aumento de turbidez debido a su efecto bactericida. En cuanto al resto de muestras, como hemos visto en las placas, no tienen ningún efecto antimicrobiano, por lo que hay aumento en la turbidez.

Clostridium perfringens

En la tabla 16 se presentan los resultados del efecto de diferentes concentraciones de melanoidinas extraídas de pan frente a *C. perfringens*. A tiempo inicial la única concentración de melanoidinas en la que encontramos una diferencia significativa ($p < 0,05$) con respecto al resto de muestras es la del 4 %, en la cual se observa una disminución de solamente 0,19 log ufc/mL, por lo que realmente no se considera que tiene un efecto inmediato frente al microorganismo. A tiempo final los valores de concentración microbiana no llevan un orden lógico ascendente con la reducción de la concentración de melanoidinas, pero aun así se trata de valores muy similares los cuales, aunque presenten diferencias significativas ($p < 0,05$) no se les va a considerar como tal. La muestra al 4 % de melanoidinas es diferente, ya que no presenta ningún recuento microbiano. Al situarse los recuentos por debajo del límite de cuantificación (1 log ufc/mL) se considera que el efecto bactericida ha sido completo y por lo tanto la CMI de *C. perfringens* es de un 4 % de melanoidinas.

Tabla 16. Efecto de melanoidinas extraídas de pan frente a *Clostridium perfringens*.

Concentración Melanoidinas	T0		TF	
	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar	Media (Log ₁₀ de UFC/mL)	Desviación estándar
4 %	^a 6,36	0,12	-**	-
2 %	^b 6,59 _A	0,14	^a 7,57 _B	0,28
1 %	^b 6,56 _A	0,14	^b 8,16 _B	0,42
0,5 %	^b 6,54 _A	0,08	^a 7,68 _B	0,48
0 %	^b 6,55 _A	0,12	^c 8,59 _B	0,17

-^{a,b,c}: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de un mismo tiempo (T0 o TF).

-_{A,B}: Caracteres que identifican las muestras que tienen diferencias significativas del 0,05 entre las muestras de una misma concentración (4 %, 2 %, 1 %, 0,5 % y 0 %).

-**: Por debajo del límite de detección 1 log ufc/mL

Este microorganismo no ha sido analizado en el espectrofotómetro puesto que requiere de condiciones de anaerobiosis para su incubación y no eran posibles de conseguir en este aparato.

Resumen de resultados

En la siguiente tabla 17 se muestra un resumen del efecto al 4 % de melanoidinas expresado como la reducción de log ufc/mL entre el tiempo final y el tiempo inicial, ordenadas de mayor a menor efecto bactericida.

Tabla 17. Comparativa del crecimiento microbiano a tiempo final y con un 4 % de melanoidinas.

Bacteria	T0-TF (Log ufc/mL)
<i>Pseudomonas putida</i>	-*
<i>Listeria monocytogenes</i>	5,53
<i>Clostridium perfringens</i>	5,36
<i>Salmonella spp</i>	5,26
<i>Escherichia coli</i>	4,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,46
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1,65
<i>Bacillus cereus</i>	1,33
<i>Weissella viridescens</i>	0,71
<i>Lactobacillus brevis</i>	0,46
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,33

-*: La diferencia es 0 puesto que tanto a T0 como a TF no ha habido recuentos.

Las cuatro primeras bacterias que aparecen en esta tabla 17 son las únicas en las que se ha llegado a establecer la CMI, y en las cuatro es un 4 % de melanoidinas. Esto quiere decir, que como mínimo un 4 % de melanoidinas es capaz de eliminar toda la población microbiana inoculada. Además, en el caso de *P. putida* una concentración al 2 % de melanoidinas tendría un efecto bactericida frente a la misma.

Lo único que encontramos en común entre estas 4 bacterias es que tienen morfología bacilar y que son patógenas, y en cuanto al tipo gram las melanoidinas son igual de eficaces frente a uno u otro, ya que dos de las bacterias son gram + y dos gram -.

Para el resto de las bacterias no hemos llegado a alcanzar su CMI, ya que un 4 % de melanoidinas no ha sido suficiente para eliminar por completo toda la población bacteriana inoculada, aunque el efecto ha sido mayor frente a unas que a otras.

Cabe destacar *E. coli*, *S. aureus*, *L. mesenteroides* y *B. cereus*, puesto que, aunque no se ha alcanzado su CMI, tienen un efecto bactericida nada despreciable. Los 3 microorganismos restantes tienen efecto bacteriostático, es decir, no son capaces de reducir los recuentos, solo de mantenerlos.

Si comparamos los resultados obtenidos con los de otros compuestos naturales que presentan actividad antimicrobiana, como es el caso del trabajo de Castaño P, et al, [11] sobre la actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario, los resultados mostraron como una de las bacterias más susceptibles a estos productos es *S. aureus*, seguida de *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *E. coli* en último lugar. En comparación con las melanoidinas, la única de las bacterias que coincide como una de las más susceptibles a estos productos naturales es *L. monocytogenes*.

Conclusiones

-Las melanoidinas de pan común estudiadas presentan un importante potencial antimicrobiano.

-Se ha establecido la CMI al 4 % de melanoidinas frente a 4 bacterias patógenas: se han llegado a inhibir *Pseudomonas putida*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Clostridium perfringens*. Estas cuatro bacterias son las más susceptibles a la acción de las melanoidinas, destacando *Pseudomonas putida*, que ha sido la única cuyo crecimiento se ha visto completamente inhibido a tiempo 0. Por lo que, la concentración del 4%, las melanoidinas pueden ser una buena opción para mejorar la seguridad alimentaria y la calidad de los alimentos que se ven afectados por estas bacterias.

-Para el resto de microorganismos el efecto ha sido menor: el resto de bacterias estudiadas también muestran un efecto frente a las melanoidinas. En algunas de las bacterias restantes se ha conseguido una reducción importante, pero en otras solo ha llegado a tener efecto bacteriostático. Se puede seguir aumentando la concentración de melanoidinas hasta alcanzar su CMI.

-Las gráficas obtenidas del espectrofotómetro son bastante útiles para completar la información obtenida de los recuentos en placa: aunque no recomendaríamos su uso como única herramienta puesto que en el caso de observarse efecto no se puede distinguir si es bactericida o bacteriostático.

-Se deberían hacer estudios "in vivo": para trasladar estos resultados a la industria alimentaria, probando en diferentes matrices alimentarias, que presenten diferentes composiciones y texturas y puedan dificultar el contacto de las melanoidinas con los microorganismos y por tanto, verse modificado su efecto o potenciarse por combinación con los procesos tecnológicos que se apliquen.

Bibliografía

1. WHO. (2019). Aditivos alimentarios. 19/06/2019, de Organización Mundial de la Salud Sitio web: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-additives>
2. Fayle, S. E., (2004). La reacción de Maillard. Zaragoza: Acriba S.A..
3. Alting, A., (2012). Proteins as clean label ingredients in foods and beverages, Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings, Elsevier,
4. Brock, Thomas D. (2015). Biología de los microorganismos. Madrid: Pearso Addison Wesley.
5. Goenaga M. A., Millet M., Carrera J. A. , Garde C. (2005). Infección nosohusial por *Pseudomonas putida*. 12/06/2019, de Scielo Sitio web: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-71992005000400015
6. EntreProbioticos. (2019). *Lactobacillus brevis*, beneficios como probiótico y usos para fermentación. 12/06/2019, de Entre Probióticos Sitio web: <https://www.entreprobioticos.com/lactobacillus-brevis/>
7. JGI Genome Portal. (2019). *Leuconostoc mesenteroides mesenteroides* ATCC 8293. 13/06/2019, de JGI Genome Portal Sitio web: <https://genome.jgi.doe.gov/portal/leume/leume.home.html>
8. Gómez, É.M.. (2015). Caracterización del proceso de deterioro de la morcilla de burgos envasada al vacío. en tesis doctorales. Universidad de Burgos.
9. Ramís, M.. (1998). Microorganismos de los alimentos. Vol. 5, Microbiología de los alimentos: características de los patógenos microbianos . Zaragoza: Acribia.
10. Castaño P, Hader I; Ciro G, Gelmy; ZAPATA M, José E; JIMÉNEZ R, Silvia L. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis L.* sobre algunas bacterias de interés alimentario. Vitae, 17, numero 2, 149-154.