

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA – FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**TRABAJO FINAL INTEGRADOR PRESENTADO COMO PARTE DE LOS REQUISITOS DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO DE  
ESPECIALIZACIÓN EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS**



**Tema: “POTENCIAL UTILIZACIÓN DE FOSFATOS COMO  
ANTIMICROBIANOS EN LA INDUSTRIA LACTEA”**

**Tesista: Ing. Gustavo José TREMMEL**

**Tutor: Mg. Viviana SUÁREZ**

**Lugar de Trabajo: Instituto de Lactología industrial (INLAIN, UNL-CONICET)**

**Santa Fe, Junio /2021**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer al Dr. Jorge Reinheimer y al Ing. Carlos Meinardi, por haber sido mi guía durante el desarrollo de la presente Tesis.

A la Mg. Viviana Suárez, por su excelencia como investigadora y persona, y por su continua predisposición a ayudarme y enseñarme todo lo necesario para el desarrollo de esta Tesis.

A los miembros del Jurado, por el interés y tiempo dedicados a la evaluación de la presente Tesis.

A la Firma Ingeniero López y Asociados S. R. L.

A la Firma Milkaut S. A.

A la Firma Sudamfos S. A.

A mis Padres.

## CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN .....	1
1. Usos de fosfatos como aditivos en la industria de alimentos.....	3
1.1- Acomplejantes de iones metálicos.....	3
1.2- Estabilizadores del pH .....	3
1.3- Dispersores de los constituyentes de alimentos.....	3
1.4- Emulsificantes.....	4
1.5- Suplementadores de minerales.....	4
1.6- Conservadores de alimentos .....	4
1.7- Antimicrobianos .....	5
2. Efectos del agregado de fosfatos a productos lácteos.....	6
3. Fosfatos como inhibidores del desarrollo de grupos microbianos de interés en alimentos.....	8
3.1- Fosfatos como inhibidores del crecimiento bacteriano (y de germinación de esporos) .....	8
3.2- Fosfatos como inhibidores del desarrollo de mohos .....	22
3.3- Fosfatos como inhibidores del desarrollo de levaduras.....	28
3.4- Adición de polifosfatos para inhibir el ciclo lítico de bacteriófagos de bacterias lácticas .....	33
4. Planteo del uso de (poli) fosfatos como antimicrobianos en la industria láctea .....	38

## CAPÍTULO 2

INTRODUCCIÓN .....	41
OBJETIVO GENERAL .....	44
OBJETIVOS PARTICULARES .....	44
MATERIALES Y MÉTODOS .....	45
<i>Quesos: elaboración y características</i> .....	45
<i>Fosfatos utilizados en el ensayo</i> .....	47
<i>Concentración y adición de polifosfatos</i> .....	48
<i>Diseño experimental</i> .....	53

<i>Seguimiento y control del desarrollo fúngico</i> .....	56
<i>Evaluación sensorial</i> .....	57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	59
CONCLUSIONES.....	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
FINANCIACIÓN Y PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	72

# ***CAPÍTULO 1: FOSFATOS EN ALIMENTOS***

**REVISIÓN DE SU CAPACIDAD**

**ANTIMICROBIANA**

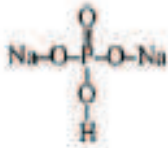

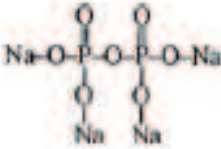
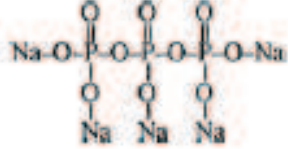
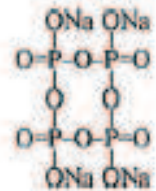
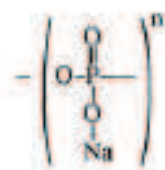


## INTRODUCCIÓN

Los fosfatos son aditivos muy utilizados en la industria alimenticia (principalmente en la industria cárnica y láctea) que se agregan con el objetivo de mejorar algunas propiedades funcionales de estos productos tales como proteger el sabor del alimento, aumentar el rendimiento como consecuencia de la capacidad de retener agua, estabilizar las emulsiones y dispersar proteínas. Son compuestos reconocidos como seguros (GRAS, *Generally Reconigzed As Safe*) y, si bien algunas actividades antimicrobianas, en general, y de inhibición de microorganismos esporulados (*Bacillus* y *Clostridium*) en particular, han sido reportadas, los fosfatos no son utilizados, hasta el momento, con el fin de inhibir microorganismos.

Los polifosfatos son polianiones fuertemente cargados negativamente, los cuales forman complejos con cationes metálicos y con macromoléculas cargadas positivamente, tales como proteínas. Un alto número de estos compuestos, que varían desde pirofosfatos a hexametafosfatos (con longitudes de cadena de más de 10 grupos fosfato), se utilizan comúnmente en alimentos. Estos compuestos y sus estructuras químicas se muestran en la Tabla 1. Los fosfatos de cadena lineal tienen la capacidad de formar complejos mucho más estables con cationes polivalentes que los fosfatos de estructura de anillo ya que, estos últimos, no son capaces estéricamente de asumir todas las configuraciones posibles (Shelef y Seiter, 2005).

Tabla 1- Fosfatos utilizados en alimentos (Shelef y Seiter, 2005)

Compound	Formula	MW	Structure
Disodium phosphate (DSP)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	142	
Sodium acid pyrophosphate (SAPP)	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	222	
Tetrasodium pyrophosphate (TSPP)	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	266	
Sodium tripolyphosphate (STPP)	$\text{Na}_5\text{O}_7\text{P}_3$	368	
Sodium tetrametaphosphate (STMP)	$n(\text{NaPO}_3)_4$	408	
Sodium hexametaphosphate (SHMP) ( $n = 13, 15, 21$ )	$(\text{NaPO}_3)_n$	1326 ( $n = 13$ ) 1530 ( $n = 15$ ) 2142 ( $n = 21$ )	

MW: Peso molecular

## 1. Usos de fosfatos como aditivos en la industria de alimentos (Molins, 1991)

**1.1- Acomplejantes de iones metálicos:** Los fosfatos son capaces de actuar como intercambiadores de iones y, de este modo, formar complejos solubles con iones polivalentes, participando en las operaciones de procesamiento de alimentos. Una de las principales ventajas en el uso de fosfatos para acomplejar iones importantes nutricionalmente (calcio, magnesio, hierro) es que, aunque se encuentran acomplejados, estos iones pueden aún ser absorbidos a través de la pared intestinal y pueden ser utilizados por el organismo. Los tratamientos de agua usados en el procesamiento de alimentos es una importante aplicación de la capacidad metal-complejo de los fosfatos, dado que los constituyentes minerales a menudo presentes en las aguas naturales pueden tener efectos devastadores en estos procesos.

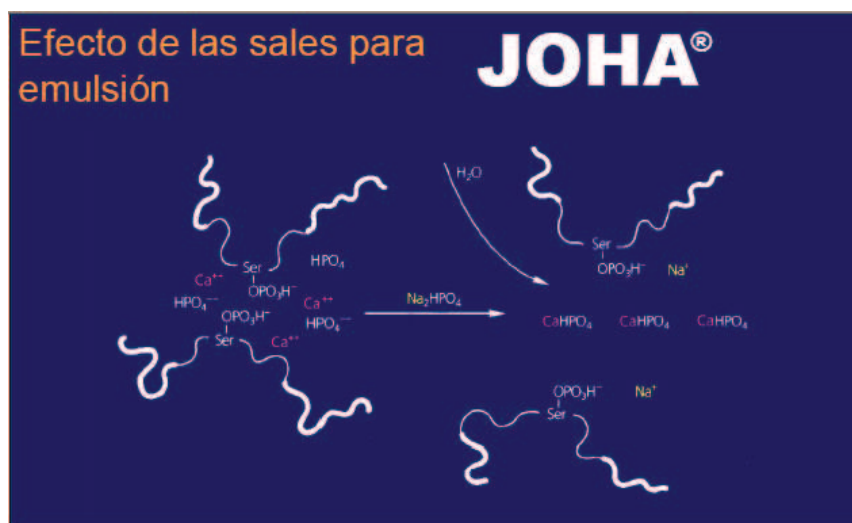
Otras funciones de los fosfatos en este tipo de agua es la prevención de los depósitos de “piedra de leche” en equipos de uso diario, reduciendo la corrosión y costra en equipos de procesamiento y calentamiento, y la estabilización del hierro disuelto para prevenir la formación de “agua roja”.

**1.2- Estabilizadores del pH (capacidad buffer):** pueden ser usados para mantener el pH óptimo requerido para el procesamiento y estabilización de un alimento.

**1.3- Dispersores de los constituyentes de alimentos:** tienen la capacidad de promover la dispersión de constituyentes de alimentos relativamente insolubles, tales como las proteínas en leche concentrada y pasteurizada, y quesos procesados. Mediante el agregado de fosfatos se produce el intercambio iónico del calcio que mantiene unida la red proteica de paracaseinato en el queso, por sodio, formándose estructuras de paracaseinato de sodio, que son fácilmente dispersables.



**1.4- Emulsificantes:** tienen la capacidad de estabilizar emulsiones, como se muestra en la Fig. 1.



**Fig. 1:** Fosfatos como emulsificantes

**1.5- Suplementadores de minerales:** fosfatos de calcio, hierro, sodio y potasio son usados para mejorar las propiedades nutricionales de algunos alimentos (por ejemplo, productos de cereales, harinas, etc.).

**1.6- Preservadores de alimentos:** los fosfatos, y especialmente los polifosfatos, pueden ser usados para prevenir o retardar la oxidación de grasas insaturadas en sistemas de alimentos húmedos y para inhibir el crecimiento de algunos de los microorganismos involucrados en el deterioro de los mismos. Generalmente, estas funciones se deben a la habilidad de los fosfatos para acomplejar iones metálicos esenciales para la oxidación de las grasas o el deterioro microbiano.

**1.7- Antimicrobianos:** esta propiedad de los (poli) fosfatos también se ha reportado en la bibliografía. Algunos estudios relacionan esta actividad antimicrobiana con la capacidad que tienen estas sustancias de acomplejar cationes divalentes (Jen y Shelef, 1986; Knabel y col., 1991; Lee y col., 1994a, 1994b, 1994c), esenciales para mantener la estructura celular de los microorganismos. También se ha comprobado que las bacterias Gram- positivas son más sensibles que las Gram- negativas a la presencia de estos compuestos (Molins y col., 1984; Rajkowski y col., 1994; Loessner y col., 1997; Shelef y Seiter, 2005; Suárez y col., 2007b) y se ha probado que poseen una importante actividad contra microorganismos esporulados (Sofos y Busta, 1980; Nelson y col., 1983; Sofos, 1986; Eckner y col., 1994; Loessner y col., 1997; Maier y col., 1999; Akhtar y col., 2008; Oliveira y col., 2016). Sin embargo, las aplicaciones concretas en la industria de alimentos como antimicrobianos son prácticamente inexistentes.

## 2. Efectos del agregado de fosfatos a productos lácteos

Los fosfatos, especialmente el ortofosfato de calcio, están íntimamente involucrados en la formación y estabilidad de las micelas de caseína, las cuales otorgan la apariencia blanca opaca de la leche. Por otra parte, está bien reportado que los efectos de adicionar fosfatos a la leche incluyen la precipitación de la caseína, debido al acomplejamiento de los iones calcio presentes en la estructura de la micela. Los fosfatos, especialmente polifosfatos, interaccionan significativamente con las proteínas de leche. La caseína actúa como un ión polivalente, que puede sufrir reacciones de intercambio de iones. Esto resulta en una reducción en los niveles de iones de calcio libres y un incremento en el nivel de calcio coloidal cuando se adicionan los fosfatos. El calcio y el fosfato que desaparecen de la solución, aparecen como complejo fosfato-calcio-caseína coloidal. Dependiendo de la naturaleza de los mismos (ortofosfatos, pirofosfatos y polifosfatos de cadena larga) difieren en relación a la manera de reaccionar con la caseína. La adición de pequeñas cantidades (entre 1 y 15 mM) de ortofosfatos en leche produce pequeños cambios en la viscosidad de la misma. Además, la adición de ortofosfato en concentraciones entre 0,140 M y 0,225 M podría producir gelificación. La velocidad de gelificación es directamente proporcional al nivel de fosfato presente y aumenta en función de la concentración del ión calcio y del nivel de sólidos no grasos en leche. Por su parte, la caseína es precipitada por los pirofosfatos en forma de gel grueso. La carga negativa del anión pirofosfato neutraliza la carga positiva de la caseína a valores de pH normales existentes en leche. La reducción resultante de esta carga neta causa la precipitación de la caseína de idéntica manera como lo haría en su punto isoeléctrico. El calentamiento de la leche tratada con pirofosfatos elimina los efectos gelificantes. El pirofosfato no precipita la  $\beta$ -lactoglobulina soluble bajo estas

condiciones, pero los polifosfatos de cadena larga precipitan tanto la caseína como la  $\beta$ -lactoglobulina. De acuerdo a todo esto, los polifosfatos son conocidos, generalmente, como agentes precipitantes de proteínas.

### 3. Fosfatos como inhibidores del desarrollo de grupos microbianos de interés en alimentos

Como se ha mencionado anteriormente, si bien la capacidad de los fosfatos de inhibir el crecimiento microbiano y controlar la germinación de esporos (tanto bacterianos como fúngicos) ha sido reportada en publicaciones científicas, hasta el momento estos compuestos no han sido clasificados o aprobados para su uso exclusivo como conservantes, agentes antimicrobianos u otra denominación similar que se relacione con estas propiedades.

#### 3.1- Fosfatos como inhibidores del crecimiento bacteriano (y de germinación de esporos)

El primer estudio encontrado en relación a este tema data del año 1963, cuando Post y col. ensayaron la capacidad de inhibir el crecimiento de distintas especies de bacterias por parte del hexametáfosfato de sodio. La mayoría de las bacterias Gram- positivas (*Bacillus* spp. y *Staphylococcus aureus*) estudiadas, fueron inhibidas con el uso de una concentración del 0,1 % de dicho fosfato, mientras que ninguna bacteria Gram- negativa lo fue e incluso algunas (*Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp.) lograron desarrollar con hasta concentraciones del 10 %. Resultados similares fueron reportados por Molins y col. (1984), quienes estudiaron la capacidad antimicrobiana de cuatro tipos de fosfatos (pirofosfato ácido de sodio, polifosfato de sodio soluble, pirofosfato tetrasódico y tripolifosfato de sodio), frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* Z88 y 2 cultivos lácticos mesófilos, en una concentración de 0,5 %.

Jen and Shelef (1986), estudiaron el efecto inhibitorio de distintos tipos de fosfatos (pirofosfato ácido de sodio, pirofosfato de tetrasodio, tripolifosfato de sodio, tetrametafosfato de sodio y hexametafosfato de sodio, con  $n= 13, 15$  y  $21$  siendo  $n=$  unidades de fosfato) en la inhibición de *Staphylococcus aureus* 196E. Además, también ensayaron la adición de metales divalentes para estudiar el mecanismo de inhibición. Los resultados informados demostraron que el microorganismo fue sensible (en orden decreciente) a los polifosfatos de cadena con 21, 3, 13 y 15 grupos fosfato, observándose un efecto bactericida a una concentración de 0,5 % de estos compuestos. No se reportó inhibición con los pirofosfatos ni con el tetrametafosfato de sodio. Los efectos inhibitorios fueron pH dependientes y la sensibilidad bacteriana fue mayor a pH superiores a 7,4. El agregado al medio de cationes  $Mg^{2+}$  resultó efectivo en la reversión de la inhibición por 0,5 % de tripolifosfato de sodio y un agregado de 0,25 a 1,0 mM del catión restauró completamente el crecimiento bacteriano. La inhibición fue parcialmente evitada con el agregado de  $Ca^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ , pero no con  $Zn^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ .

Estudios similares fueron realizados por Knabel y col. (1991), quienes profundizaron sobre el efecto del agregado de distintos cationes metálicos, esenciales para el desarrollo celular, sobre la capacidad de inhibición de cinco tipos de fosfatos (fosfato monosódico, pirofosfato de sodio, tripolifosfato de sodio, hexametafosfato de sodio y pirofosfato ácido de sodio) en el crecimiento de cuatro bacterias Gram- negativas (*Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7965 y *Pseudomonas fluorescens* ATCC 949) y cuatro Gram- positivas (*Bacillus cereus* T03, *Staphylococcus aureus* Z88, *Listeria monocytogenes* Scott A y *Lactobacillus* L-I). Los resultados demostraron que las cuatro bacterias Gram- positivas fueron inhibidas

completamente por los polifosfatos alcalinos en una concentración del 1%, mientras que las Gram- negativas no lo fueron. Sin embargo, grandes diferencias se obtuvieron dependiendo del catión adicionado, del polifosfato utilizado y de la bacteria inhibida. En este sentido se verificó que el agregado de  $Mg^{2+}$  estimuló el crecimiento de *Bacillus cereus* en presencia de pirofosfato de tretrasodio, mientras que el  $Mn^{2+}$  lo hizo en el crecimiento de *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*, en medio conteniendo 1 % del mismo fosfato.

Por su parte, Zaika y Kim (1993) estudiaron el efecto del agregado de tres polifosfatos de sodio comerciales (con longitud de cadena de 6, 13 y 21 grupos fosfato), en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* Scott A, en concentraciones de hasta 2,0 %. Los compuestos con 13 y 21 unidades inhibieron mucho más el crecimiento en relación al de 6 grupos fosfato, independientemente de la temperatura. Este trabajo demuestra que, a 10 °C, el agregado de 0,3 % de alguno de los compuestos más pesados aumentó la fase lag de crecimiento de la bacteria de 22 h a 197 h, y no se observó crecimiento después de 40 d cuando la concentración de los mismos fue del 2,0 %. En un estudio posterior del mismo grupo (Zaika y col., 1997) se demostró que concentraciones de 0,5 % de polifosfatos (longitud media de cadena= 13) aumentaban dicha fase lag de desarrollo de *Listeria monocytogenes* Scott A en medio de cultivo y que la adición de cationes polivalentes ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ) en concentraciones variables, revirtió completamente el efecto inhibitor del fosfato. Además, se pudo comprobar que, en matrices con alta concentración de estos cationes, la adición de fosfato no modificó la velocidad de crecimiento celular.

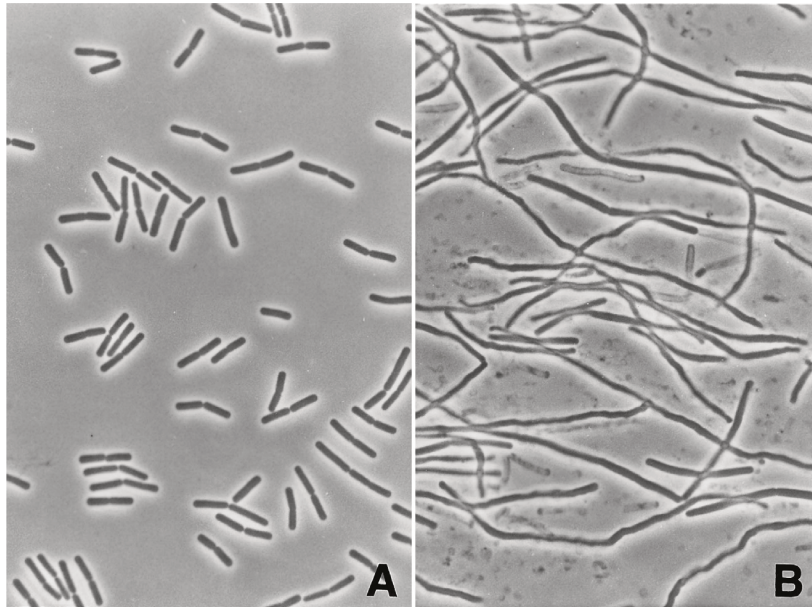
Rajkowski y col. (1994) obtuvieron resultados diversos a los informados por Jen y Shelef (1986) y Zaika y Kim (1993), cuando ensayaron el efecto de concentraciones de 0,5 % y 1,0 % de hexametáfosfato de sodio (n= 13) en *Listeria monocytogenes* Scott A y *Staphylococcus aureus* 196E, pero usando como matriz leche UHT. Ellos observaron que, en esta matriz, los parámetros de crecimiento no se veían modificados por el agregado de fosfatos en ese rango de concentración. Los autores relacionaron la falta de inhibición con el contenido de cationes divalentes presentes en la leche, lo que condice con lo observado luego por Zaika y col. (1997).

Por su parte, Lee y col. (1994a) estudiaron el efecto de cinco fosfatos (pirofosfato tetrasódico, tripolifosfato de sodio, pirofosfato ácido de sodio, polifosfato de sodio glacial (n= 20) y hexametáfosfato de sodio) sobre cepas de *S. aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens*, en caldo de cultivo y medio carne. Los resultados acordaron con los obtenidos por los autores anteriores, ya que los valores de las Concentraciones Inhibitorias Mínimas (CIMs) para *S. aureus* fueron menores a los obtenidos para las bacterias Gram- negativas. Además, también se verifica que en el medio carne (más rico en iones) los fosfatos disminuyen su capacidad inhibitoria. Por último, este trabajo confirma que los fosfatos de cadena larga inhiben más que los de cadena corta, variando los valores de CIM en medio de cultivo entre 0,1 % y 0,5 %, respectivamente. En un estudio posterior de este mismo grupo (Lee y col., 1994b), y tomando *S. aureus* como microorganismo modelo, se estudió la capacidad de revertir la actividad inhibitoria de los fosfatos más activos (polifosfato de sodio glacial y hexametáfosfato de sodio) con el agregado de cationes  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ . Los resultados obtenidos demostraron que el efecto antibacteriano se eliminaba sustancialmente con el contenido de iones metálicos de la

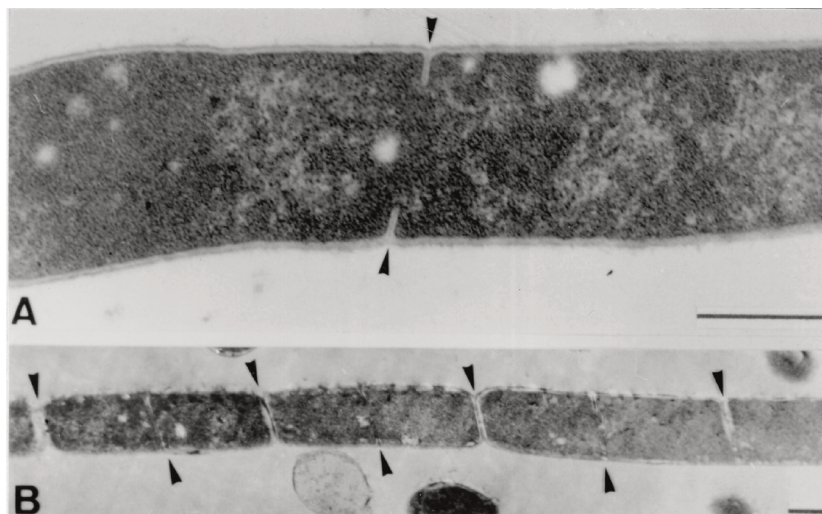


matriz. Una hipótesis del mecanismo por el cual los fosfatos de cadena larga provocan inhibición en bacterias Gram- positivas se propuso en el estudio realizado por Lee y col. (1994c), derivado de los dos estudios mencionados anteriormente. En efecto, los autores deducen que los polifosfatos se unen a la pared celular en un estadio de desarrollo temprano (fase exponencial) de la cepa, quelando metales estructuralmente esenciales (fundamentalmente  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) de la pared, resultando en los efectos bactericida y bacteriolítico.

Maier y col. (1999) reportaron las causas de la inhibición en la replicación celular de una cepa de *Bacillus cereus* (*B. cereus* WSBC 10030) usada como bacteria modelo, por parte del polifosfato comercial JOHA<sup>®</sup> HBS. Según estos autores, un 0,1 % de polifosfato tuvo un efecto lítico sobre células de esta bacteria en crecimiento exponencial (descenso de 2 a 3 ordenes log), mientras el crecimiento del resto de las células sobrevivientes se inhibió bacteriostáticamente. Las células en fase estacionaria no fueron afectadas por el agregado del polifosfato. La adición en concentraciones subletales (0,05 %) a las células en fase de crecimiento logarítmico inhibió la formación de septos (donde participa una proteína denominada FtsZ) durante la replicación celular, por lo que las células obtenidas mostraron una morfología diferente, en forma de largos filamentos (Fig. 2). En efecto, un evento temprano en la división celular es la formación de anillo Z, en el cual la principal proteína responsable, FtsZ, es altamente conservada y esencial en la división celular de procariontes. Esta proteína es dependiente de la enzima GTPasa, la cual es, a su vez,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente. El agregado de estos cationes revirtió el efecto y los septos se formaron luego de un tiempo (Fig. 3).



**Fig 2-** Efectos del agregado de polifosfatos en fase logarítmica de crecimiento celular de *B. cereus* WSBC 10030. A) control, B) agregado de 0,05 % de JOHA® HBS (Maier y col., 1999)



**Fig 3-** Reversión en la inhibición de la división celular de *B. cereus* WSBC 10030 por agregado de iones metálicos. A) ausencia en la formación del septo por presencia del polifosfato, B) nuevos septos formados a partir del agregado de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Maier y col., 1999)

Estos autores también informaron que el agregado de polifosfato no solamente afectaba a células vegetativas sino que también a la germinación de esporos. En efecto, bajas concentraciones del polifosfato (0,05 % y 0,1 %) la inhibieron completamente. Una concentración de 1 % tuvo un efecto esporicida, ya que el recuento disminuyó en 1,5 órdenes log en 8 h. Este doble efecto (acción sobre los esporos y las células vegetativas) hace que este polifosfato de cadena larga haya demostrado ser muy eficiente en su acción inhibitoria en este género y sea extensivo a otros microorganismos esporulados.

Resultados similares fueron reportados por Suárez y col. (2007b), quienes usaron para su estudio diferentes cepas de *Bacillus* de origen lácteo y determinaron valores de CIM para cinco fosfatos (A, B, 59, 60 y 70). Los resultados fueron coincidentes con los reportados por estudios anteriores ya que los fosfatos de longitud larga de cadena A y B (15 a 20 unidades fosfato), arrojaron valores de CIM de 0,1 %, mientras que para el resto los valores fueron, en general, mayores (Tabla 2).

**Tabla 2-** Valores de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM, % p/v) para distintas cepas de *Bacillus*, a pH neutro y natural (entre paréntesis) (Suárez y col., 2007b)

Cepa	Fosfato				
	A	B	59	60	70
<i>B. macerans</i> A	>1.0	>1.0	>1.0 (>1.0)	>1.0 (>1.0)	>1.0 (>1.0)
<i>B. macerans</i> NM5	>1.0	>1.0	>1.0 (>1.0)	>1.0 (>1.0)	>1.0 (>1.0)
<i>Bacillus</i> sp. 10R	0.1	0.1	0.5 (0.5)	0.1 (0.1)	0.1 (0.1)
<i>B. cereus</i> 11R	0.1	0.1	0.3 (0.5)	0.5 (0.3)	0.1 (0.1)
<i>Bacillus</i> sp. 15R	0.1	0.1	1.0 (0.5)	0.5 (0.3)	0.3 (0.1)
<i>Bacillus</i> sp. 17R	0.1	0.1	0.1 (0.5)	0.3 (0.3)	0.1 (0.1)
<i>Bacillus</i> sp. 18R	0.1	0.1	0.3 (0.5)	0.3 (0.5)	0.3 (0.1)
<i>B. coagulans</i> 19R	0.1	0.1	0.5 (0.5)	0.3 (0.3)	0.1 (0.1)
<i>Bacillus</i> sp. 22R	0.1	0.1	0.5 (1.0)	0.3 (0.5)	0.1 (0.1)

En este trabajo también se evaluó el efecto del pH, trabajando a valores de pH natural (obtenido directamente por la disolución del fosfato en el medio de cultivo) y a pH neutro (ajustando el pH luego de adición del fosfato al medio). Los compuestos A y B mostraron un pH natural cercano a la neutralidad en el medio de cultivo mientras que los fosfatos 59 y 60 dieron valores de pH alcalino, y el fosfato 70, valores de pH ácido. Para este último, la capacidad inhibitoria a pH neutro aumentó en algunos casos mientras que para los alcalinizantes, disminuyó. Esto demuestra que la acción inhibitoria de los fosfatos es mayor a valores de pH alcalinos. En particular, las cepas de *Bacillus macerans* fueron altamente tolerantes a todos los fosfatos, en ambas condiciones de pH.

Más recientemente, Obritsch y col. (2008) estudiaron el efecto producido por cuatro polifosfatos (de longitud de cadena entre 12 y 21 unidades fosfato) en el crecimiento de cuatro bacterias Gram- positivas (*Lactobacillus plantarum*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *B. subtilis*). Los resultados coincidieron en que los microorganismos Gram- positivos fueron más afectados por los fosfatos que los Gram- negativos, exceptuando *L. monocytogenes*. Los polifosfatos de longitud de cadena entre 12 y 15 unidades dieron resultados significativamente distintos a los obtenidos con los de longitud entre 18 y 21 unidades, dependiendo del microorganismo y las concentraciones de fosfatos utilizadas.

Por otra parte, algunos estudios demostraron también actividad anticlostridios por parte de los fosfatos, en general combinados con otros compuestos. Nelson y col. (1983) evaluaron el efecto antibotulínico de tres fosfatos (pirofosfato ácido de sodio, hexametáfosfato de sodio y tripolifosfato de sodio) en combinación con sorbato de potasio y ácido sórbico, con y sin agregado de nitritos, en el crecimiento de *Clostridium botulinum* en emulsiones de salchichas de pollo. Los resultados mostraron que los polifosfatos

aumentaron la inhibición en combinación con los otros inhibidores a bajos niveles de nitritos, siendo el más efectivo el pirofosfato ácido de sodio. En ausencia de nitritos, los polifosfatos no fueron efectivos.

El efecto del agregado de 0,4 % de pirofosfato de sodio a distintos valores de pH (5,55 y 5,85) sobre el crecimiento y la producción de toxina de *Cl. botulinum* 52A en medio de cultivo, fue estudiado por Wagner y Busta (1985). Esta concentración de pirofosfato no afectó el crecimiento ni produjo lisis de los cultivos, aunque si se observó un retraso o nula producción de la toxina. Estos resultados sugieren que, en las condiciones ensayadas, el agregado de pirofosfato no actuaría sobre el microorganismo sino que la disminución en la toxicidad estaría ligada a la interacción del fosfato con la fracción proteica de la toxina o bien a la inactivación de la proteasa responsable de la activación de la toxina.

Más específicamente en matrices lácteas, Eckner y col. (1994) estudiaron la capacidad de producir la toxina botulínica, inoculando niveles de  $10^4$  UFC/g de *Cl. botulinum* en quesos procesados pasteurizados con diferente porcentaje de humedad (52, 54, 56 y 60 %), utilizando como emulsificante ortofosfato de sodio y dos polifosfatos comerciales (S9 y S9H). Las muestras se analizaron en un período de hasta 20 semanas, en relación al crecimiento del microorganismo y el nivel de toxina botulínica producida. El tiempo más corto de detección de la toxina fue en la muestra con 60 % de humedad y adición de ortofosfato (8 semanas de incubación) y a las 20 semanas para igual nivel de humedad con polifosfatos como emulsificantes. Ninguna de las otras muestras mostró toxicidad a las 20 semanas.

Loessner y col. (1997) estudiaron el efecto de los polifosfatos JOHA<sup>®</sup> HBS, HBS-1 y HBS-9 (similar composición, diferente granulometría) en el crecimiento de *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 en medio líquido y en quesos procesados pasteurizados. En caldo, 0,1 % de los polifosfatos fueron suficientes para inhibir el crecimiento de las células vegetativas del microorganismo (Fig. 4). En este mismo estudio, la sensibilidad de 21 cepas de bacterias Gram- positivas y 11 de Gram- negativas fueron ensayadas. Los resultados mostraron que 17 de las primeras fueron inhibidas con concentraciones entre 0,05 % y 0,3 % mientras que ninguna de las Gram- negativas se vio afectada. Además, dos formulaciones de queso procesado con distintas composiciones de humedad y materia grasa en base seca, se adicionaron con concentraciones entre 0,1 % a 1,0 % de polifosfatos y se inocularon con concentraciones entre  $5,0 \times 10^5$  y  $2,5 \times 10^6$  esporos/ gr de *Cl. tyrobutyricum*, realizando la incubación de las muestras durante 7 semanas a 35 °C, determinándose nivel de células viables a períodos de tiempo predeterminados así como la producción de gas. Una concentración de 0,1 % de polifosfatos tuvo un efecto positivo débil, mientras que una concentración de 0,5 % retrasó completamente la germinación de los esporos. En base a estos resultados, 0,5 % de polifosfatos sería una concentración suficiente para controlar el crecimiento de *Cl. tyrobutyricum*, bajo condiciones normales donde la concentración inicial de esporos sea más baja que la usada en este estudio y la temperatura de maduración, menor a 20 °C.

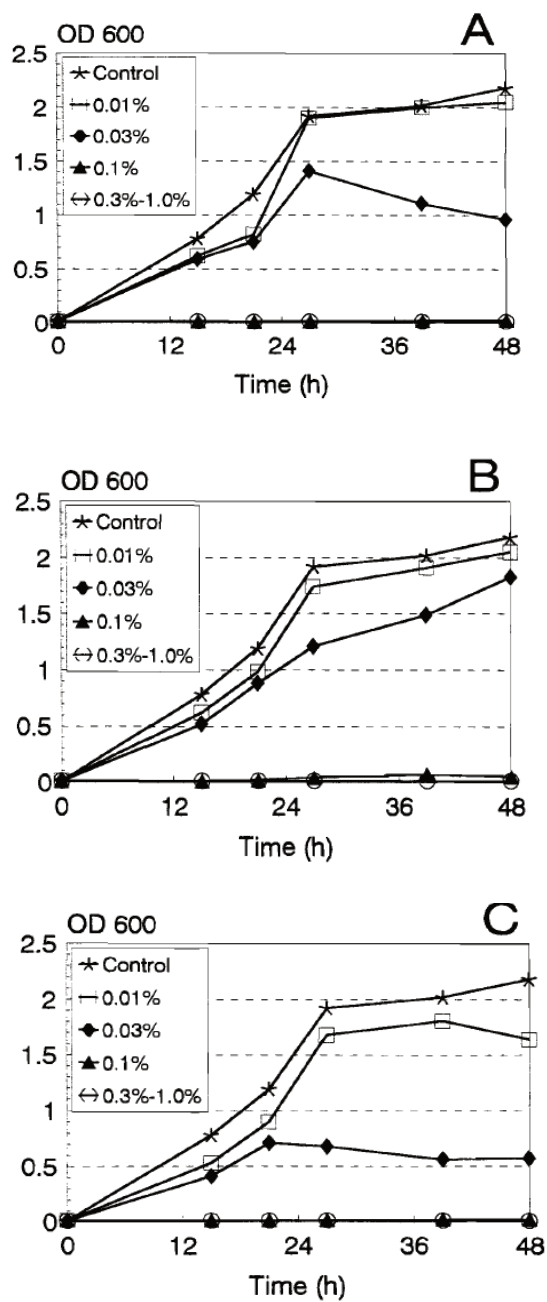
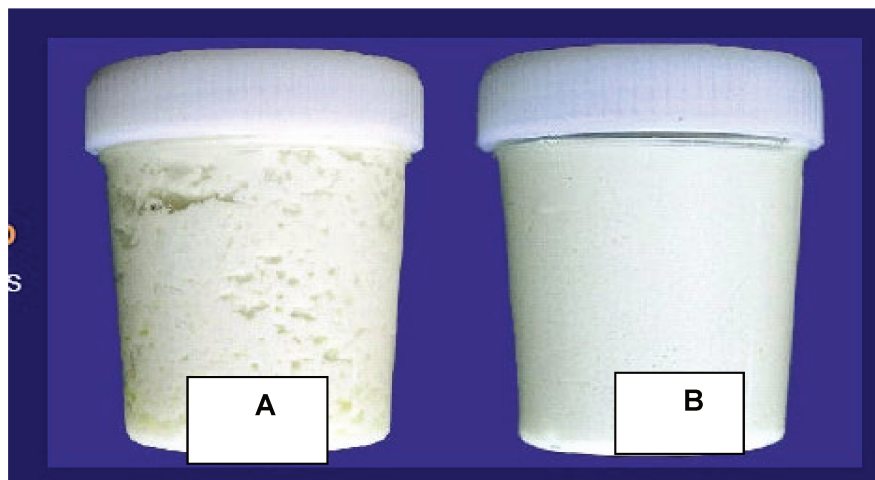


Fig. 4- Efecto de diferentes concentraciones de polifosfatos HBS (A), HBS-I (B) y HBS-9 (C) en el crecimiento de *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 (medido como densidad óptica a 600nm) en medio líquido, a 37 °C (Loessner y col., 1997).

En la Fig. 5 se muestra la ausencia de producción de gas en la experiencia anteriormente mencionada, con agregado de cantidades crecientes de fosfatos.



**Fig. 5-** Disminución de la formación de gas por *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 en quesos procesados y adicionados de 0,1 % (A) y 1,0 % (B) de polifosfato JOHA HBS, incubados durante 7 semanas a 35 °C (Loessner y col., 1997).

Los resultados indican, claramente, la utilidad de estos compuestos en la prevención de la hinchazón butírica en quesos procesados untables.

Similares resultados fueron reportados por Akhtar y col. (2008) en un estudio sobre la capacidad de inhibición por el agregado de polifosfato de sodio, pirofosfato tetrasódico, tripolifosfato de sodio y pirofosfato ácido de sodio en el crecimiento, esporulación y germinación de esporos de *Clostridium perfringens* en medio de cultivo, así como también en la capacidad de germinación de esporos en carne de aves. Los autores informaron que concentraciones entre 0,8 % y 1,0 % de polifosfatos inhibieron el crecimiento del clostridio, siendo estos valores más altos que los obtenidos en otros estudios para otras bacterias



Gram- positivas. Concentraciones subletales de fosfatos inhibieron la esporulación del microorganismo al disminuir el nivel de células con capacidad de esporular (resistentes al calor) en aprox. 5 órdenes log. Por otra parte, mientras los esporos fueron capaces de germinar en presencia de 1,0 % de tripolifosfato de sodio, el crecimiento posterior fue inhibido apreciablemente. Finalmente, una significativa reducción en la sobrevivencia de *Cl. perfringens* se observó cuando muestras de carne de ave, inoculadas con un cóctel de esporos de diferentes cepas portando el gen de la enterotoxina, fueron tratadas con 1,0 % de tripolifosfato de sodio. En general, los resultados encontrados en este estudio demostraron que el agregado de polifosfatos a los productos cárnicos no solamente mejora sus propiedades funcionales, sino que también estarían actuando como agentes antimicrobianos.

Estudios más recientes (Khanipour y col., 2016; Oliveira y col., 2016) también reportan que los niveles de cloruro de sodio, fosfato de sodio, pH y humedad que aseguran la no producción de la toxina botulínica son de 2,0 %, 2,5%, menos de 5,7 y por sobre el 60 %, respectivamente.

**Mecanismo de inhibición:** Ningún modelo satisfactorio ha sido aún propuesto para explicar la mayor susceptibilidad de las bacterias Gram- positivas, comparadas con las Gram- negativas, a la acción de los (poli) fosfatos. Una posible hipótesis sería que la pared celular de la mayoría de las bacterias Gram- positivas consiste en una fina capa de peptidoglicanos y usualmente grandes cantidades de ácidos teicoicos y/o teicurónicos. Estos compuestos sirven de principales sitios de unión de iones metálicos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ). La principal función de estos polímeros aniónicos en la pared celular es mantener una alta concentración de cationes divalentes en la región de la membrana, los cuales proveen un buen medio ambiente para los sistemas de membrana catión-dependientes. Debido a que los fosfatos poseen afinidades más elevadas que los peptidoglicanos y los ácidos teicoicos y teicurónicos por los cationes metálicos, es de esperar una potencial remoción de los cationes de la pared celular, lo que produciría la inhibición del crecimiento microbiano. Por el contrario, las bacterias Gram- negativas pueden crecer en presencia de fosfatos ya que poseen sistemas de alta afinidad a cationes esenciales, a los cuales enlazan y transportan más eficientemente.

### 3.2- Fosfatos como inhibidores del desarrollo de mohos

Los mohos son contaminantes indeseables en la industria alimenticia, afectando materias primas y alimentos procesados (Northolt y col., 1995; Pitt y col., 1997). Es muy escasa la información existente acerca del efecto de los fosfatos sobre el crecimiento de mohos, aunque hay evidencia que los fosfatos pueden interferir con ciertos estados de su metabolismo tales como diferenciación celular, esporulación, y producción de toxinas y antibióticos (Mollins, 1991). Alimentos crudos, materiales y productos pueden ser contaminados con esporos o conidios y fragmentos micelares desde el medio ambiente. La contaminación puede ocurrir en las diferentes etapas de producción pero el crecimiento fúngico ocurre solamente bajo condiciones favorables, las cuales varían según la especie.

Post y col. (1968), usando solamente 3 mohos y 4 fosfatos de diferentes longitudes de cadena, encontraron inhibición del crecimiento utilizando 5,0 % de fosfato y a pH 5,6, en medio de cultivo; el tetrafosfato de sodio fue el más efectivo, seguido por polifosfato de sodio (SPG) y tripolifosfato de sodio. Cuando se ensayaron mezclas de esporos de las tres cepas de *Botrytis* sp., *Penicillium expansum* y *Rhizopus nigricans*, inoculadas en frutillas almacenadas en ambiente a 1,1 °C y 94 % de HR (humedad relativa), se determinó que el tetrafosfato de sodio, a concentraciones del 5,0 %, retrasaba la aparición de desarrollo de mohos 15 días en comparación con el control (sin fosfatos).

A su vez, Lebron y col. (1989) informaron que el polifosfato de sodio fue más inhibidor que el pirofosfato tetrasódico en la germinación de esporos de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. En presencia de 1,0 % de fosfato, hubo crecimiento visible después de 3 días (pirofosfato tetrasodio) y en 6 días (SPG) para algunos mohos, mientras que al

2,0 % de fosfato, la germinación de esporos fue inhibida hasta el día 9. En este trabajo no se reportaron los valores de pH del medio en el cual se realizaron las experiencias.

En un trabajo más detallado, Suárez y col. (2005) estudiaron el efecto de distintos (poli) fosfatos en el desarrollo de especies fúngicas comúnmente vinculadas al deterioro de alimentos lácteos, carnes, carnes procesadas, alimentos ácidos termoprocesados, frutas, cereales y oleaginosas. Se estudiaron seis fosfatos de grado alimenticio (SUDAMFOS S.A.) con diferente longitud de cadena: polifosfatos A y B (longitud de cadena entre 15 y 20 unidades fosfato), tripolifosfato de sodio - alta solubilidad (TAS), tripolifosfato de sodio (TRI), pirofosfato ácido de sodio (PAS) y pirofosfato neutro de sodio (N). Los valores de CIM se determinaron por el método ecométrico, en placas con medio agarizado adicionado de los fosfatos. Se evaluó además la influencia del pH, trabajando a pH natural (pH sin ajuste luego del agregado del fosfato al medio de cultivo) y pH neutro (con ajuste). La capacidad inhibitoria fue especie dependiente. Los resultados reportados en este trabajo sugieren que la actividad antifúngica de los fosfatos a pH neutro estaría directamente relacionada con la longitud de cadena y su poder secuestrante de cationes divalentes. Los fosfatos que demostraron mejor capacidad de inhibición fueron los de cadena larga ya que inhibieron el 88 % de las cepas estudiadas a una concentración de 1,0 % (Tabla 3). También se demostró que el pH del medio tuvo marcada influencia sobre la actividad inhibitoria de los fosfatos. Cuando los ensayos de inhibición se llevaron a cabo a pH natural, el fosfato que mostraba valores de pH ácido (pirofosfato ácido de sodio, PAS) disminuyó su capacidad inhibitoria demostrada a pH 7,0. Inversamente, las soluciones de fosfatos que presentaron valores de pH alcalinos, tripolifosfato de sodio-alta solubilidad (TAS), tripolifosfato de sodio

(TRI) y pirofosfato neutro de sodio (N), incrementaron notablemente su actividad inhibitoria contra los mohos respecto a la presentada a pH 7 (Tabla 4).

Este incremento de actividad podría ser una consecuencia del aumento de la capacidad secuestrante a valores de pH alcalinos (Tabla 5), ya que el crecimiento de los mohos fue normal cuando el pH del medio fue ajustado a valores similares usando NaOH. Las soluciones de polifosfato estudiadas (A y B) tuvieron valores de pH cercanos a la neutralidad (pH natural), y sus actividades inhibitorias fueron idénticas a aquellas exhibidas a pH 7. El efecto del pH también fue estudiado por Jen y Shelef (1986) para *Staphylococcus aureus* 196E, usando 0.5 % de tripolifosfato de sodio y hexametáfosfato de sodio (SPG). Ellos también observaron un incremento en la inhibición por fosfatos a altos valores de pH (7 a 9) e hipotetizaron que los complejos se disociaban y que la cantidad de cationes acomplejados se incrementaba. Como consecuencia de esto, minerales esenciales se volverían inaccesibles para el crecimiento fúngico. Las paredes celulares fúngicas poseen polímeros aniónicos tales como quitina, quitosán y glicoproteínas, los cuales están involucrados en la recepción de cationes divalentes (Knabel y col. 1991). Por lo tanto, la inhibición de mohos por fosfatos podría ser atribuida, como en el caso de bacterias, a la remoción de los cationes metálicos esenciales desde estos sitios localizados en la pared celular fúngica.

**Tabla 3-** Actividad inhibitoria de distintos fosfatos en el desarrollo de mohos, a pH neutro (Suárez y col., 2005)

Organism	PHOSPHATE (% w/v)																				
	A				B				TAS			PAS			TRI			N			
	0.1	0.3	0.5	1.0	0.1	0.3	0.5	1.0	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	
<i>Aspergillus ochraceus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Fusarium proliferatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Absidia corymbifera</i>	+	+	+	+	+	+	+/-	-*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Fusarium sp.</i>	+	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Cladosporium sphaesperum</i>	+	+	+	-*	+	+	+/-	-*	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	
<i>Penicillium chrysogenum</i>	+	+	+/-	-*	+	+	+/-	-*	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	
<i>Penicillium roquefortii</i>	+	+	+	-*	+	+	+/-	-*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Penicillium commune</i>	+	+	+	+	+	+	+/-	-*	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+	
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+/-	-*	+	+/-	-*	-	+	+/-	-*	+	+/-	-*	+	+/-	-*	+	+	+/-	
<i>Trichoderma viride</i>	+	+/-	-*	-	+	-*	-	-	+	+/-	-*	+	+	+/-	+	+/-	-*	+	+/-	-*	
<i>Epicoccum nigrum</i>	+/-	-*	-	-	+/-	-*	-	-	+	+/-	-*	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	-*	
<i>Rhizopus stolonifer</i>	+	-*	-	-	+/-	-*	-	-	+	-*	-	+	-*	-	+	-*	-	+	+/-	-*	
<i>Aspergillus candidus</i>	+	+/-	-*	-	+	+/-	-*	-	+	+/-	-*	+	+/-	-*	+/-	-*	-	+	+	+/-	
<i>Phoma glomerata</i>	+/-	-*	-	-	+	-*	-	-	+	+/-	-*	+	+/-	-*	+	+/-	-*	+	+	-*	
<i>Byssochlamys nivea</i>	+/-	-*	-	-	+/-	-*	-	-	+/-	-*	-	+/-	-*	-	+/-	-*	-	+/-	-*	-	
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	-*	-	-	+	-*	-	-	-*	-	-	+/-	-*	-	-*	-	-	+	-*	-	
<i>Penicillium glabrum</i>	+	-*	-	-	+	-*	-	-	+/-	-*	-	+	-*	-	+/-	-*	-	+	-*	-	
% of molds inhibited	17.6	47.0	59.0	76.4	17.6	53.0	82.3	88.2	17.6	52.9	70.6	11.8	41.2	64.7	23.5	47.0	64.7	5.9	29.4	53.0	

+: growth (RGI from 0.8 to 1); +/-: weak growth (RGI from 0.2 to 0.8); -: no growth (RGI < 0.2) \* MIC: minimal inhibitory concentration

RGI: Relative Growth Indices

A and B: polyphosphates (15 to 20 phosphate units); TAS: sodium tripolyphosphate – high solubility; PAS: sodium acid pyrophosphate

TRI: sodium tripolyphosphate; N: sodium neutral pyrophosphate.

**Tabla 4-** Actividad inhibitoria de distintos fosfatos en el desarrollo de mohos, a pH natural (Suárez y col., 2005)

Organism	PHOSPHATE (% w/v)											
	TAS			PAS			TRI			N		
	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
<i>Aspergillus ochraceus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	-
<i>Fusarium proliferatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+/-
<i>Absidia corymbifera</i>	+	+	+/-	+	+	+	+	+	-*	+	-*	-
<i>Fusarium sp.</i>	+	-*	-	+	+	+	+	-*	-	+	+/-	-*
<i>Cladosporium sphaesperum</i>	+	+/-	-*	+	+	+	+	+/-	-*	+/-	-*	-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	+	+/-	-*	+	+	+	+	+/-	-*	+	-*	-
<i>Penicillium roquefortii</i>	+	-*	-	+	+	+	+	-*	-	+	+/-	-*
<i>Penicillium commune</i>	+	-*	-	+	+	+	+	-*	-	+	+/-	-*
<i>Aspergillus niger</i>	+/-	-*	-	+	+	+	+/-	-*	-	+/-	-*	-
<i>Trichoderma viride</i>	-*	-	-	+	+	+	-*	-	-	-*	-	-
<i>Epicoccum nigrum</i>	-*	-	-	+	+	+	-*	-	-	-*	-	-
<i>Rhizopus stolonifer</i>	-*	-	-	+	+	+	-*	-	-	-*	-	-
<i>Aspergillus candidus</i>	+/-	-*	-	+	+	+	+/-	-*	-	+/-	-*	-
<i>Phoma glomerata</i>	-*	-	-	+	+	+	-*	-	-	-*	-	-
<i>Byssochlamys nivea</i>	-*	-	-	+	+	+	-*	-	-	-*	-	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	-*	-	-	+	+	+	-*	-	-	-*	-	-
<i>Penicillium glabrum</i>	+/-	-*	-	+	+	+/-	-*	-	-	-*	-	-
% of molds inhibited	<b>52.9</b>	<b>82.3</b>	<b>88.2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5.9</b>	<b>52.9</b>	<b>82.3</b>	<b>100</b>	<b>58.8</b>	<b>88.2</b>	<b>100</b>

Natural pH: without pH adjustment.

+: growth (RGI from 0.8 to 1); +/-: weak growth (RGI from 0.2 to 0.8); -: no growth (RGI < 0.2)

\* MIC: minimal inhibitory concentration

RGI: Relative Growth Indices

A and B: polyphosphates (15 to 20 phosphate units); TAS: sodium tripolyphosphate – high solubility; PAS: sodium acid pyrophosphate

TRI: sodium tripolyphosphate; N: sodium neutral pyrophosphate.

**Tabla 5-** Capacidad secuestrante de fosfatos, a distintos valores de pH (Suárez y col., 2005)

Phos- phate <sup>a</sup>	pH of plate count agar-phosphate (%, wt/vol) media					Sequestering power (g Ca/100 g phosphate) <sup>b</sup>	
	0.1	0.3	0.5	1.0	1.5	pH 7.0	Natural pH
A	6.81	6.79	6.72	6.59	6.45	15	15
B	6.81	6.78	6.68	6.64	6.59	15	15
TAS	7.00	7.13	7.17	7.35	7.48	12	13
PAS	6.17	5.77	5.55	5.17	5.04	3	NP <sup>c</sup>
TRI	7.04	7.27	7.44	7.42	7.64	12	13
N	7.28	7.78	7.86	8.14	8.31	5	8

<sup>a</sup> A and B, polyphosphates (15 to 20 phosphate units); TAS, sodium tripolyphosphate, high solubility; PAS, sodium acid pyrophosphate; TRI, sodium tripolyphosphate; N, sodium neutral pyrophosphate.

<sup>b</sup> Values for 1.2% phosphate (data provided by the manufacturer). Natural pH indicates that no pH adjustment was made.

<sup>c</sup> NP, not provided.

Los resultados de este estudio sugieren que algunos fosfatos podrían ser utilizados en la industria de alimentos para inhibir mohos ligados a deterioro a concentraciones similares o más bajas que aquellas usadas como aditivos funcionales.



### 3.3- Fosfatos como inhibidores del desarrollo de levaduras

Las levaduras están normalmente presentes en alimentos crudos y alimentos procesados y son una de las principales causas de deterioro del producto en alimentos con una concentración alta de azúcares, bajo pH y baja actividad acuosa. El daño debido a estos microorganismos depende exclusivamente del nivel inicial en el alimento y de las características del proceso. Dentro de la gama de alimentos que presentan estas características podemos mencionar a productos lácteos, fruta fresca, jugos de fruta y productos con frutas, miel, jarabes de azúcar, melasas y vegetales fermentados (Ray, 2001). Los géneros de levaduras como *Candida*, *Geotrichum*, *Trichosporon*, *Brettanomyces* y *Cryptococcus* están frecuentemente asociadas al deterioro de estos alimentos (ICMSF, 1980).

Suárez y col. (2007c) estudiaron la acción de distintos fosfatos (SUDAMFOS S.A.) sobre 20 cepas pertenecientes a distintos géneros de levaduras de origen alimentario. Los fosfatos usados fueron los ya referenciados en Suárez y col., (2005), para mohos. Nuevamente, para estos microorganismos, a pH neutro los fosfatos más inhibidores del desarrollo de las levaduras estudiadas fueron aquellos con longitudes de cadena mayores a 15 unidades de fosfato (fosfatos A y B) (Tabla 6). La capacidad de inhibición de los fosfatos sobre el crecimiento de las levaduras fue cepa dependiente, ya no especie dependiente. Un grupo de 9 cepas fue inhibido con concentraciones  $\geq 1,0$  % de los polifosfatos A y B, mientras que otro grupo de 6 cepas lo hizo con una concentración  $\leq 0,5$  %. Maier y col. (1999) también habían demostrado que algunas cepas de levaduras, pertenecientes a las especies *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*, se inhibían con concentraciones de 0,3 % del polifosfato comercial JOHA<sup>®</sup> HBS.

**Tabla 6-** Actividad inhibitoria de distintos fosfatos en el desarrollo de levaduras, a pH neutro (Suárez y col., 2007c)

Organism/ Strain	Origin	minimal inhibitory concentration (MIC, % w/v)*					
		A	B	TAS	TRI	N	PAS
<i>Candida humicola</i> 108	hard cheese	1.5	1.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Geotrichum penicillatum</i> 105	citric fruit juice	1.5	1.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Cryptococcus laurentii</i> 67	soft cheese	1.5	1.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Brettanomyces claussenii</i> 15	citric fruit juice	1.5	1.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Candida famata</i> 19	citric fruit juice	1.5	1.0	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Cryptococcus heveanensis</i> 17	soft cheese	1.5	1.0	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Cryptococcus albidus</i> 14	soft cheese	1.5	1.0	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Candida parapsilosis</i> 36	soft cheese	1.5	1.0	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Candida famata</i> 11	soft cheese	1.0	1.0	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Cryptococcus laurentii</i> 65	natural milk starter	0.5	1.0	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Trichosporon</i> sp. 44	natural milk starter	1.0	0.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Candida famata</i> 24	soft cheese	1.0	0.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Candida famata</i> 22	soft cheese	1.0	0.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Candida famata</i> 16	citric fruit juice	1.0	0.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Geotrichum</i> sp. 57	citric fruit juice	0.5	0.5	1.5	1.0	1.5	>1.5
<i>Brettanomyces custersii</i> 13	citric fruit juice	0.5	0.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Candida famata</i> 32	soft cheese	0.5	0.3	1.5	1.5	>1.5	>1.5
<i>Brettanomyces intermedius</i> 12	soft cheese	0.5	0.3	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Cryptococcus albidus</i> 8	citric fruit juice	0.5	0.3	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Trichosporon cutaneum</i> 10	dairy environment	0.3	0.3	0.5	0.5	1.0	0.5

A and B: polyphosphates (15 to 20 phosphate units); TAS: sodium tripolyphosphate – high solubility; TRI: sodium tripolyphosphate; N: sodium neutral pyrophosphate; PAS: sodium acid pyrophosphate \* Values obtained from three determinations  
Phosphate concentrations assayed: 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 and 1.5 % (w/v)

Estos resultados se podrían relacionar, como se hizo también en el caso de mohos y bacterias, con la capacidad secuestrante de cationes divalentes de los polifosfatos A y B, que presentan valores de 15 g Ca/100 g fosfato, a pH cercano a la neutralidad. Es de destacar que estos polifosfatos, ya en condiciones normales, muestran valores de pH cercanos a la neutralidad a las concentraciones ensayadas.

Por otro lado, en este trabajo también se observó que el pH tuvo una notable influencia sobre la capacidad inhibitoria de los fosfatos. Para aquellos que mostraron una reacción alcalina en medios de cultivos (fosfatos TAS, TRI y N), la actividad fue mayor cuando se utilizó el medio de cultivo a valores de pH natural (Tabla 7). Este factor puede ser vinculado, nuevamente, al incremento de la capacidad secuestrante de los cationes metálicos para fosfatos alcalinos (Molins, 1991). Estos resultados son similares a aquellos obtenidos para mohos cuando se utilizaron los mismos fosfatos (Suárez y col., 2005).

En cuanto a la acción inhibitoria de los polifosfatos a valores de pH ácidos, Suárez y col. (2007c) demostraron que los polifosfatos A y B incrementaron su actividad inhibitoria frente a las levaduras. Cepas de levaduras capaces de crecer en medios ácidos fueron inhibidas cuando los fosfatos A y B se adicionaron en concentraciones entre 0,5 y 1,0 % (Tabla 8).

**Tabla 7-** Actividad inhibitoria de distintos fosfatos en el desarrollo de levaduras, a pH natural (Suárez y col., 2007c)

Organism/ Strain	Origin	minimal inhibitory concentration (MIC, % w/v)*			
		TAS	TRI	N	PAS
<i>Candida humicola</i> 108	hard cheese	0.5	0.5	0.5	>1.5
<i>Geotrichum penicillatum</i> 105	citric fruit juice	>1.5	1.0	>1.5	>1.5
<i>Cryptococcus laurentii</i> 67	soft cheese	0.5	1.0	1.0	>1.5
<i>Brettanomyces claussenii</i> 15	citric fruit juice	0.5	0.5	0.5	>1.5
<i>Candida famata</i> 19	citric fruit juice	0.5	0.5	1.0	>1.5
<i>Cryptococcus heveanensis</i> 17	soft cheese	1.0	0.5	1.0	>1.5
<i>Cryptococcus albidus</i> 14	soft cheese	0.5	1.5	0.5	>1.5
<i>Candida parapsilosis</i> 36	soft cheese	0.5	0.5	0.5	>1.5
<i>Candida famata</i> 11	soft cheese	0.5	1.0	0.5	>1.5
<i>Cryptococcus laurentii</i> 65	natural milk starter	0.5	0.5	0.5	>1.5
<i>Trichosporon</i> sp. 44	natural milk starter	0.5	1.0	1.0	>1.5
<i>Candida famata</i> 24	soft cheese	1.0	0.5	1.0	>1.5
<i>Candida famata</i> 22	soft cheese	0.5	0.5	0.5	>1.5
<i>Candida famata</i> 16	citric fruit juice	1.0	0.5	1.0	>1.5
<i>Geotrichum</i> sp. 57	citric fruit juice	0.5	0.5	0.5	>1.5
<i>Brettanomyces custersii</i> 13	citric fruit juice	1.0	1.5	1.5	>1.5
<i>Candida famata</i> 32	soft cheese	0.5	0.5	0.5	>1.5
<i>Brettanomyces intermedius</i> 12	soft cheese	0.5	1.0	0.5	>1.5
<i>Cryptococcus albidus</i> 8	citric fruit juice	1.5	1.0	1.5	>1.5
<i>Trichosporon cutaneum</i> 10	dairy environment	0.5	0.5	0.5	>1.5

A and B: polyphosphates (15 to 20 phosphate units); TAS: sodium tripolyphosphate – high solubility; TRI: sodium tripolyphosphate; N: sodium neutral pyrophosphate; PAS: sodium acid pyrophosphate  
 \*Values obtained from three determinations  
 Phosphate concentrations assayed: 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 and 1.5 % (w/v)

**Tabla 8-** Porcentaje de cepas de levaduras inhibidas\* (n= 20) a diferentes valores de pH, con y sin agregado de fosfatos (% p/v) (Suárez y col., 2007c)

pH	Without phosphate addition	Phosphate A		Phosphate B	
		0.5	1.0	0.5	1.0
7.0 (control)	0	35	60	50	80
4.5	10	85	100	100	100
3.5	55	100	100	100	100
2.5	80	100	100	100	100

\* Cell growth was measured as  $A_{600nm}$  in plate count broth after 24 h at 30°C. A rate (%) value of cell growth < 25 %, using growth at pH 7.0 as control, was considered as inhibition.

Estas concentraciones son similares o más bajas que aquellas usadas cuando los polifosfatos son usados como aditivos (Molins, 1991). Los resultados demuestran la posibilidad de ser utilizados en la preservación de alimentos ácidos tales como frutas ácidas o jugos de frutas ya que, por ejemplo, los valores de pH de jugos de frutas cítricas fluctúan entre 2,5 (jugos concentrados) y 4,5 (jugos frescos) (Sobrero, 2002).

### **3.4- Adición de polifosfatos para inhibir el ciclo lítico de bacteriófagos de bacterias lácticas**

Las infecciones fágicas en la industria láctea son, aún hoy, una de las principales causas de pérdidas económicas debido al retardo o detención del proceso fermentativo por la lisis de las bacterias del cultivo iniciador (Moineau y Levésque, 2005). Debido a la ubicuidad de los bacteriofagos en los ambientes lácteos, y reconociendo que no es posible erradicarlos completamente, las investigaciones se han dirigido al diseño y la implementación de estrategias prácticas que apuntan a minimizar su incidencia.

Muchos esfuerzos se siguen realizando con el objeto de enfrentar este problema (Samson y Moineau, 2013; Fernández y col., 2017). Dentro de las medidas de control usadas en la industria se encuentra el uso de sanitizantes, tratamientos térmicos y químicos, rotación de cepas y uso de cepas mutantes fago resistentes. El uso de medios inhibidores de fagos (*Phage Inhibitor Media*, PIM) que contienen agentes quelantes (fosfatos y citratos) en su composición pueden controlar la infección debida a bacteriofagos que requieren  $\text{Ca}^{2+}$  para completar su ciclo lítico (Whitehead y col., 1993). Sin embargo, los agentes quelantes pueden, en algunos casos, retrasar también el crecimiento de los cultivos iniciadores. Los medios comerciales para inhibición fágica varían ampliamente en su habilidad para prevenirla. Los más efectivos contienen suficientes nutrientes para vencer la inhibición natural del medio y citratos como buffer. Debido a que no todos los bacteriófagos son inhibidos por ausencia de calcio, para ser efectivos, estos medios de cultivo deben ser usados solo como parte de una estrategia global de control fágico (Frank y Hassan, 1998; Josephsen y Neve, 2004).

Teniendo en cuenta el concepto anterior, la adición directa de polifosfatos (secuestrantes de cationes divalentes) a la leche destinada para fermentaciones lácticas constituiría una metodología simple para ayudar a las bacterias del fermento frente al ataque de fagos Ca dependientes. Es muy importante tener en consideración que concentraciones de fosfatos entre 1,6 y 2,0 % (dependiendo del fosfato) en leche, producen inestabilidad fisicoquímica de la caseína y disminuye el rendimiento en la elaboración de quesos (Ibrahim y Daguri, 1996). A determinadas concentraciones de fosfatos adicionados, la caseína forma complejos largos y estables. Sin embargo, si los fosfatos se adicionan en exceso (superior a cantidad requerida para la formación de este complejo) se produce una completa dispersión de las micelas de caseína.

Con la finalidad de evaluar la posibilidad antes mencionada, Suárez y col. (2007a) ensayaron distintas concentraciones de fosfatos (hasta un máximo de 0,5%, p/v) para evaluar el efecto sobre las infecciones fágicas producidas por bacteriofagos Ca dependientes en cepas de *Lactococcus lactis* (2 cepas), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* (1 cepa) y *Lactobacillus paracasei* (1 cepa). Los fosfatos usados fueron los polifosfatos A y B, y el tripolifosfato de sodio – alta solubilidad (TAS), los cuales fueron seleccionados en base a su alta capacidad de secuestrar cationes divalentes. Los ensayos se realizaron en medio de cultivo y en leche reconstituida estéril (LDR, 10 % p/v). A las concentraciones ensayadas no se observaron efectos negativos en la estabilidad de la caseína por el agregado de fosfatos ya que estos valores estuvieron por debajo de los indicados como desestabilizantes. En general, el agregado de TAS a la leche en concentraciones entre 0,3% y 0,5 % (p/v), fue muy efectivo en la inhibición del ciclo lítico. Este fosfato resultó más inhibitorio que los polifosfatos A y B en todos los casos, a

diferentes concentraciones según el sistema estudiado (Tabla 9). Los fagos 046 (*L. lactis*) y MLC-A (*Lb. paracasei*) fueron inhibidos en su replicación por los fosfatos A y B solamente a las máximas concentraciones evaluadas.

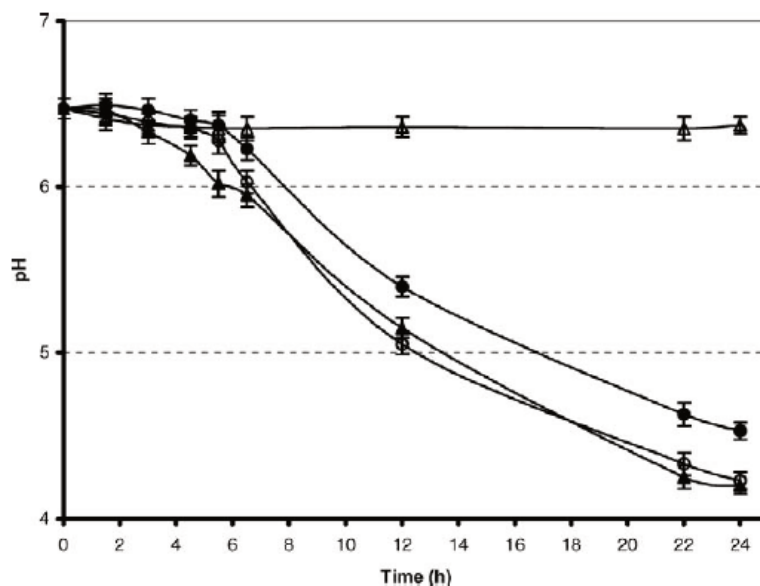
**Tabla 9-** Inhibición del ciclo lítico de fagos de bacterias lácticas por el agregado de fosfatos, en medio de cultivo (Suárez y col., 2020)

Fago	Cepa	Control de lisis		Fosfato (% p/v)								
				A			B			TAS		
		Con/Ca*	Sin/Ca	0,1	0,3	0,5	0,1	0,3	0,5	0,1	0,3	0,5
QF9	CI2 <sup>a</sup>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-
046	13-3 <sup>a</sup>	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Ib3	Ib3 <sup>b</sup>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
MLC-A	A <sup>c</sup>	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+/-	-

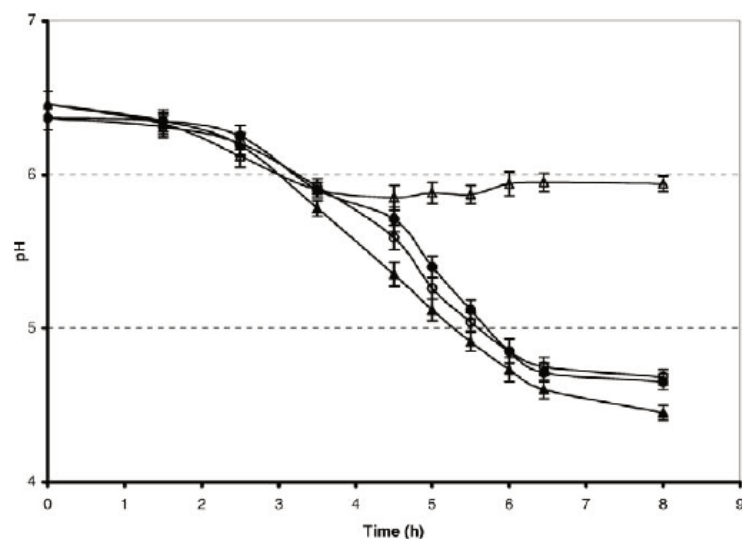
+ lisis completa (O.D.600nm < 0,2, después de 8 h); +/- lisis parcial (O.D.600nm entre 0,2 y 0,8, después de 8 h);  
 - ausencia de lisis (O.D.600nm > 1,0, después de 8 h); <sup>a</sup>*L. lactis*; <sup>b</sup>*Lact. delbrueckii* subsp. *lactis*; <sup>c</sup>*Lact. paracasei*  
 \* concentración final de Ca<sup>2+</sup>: 10mM

Cuando los ensayos (cinéticas de acidificación) fueron realizados en LDR (cinética de acidificación) los resultados obtenidos fueron algo diferentes. En leche, el fosfato TAS adicionado en una concentración de 0,3 %, no inhibió la lisis producida por los fagos QF9 (*L. lactis*) y MLC-A (*Lb. paracasei*), como sí lo había hecho en caldo de cultivo. Para tal fin se necesitaron concentraciones de 0,5 % (Fig. 6). A su vez, los fosfatos A y B no lograron inhibir el ciclo lítico de los fagos 046 y MLC-A, como sí lo habían hecho en medio de cultivo (Tabla 9). Por otra parte, en el caso del fosfato TAS y los fagos Ib3 (*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*) y 046 (*L. lactis*) en leche, la concentración inhibitoria se mantuvo en 0,3 % (p/v) (Fig. 7).





**Fig. 6-** Efecto del agregado de fosfato TAS (0,5 %) en la cinética de acidificación (leche descremada reconstituida 10 % p/v, LDR) de *Lb. paracasei* A y su fago MLC-A, sin ( $\Delta$ ) y con ( $\circ$ ) adición de fosfato (Suárez y col., 2007a). Controles: ( $\bullet$ ) *Lb. paracasei* A y ( $\blacktriangle$ ) *Lb. paracasei* A + fosfato.



**Fig. 7-** Efecto del agregado de fosfato TAS (0,3 %) en la cinética de acidificación (leche descremada reconstituida 10 % p/v, LDR) de *L. lactis* 13-3 y su fago 046, sin ( $\Delta$ ) y con ( $\circ$ ) fosfato (Suárez y col., 2007a). Controles: ( $\bullet$ ) *L. lactis* 13-3 y ( $\blacktriangle$ ) *L. lactis* 13-3 + fosfato.

La evidencia de que, en leche, la actividad de los fosfatos disminuyó (en algunos casos) se podría relacionar con lo afirmado por algunos autores en relación a la concentración de metales iónicos ( $\text{Ca}^{2+}$  en este caso) presentes en el medio (Rajkowski y col., 1994; Zaika y col., 1997). En efecto, los fosfatos adicionados estarían quelando estos cationes libres y no los ligados a la pared celular de los microorganismos.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que algunos fosfatos podrían adicionarse directamente en leche en concentraciones que no provocan disturbios en la estructura micelar, con el objetivo de prevenir posibles ataques de fagos Ca- dependientes. En todos los casos hay que tener muy en cuenta la posibilidad de que la adición de fosfatos provoque un retraso en el desarrollo celular de los fermentos, lo cual habría que evaluar en cada caso particular.

#### 4. Planteo del uso de (poli) fosfatos como antimicrobianos en la industria láctea

Teniendo en cuenta los datos reportados en la bibliografía expuestos anteriormente, es altamente factible plantear el uso de estos compuestos como antimicrobianos en la inhibición de distintos grupos microbianos de interés en el deterioro de productos lácteos.

Como bien se demostró en la revisión previa, la capacidad inhibitoria de los polifosfatos está relacionada con diversos factores, a saber:

- Las bacterias Gram- positivas son más susceptibles que las Gram- negativas, característica que se debería a la diferencia en la composición de la pared celular de ambos grupos. Por otra parte, el nivel de sensibilidad de mohos y levaduras es similar al de bacterias Gram- positivas.

- El valor de pH influye en la actividad de estos compuestos, siendo en general más efectivos en la inhibición a pH neutro o alcalino. La hipótesis es que, a valores de pH alcalinos, estos fosfatos están disociados y, como consecuencia, son más capaces de quelar cationes presentes en el medio.

- Los fosfatos de cadena más larga son más inhibidores, ya que tienen una mayor capacidad secuestrante. A su vez, los de cadena lineal son más inhibidores que los de cadena cíclica.

- La concentración de cationes divalentes en la matriz del alimento determina, en muchos casos, la capacidad inhibitoria de los fosfatos, ya que en matrices con alto contenido de aniones metálicos el poder de quelación o acomplejamiento de los fosfatos se ve disminuido al no tener que competir por ellos.

La potencialidad de los fosfatos para controlar diversos grupos microbianos causantes de alteraciones o patogenicidad en productos lácteos plantea una posibilidad muy interesante de uso, ya que estos compuestos son usados normalmente en la industria (con otros fines) y, además, son muy económicos.

El trabajo experimental realizado en este TFI derivó del análisis metódico de los fosfatos disponibles más usados en la industria, los grupos microbianos frente a los cuales se los podría ensayar y, fundamentalmente, las dosis necesarias en cada caso.

## **CAPÍTULO 2: Trabajo experimental**

UTILIZACIÓN DE FOSFATOS COMO

INHIBIDORES DEL DESARROLLO DE MOHOS

EN LA SUPERFICIE DE QUESOS DURANTE

EL PERÍODO DE MADURACIÓN EN CÁMARA



---

**INTRODUCCIÓN**

Los mohos son contaminantes indeseables en la industria de alimentos, en general, y en la quesera, en particular (Northoldt y col., 1995; Pitt y Hocking, 1997). Los quesos de mediana y baja humedad deben permanecer un tiempo, que puede variar entre uno 1 y 24 meses, a una temperatura constante entre 10 °C y 18 °C, según el tipo de queso. En este período (maduración), la cuajada moldeada y salada adquiere textura, sabor y aroma característicos, propios de cada uno de los cientos de tipos de quesos que se comercializan en el mundo. El proceso de maduración se lleva a cabo en cámaras diseñadas para tal fin donde, además de la temperatura, se controla la humedad relativa. Esta última normalmente se debe mantener entre el 80 % y 85 % para evitar un secado excesivo de la superficie que, inexorablemente, llevaría a la formación de una corteza demasiado gruesa con la consiguiente pérdida de peso y calidad. Además, una cámara demasiado seca puede generar distintos defectos en la superficie, entre los que se encuentra la formación de rajaduras que permiten el ingreso de contaminaciones al interior de la masa provocando un rápido deterioro del producto.

La humedad relativa de la cámara, asociada a la temperatura y el valor de pH del queso, es un medio propicio para el desarrollo, en superficie, de una microbiota donde predominan mohos y levaduras. Si este desarrollo microbiano no se controla adecuadamente a lo largo de esta etapa se producen defectos en la superficie, que en algunas circunstancias se logran solucionar con la remoción de una parte de la costra por raspado, metodología que requiere de mano de obra y pérdida considerable de rendimiento en el peso de las hormas. En los casos más extremos, los mohos llegan al interior de las mismas y la pérdida puede llegar a ser total. Por otra parte, el desarrollo de esta microbiota

fúngica superficial puede dar lugar a la aparición de ácaros, que se alimentan de los esporos. Estos arácnidos “roen” la cáscara e ingresan en la masa, produciendo inevitablemente la pérdida total del producto. Este problema es de difícil erradicación ya que, si avanza, se instala no solo en el queso sino también en las estanterías y en toda la sala de maduración.

Para prevenir el desarrollo fúngico, la industria dispone comercialmente de una pintura a base de acetato de polivinilo adicionada de pimaricina (también denominada natamicina) como principio activo, que se usa frecuentemente debido a su elevada eficiencia, a pesar de su elevado costo. La pimaricina es considerada GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*) de los EEUU, aunque en algunos países se está cuestionando su uso. Métodos alternativos están propuestos en la literatura para controlar el crecimiento de mohos en la superficie de los quesos, tales como tratamiento de ahumado (Wendorff y col., 1993), inoculación de mohos antagónicos no tóxicos (Salvadori del Prato, 1998) y aplicación de aceite de oliva (Wendorff y Wee, 1997; Salvadori del Prato, 1998; Quinto y col., 2007), los cuales han demostrado tener resultados diversos. En algunas variedades, este desarrollo superficial es indeseable y puede causar grandes pérdidas económicas y de calidad (Kure y col., 2001). Por otra parte, los mohos pueden producir metabolitos secundarios y *flavour* indeseables. Diversos autores (Kure y col., 2004; Montagna y col., 2004; Hayaloglu y Kirbag, 2007) han aislado mohos de la superficie de quesos con períodos de mediana maduración, determinando que *Penicillium* fue, indudablemente, el género predominante en todos los casos.

Teniendo en consideración la revisión realizada en el Capítulo 1 del presente trabajo, se planteó la posibilidad del uso de polifosfatos disponibles en el INLAIN para ensayar una

metodología totalmente novedosa que protegiera a quesos de mediano y bajo contenido de humedad del desarrollo fúngico en cámara de maduración.



### **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo de este trabajo fue poner a punto una metodología simple y alternativa a las existentes en la industria, para el control de microbiota fúngica en la superficie de quesos de mediana y larga maduración, mediante el uso de polifosfatos de cadena larga (entre 15 y 20 unidades).

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Diseñar las posibles formas de aplicación de los fosfatos en la superficie de los quesos.
- Determinar, en cada caso, la concentración de fosfatos más conveniente a ser utilizada.
- Evaluar el crecimiento fúngico superficial durante la maduración, utilizando quesos tipo Sardo como modelo de estudio.
- Analizar los resultados y ajustar la metodología de manera de lograr la máxima sencillez y eficacia en la técnica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Quesos: elaboración y características*

Los quesos utilizados en este estudio fueron suministrados por la empresa MILKAUT S.A. Lo mismos fueron quesos grasos (45,0 - 59,9 % de materia grasa sobre extracto seco) y de baja humedad (menos del 35,9 %) (Art. 605 CAA.), tipo Sardo, todos provenientes del mismo proceso de elaboración. Luego de salir de prensa presentaron las siguientes características: MS (materia seca)= 62,3 %, pH= 5,13 y GMS (grasa en materia seca)= 54,8 %. Luego del prensado se llevaron a salmuera durante 7 días, se orearon durante 24 h y se envasaron al vacío, siendo luego trasladados a la planta piloto del INLAIN para realizarles los tratamientos previos a la etapa de maduración. El esquema de elaboración de los quesos se muestra en la Fig. 8.

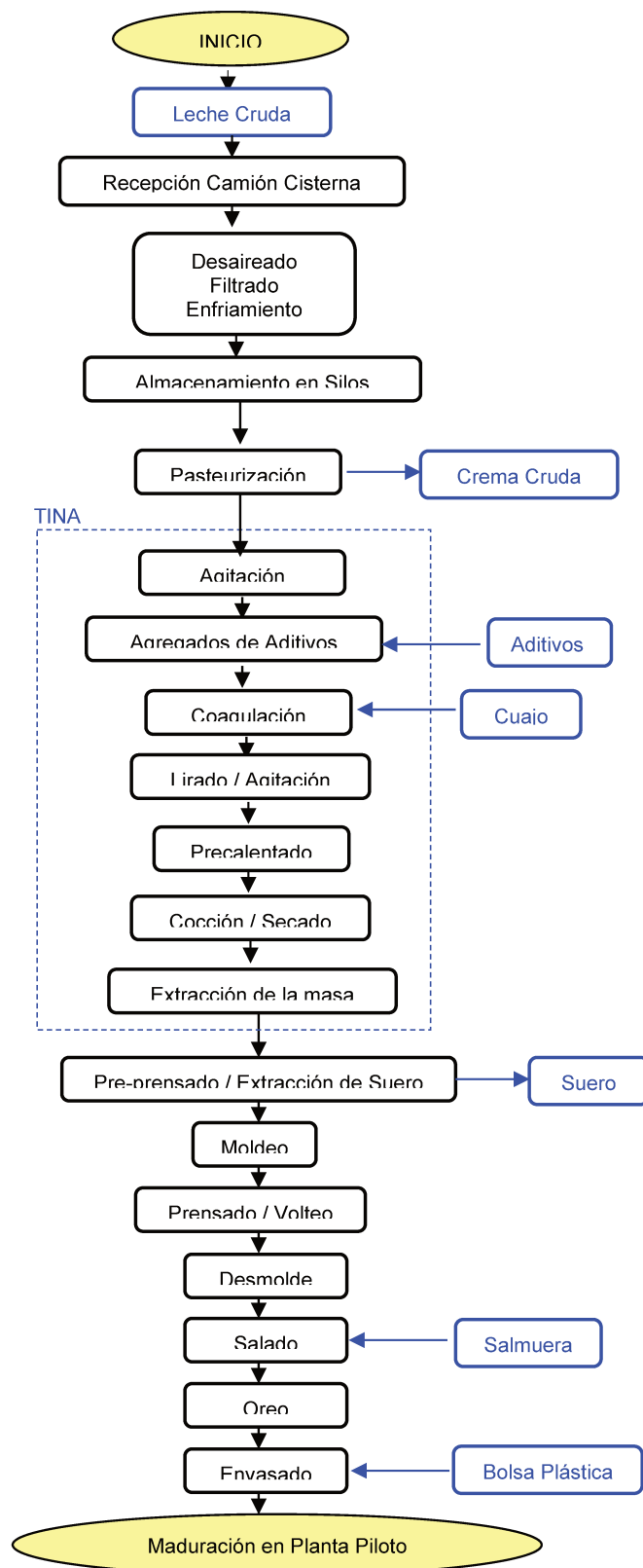


Fig. 8- Esquema de la elaboración de los quesos utilizados en el estudio.

**Fosfatos utilizados en el ensayo**

Para el ensayo se utilizaron dos polifosfatos suministrados por la empresa SUDAMFOS S.A. (Argentina), denominados A y B. Estos fosfatos fueron seleccionados teniendo en cuenta los resultados obtenidos en un estudio previo (Suárez y col., 2005). Las características de los mismos se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10-** Características de los fosfatos utilizados en la experiencia (Suárez y col., 2005)

<b>Fosfato (nombre)</b>	<b>Composición (unidades fosfato)</b>	<b>Capacidad secuestrante<sup>a</sup> (g Ca / 100 g fosfato)</b>	<b>Porcentaje de microorganismos inhibidos con 0,1 % (p/v) de fosfato, en medio de cultivo<sup>b</sup>.</b>
<b>A</b>	15 - 20	15	76,4
<b>B</b>	15 - 20	15	88,2

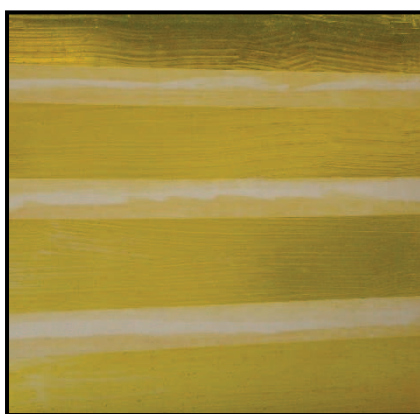
<sup>a</sup> valores para 1,2 % de fosfatos (declarados por el proveedor). pH ~ 7,0

<sup>b</sup> Sobre un total de 17 mohos aislados de alimentos

---

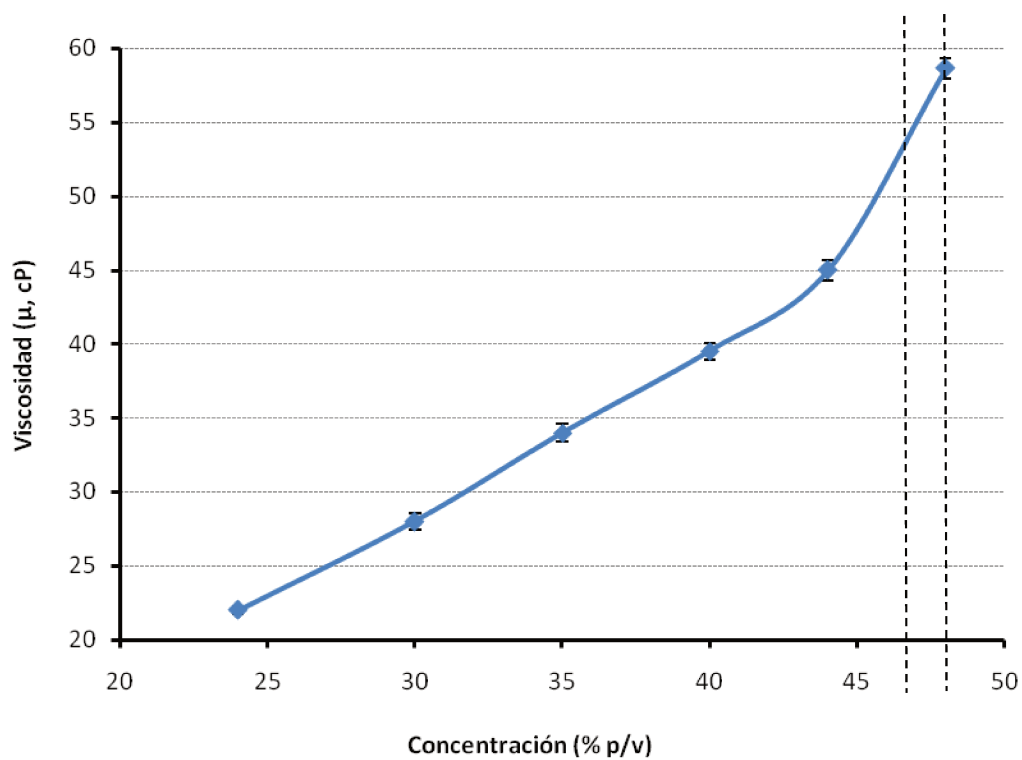
### **Concentración y adición de polifosfatos**

La primera idea fue adicionar los polifosfatos A y B, individualmente, directamente a una pintura a base de acetato de polivinilo (DERPLAST S, Marca DONCA S.A., Gualeguaychú, Argentina), de manera de asimilar el procedimiento al realizado con pintura comercial con agregado de pimaricina y, de esta manera, intentar simplificar la metodología. Con ese objetivo, se procedió a adicionar distintas cantidades de polifosfatos a la pintura base (a partir de una solución saturada de los mismos en agua) y se ensayó evaluar las características de la película formada sobre los quesos (homogeneidad y cubrimiento) de manera visual, lo cual resultó muy complicado. Se optó, entonces, por realizar la experiencia sobre una superficie de vidrio transparente, la cual se fue pintando con la pintura adicionada de distintas concentraciones de fosfatos, observándose que, a medida que aumentaba la concentración de estos, la pintura perdía la capacidad de distribuirse en forma homogénea y continua (Fig. 9) sobre la superficie. Mediante este procedimiento se pudo determinar que la concentración más apropiada de polifosfatos para trabajar fue de 60 % (v/v).



**Fig. 9-** Superficie transparente, pintada con pintura polivinílica adicionada de distintas concentraciones (decrecientes de arriba abajo), para ambos polifosfatos.

Otra estrategia metodológica fue intentar cubrir la superficie de los quesos, aplicando directamente una solución acuosa de polifosfato (siempre evaluándolos de manera individual), tratando de formar una película suficientemente adherente y estable. Para tal fin, se procedió primero a medir la evolución de la viscosidad de dichas soluciones, en distintas concentraciones, hasta su punto de saturación (aprox. 50 % p/v). Como se observa claramente en la Fig. 10, la concentración de polifosfatos modificó notablemente su comportamiento a partir del valor de 44 % (p/v). Por debajo de la misma, la formación de una película sobre la superficie de los quesos no fue posible, ya que el fluido escurre (fluye) fácilmente, posiblemente debido a su comportamiento Newtoniano. A partir de ese punto de inflexión (44 %), la composición comenzó a mostrar un comportamiento tendiente a los observados para los fluidos plásticos, los cuales modifican su ángulo de deformación con el esfuerzo de corte, necesitando superar un valor base para fluir, es decir presentó una mayor resistencia al escurrimiento. Este cambio estuvo acompañado de un cambio de apariencia de la solución que, a partir de esa concentración, fue similar a la de un gel. Otra modificación observada fue el aumento de la opacidad a partir de una concentración de 40 % lo cual permitió apreciar con más facilidad, visualmente, que el recubrimiento fuera completo y uniforme de la superficie de los quesos tratados. Es importante destacar que la composición seleccionada (47 - 49 %) resultó ser estable dentro de los tiempos tecnológicos usualmente manejados en la industria (no se observó separación de fases).



**Fig. 10-** Evolución del parámetro viscosidad (cP) con la concentración de polifosfatos A y B (entre líneas de puntos, el rango de concentración de trabajo).

La relación entre la viscosidad y la capacidad de cobertura de la solución de ambos polifosfatos, a distintas concentraciones, sobre la superficie de los quesos se muestra en la Tabla 11.

**Tabla 11-** Capacidad de cobertura (visual) de la solución de polifosfatos (A y B, evaluados en forma separada), en función de la concentración.

Concentración (% p/v)	Viscosidad <sup>1</sup> (cP)	Cobertura satisfactoria
24	21,96 ± 0,25	- (negativo)
30	27,95 ± 0,55	- (negativo)
35	34,16 ± 0,63	- (negativo)
40	39,50 ± 0,55	- (negativo)
44	45,10 ± 0,69	+/- (dudoso)
48	58,63 ± 0,65	+ (positivo)

<sup>1</sup> La viscosidad (valor medio ± DS) fue medida en un Viscosímetro Haake – Kugelfall, a 25 °C (N= 6). Estos valores corresponden a los representados en la Fig. 10.

La capacidad de cobertura se muestra en la Fig. 11, para una concentración de ambos polifosfatos entre 47- 49 %. Si bien a una concentración de 44 % se comenzó a observar, en algunos casos, un buen recubrimiento (datos no mostrados), cuando se utilizó una concentración dentro del rango mencionado el recubrimiento fue total.



**Fig. 11-** Vista de la superficie de los quesos luego de la inmersión (15 - 20 seg) en solución de polifosfatos (A o B) 48 % (p/v), en agua.



La forma de operar fue por inmersión, directamente en cubetas conteniendo la solución, ya que resultó más sencillo y rápido que realizar el recubrimiento con pincel y, además, es lo que se utiliza en la industria. Otra opción, si bien aún no ha sido probada, sería formar la capa de polifosfatos por aplicación por aspersion.

**Diseño experimental**

Para el estudio se compararon distintos tratamientos para realizar el recubrimiento de los quesos. Los mismos fueron:

**Testigo I:** queso pintado con pintura comercial antimoho transparente (DERPLAST S10, DONCA S.A., Gualeguaychú, Argentina) a base de acetato de polivinilo, agua, sorbato de potasio, pimaricina y ácido cítrico.

**Testigo II:** queso pintado con pintura comercial transparente (DERPLAST S, DONCA S.A., Gualeguaychú, Argentina), a base de acetato de polivinilo y agua.

**Experimental I:** tratamiento por inmersión en solución saturada de polifosfato A (aprox. 45 %, p/v), sin pintar (Fig. 11).

**Experimental II:** tratamiento por inmersión en solución saturada de polifosfato B (aprox. 45 %, p/v), sin pintar.

**Experimental III:** tratamiento por inmersión en solución saturada de polifosfato A, secado y recubrimiento con DERPLAST S (Fig. 12) (con pincel).

**Experimental IV:** tratamiento por inmersión en solución saturada de polifosfato B, secado y recubrimiento con DERPLAST S.

**Experimental V:** recubrimiento con DERPLAST S (con pincel), adicionado de 60 % (v/v) de solución saturada de polifosfato A.

**Experimental VI:** recubrimiento con DERPLAST S, adicionado de 60 % (v/v) de solución saturada de polifosfato B.

**Experimental VII:** tratamiento por inmersión en solución saturada de polifosfato A, secado y recubrimiento con DERPLAST S adicionado de 60 % (v/v) de solución saturada de polifosfato A.

**Experimental VIII:** Tratamiento por inmersión en solución saturada de polifosfato B, secado y recubrimiento con DERPLAST S adicionado de 60 % (v/v) de solución saturada de polifosfato B.

**Experimental IX:** tratamiento por inmersión en solución saturada de polifosfato A, secado y recubrimiento con DERPLAST S adicionado de 60 % (v/v) de solución saturada de polifosfato B.

**Experimental X:** tratamiento por inmersión en solución saturada de polifosfato B, secado y recubrimiento con DERPLAST S adicionado de 60 % (v/v) de solución saturada de polifosfato A.



**Fig. 12-** Proceso de cobertura de las superficies de los quesos con la pintura polivinílica.

El tiempo de secado de las superficies recubiertas con las soluciones de polifosfatos luego de la inmersión y previo a la cobertura con pintura resultó ser un punto crucial ya que, si los quesos se pintaban sin estar debidamente secos, no se lograba formar una cobertura homogénea. El tiempo de oreado, antes del pintado, se determinó en una 1 hora (mínimo) para asegurar un adecuado nivel de humedad superficial.

Si bien la cobertura con pintura base luego de la inmersión de solución de polifosfatos se realizó con pincel (debido al bajo número de quesos con los que se trabajaba) esta operación, en la industria, podría perfectamente ser reemplazada por un pintado por aspersión.

En relación al agregado de un 60 % (v/v) de solución saturada de ambos polifosfatos a la pintura DERPLAST S, se pudo observar que, con el tiempo, la misma cambiaba sus características físicas, incrementando su viscosidad. Al cabo de una hora la pintura se transformaba en un gel que, al agitarlo, mostraba la presencia de grumos pequeños, lo cual dificultó la aplicación con pincel.

Luego de realizar todos los tratamientos, las hormas se llevaron a la cámara de maduración del INLAIN, como se muestra en la Fig. 13, la cual se mantuvo a una temperatura de 14 °C y una humedad relativa del  $80 \pm 3$  %. El proceso de maduración y seguimiento/control fue de 6 meses.



**Fig. 13-** Quesos con distintos tratamientos, en cámara de maduración.

***Seguimiento y control del desarrollo fúngico***

La evaluación se realizó mediante observaciones semanales, registrando fotográficamente la evolución de cada tratamiento para poder compararlos. Debido a que no existe una metodología analítica microbiológica estandarizada para valorar la concentración fúngica en la superficie de los quesos, se procedió a realizar una valoración semicuantitativa, establecida por criterio propio. La misma consistió en evaluar en las hormas el desarrollo de mohos en 5 secciones de 1 cm<sup>2</sup> ubicadas en las caras laterales e igualmente separadas entre sí. El criterio adoptado para la expresión e interpretación de los resultados fue: (-) ausencia de crecimiento en todas las secciones, (+) crecimiento de < 50 %, (++) crecimiento entre 50 - 75 %, y (+++) crecimiento del 100 %, en todas las secciones. Para la evaluación se consideró solamente la cara lateral, desatendiendo la evolución de las bases, de manera de excluir posibles desviaciones producidas por el roce de las bases de las hormas en el pintado y en los sucesivos volteos. Las experiencias se realizaron por duplicado, y se consideraron solamente los tratamientos más eficientes.

***Evaluación sensorial***

Este ensayo se realizó para descartar que los polifosfatos otorgaran algún atributo diferente frente al testigo y, para tal fin, se utilizó el método del triángulo (Santa Cruz y col., 2005). Este método es un *test* de discriminación por medio de una prueba de diferencia global, y los panelistas no deben seleccionar por preferencia, aceptación y grado o naturaleza de la diferencia. Se utilizó un panel de 24 evaluadores (no entrenados pero familiarizados con el producto) los que recibieron tres muestras codificadas, dos iguales y una diferente. La experiencia se realizó a temperatura ambiente, en cuatro boxes independientes, los cuales estaban separados de la habitación principal donde se preparaban las muestras. Las mismas se tomaron descartando 2 mm de corteza y evaluando dentro de los 10 mm siguientes (Fig. 14). Mediante examen visual, tacto, olfato y gusto, los panelistas debieron detectar la muestra diferente (Fig. 15). Los resultados correctos (identificación de la muestra diferente) se contaron y se relacionaron con las muestras totales analizadas. Mediante el uso de tablas estadísticas (Santa Cruz y col., 2005) fue posible determinar si había diferencia significativa entre las muestras experimentales y el control ( $\alpha= 0,05$ ).



**Fig. 14-** Muestreo para la evaluación sensorial de los quesos tratados con cobertura adicionada de polifosfatos.

<b>Evaluación sensorial (Test triangular)</b>		
Nombre:	Fecha:	
Evaluador (número):		
<p>Ud. recibirá tres muestras, dos iguales y una diferente. Por favor, analice las muestras de izquierda a derecha mediante observación visual, textura, olor y sabor e identifique cuál es la diferente.</p>		
614	896	264

**Fig. 15-** Formato modelo usado para la evaluación sensorial

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los quesos **Experimentales I y II** (tratados por inmersión en solución acuosa de polifosfatos, sin recubrimiento de pintura) mostraron un rápido desarrollo fúngico. En efecto, a los 27 d de maduración, la superficie de los quesos se encontraba completamente cubierta (Fig. 15), incluso en peores condiciones que los quesos **Testigo II**, recubiertos solamente con pintura (sin agregado de natamicina). Estos resultados pudieron deberse a que la película no fue lo suficientemente adherente (como una pintura) y perdió su capacidad de cobertura con el tiempo y las condiciones de cámara. Estas experiencias se dieron por finalizadas y se prosiguieron los ensayos de los restantes tratamientos.



**Fig. 15-** Queso con tratamiento por inmersión en solución acuosa de polifosfatos (A o B), a los 27 d de maduración (**Experimentales I y II**).

Los resultados, obtenidos a los seis meses de maduración, se presentan en la Tabla 12. Como puede observarse en la misma, las experiencias más exitosas fueron las que incluyeron las superficies tratadas por inmersión más pintura sin polifosfatos (**III y IV**) e



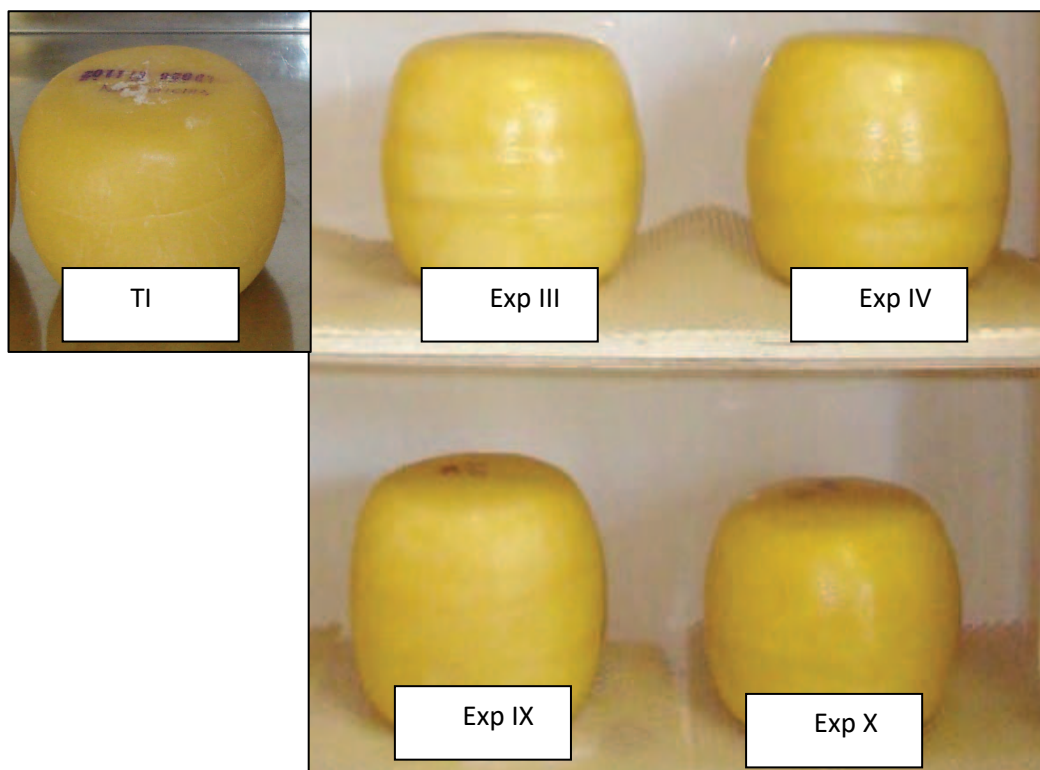
inmersión más pintura con polifosfatos cruzados (**IX** y **X**). Los resultados fueron coincidentes con los obtenidos en los quesos **Testigo I** (queso control).

**Tabla 12-** Crecimiento de mohos en la superficie de los quesos, con distintos tratamientos antifúngicos, a los seis meses de maduración.

<i>Tratamiento superficial</i>	<i>Extensión del desarrollo fúngico<sup>a</sup></i>
<b>Testigo I (control)</b>	+
<b>Testigo II</b>	+++
<b>Exp III y IV</b>	+
<b>Exp V y VI</b>	++
<b>Exp VII y VIII</b>	++
<b>Exp IX y X</b>	+

<sup>a</sup> valoración del desarrollo según lo indicado en Materiales y Métodos

Los quesos pertenecientes a los Ensayos **IX** y **X** mostraron mayor “higroscopicidad” por lo que, con la humedad de la cámara, la superficie se observó opaca y pegajosa. Si bien estos quesos mantuvieron una aceptable conservación en relación al desarrollo fúngico, no se los seleccionó para la evaluación sensorial debido a que los experimentales **III** y **IV** provenían de metodologías más simples, económicas y con igual resultado. Los resultados se muestran en la Fig. 16.



**Fig. 16-** Aspecto de los quesos luego de seis meses de maduración, correspondientes a los ensayos exitosos.

En relación a otros métodos de conservación, Quinto y col. (2007) demostraron que el tratamiento superficial con aceite de oliva de quesos tipo Canestrato Pugliese no resultó eficiente para inhibir el crecimiento de mohos durante 100 d de maduración. En efecto, estos resultados acuerdan con estudios previos, en los que se demuestra que, si la corteza aún no está formada, el aceite sirve de sustrato para el desarrollo de mohos. Sin embargo, si se aplica cuando la corteza ya está formada los resultados varían, actuando el aceite como una barrera al oxígeno, inhibiendo el desarrollo fúngico (Wendorff y col., 1993; Wendorff and Wee, 1997). Por otra parte, también está propuesto el tratamiento con ahumado líquido en algunos tipos de quesos como otra alternativa a utilizarse, aunque,

en este caso, la capacidad de inhibición fúngica observada fue débil (Holley y Patel, 2005; Quinto y col., 2007).

En relación a la evaluación sensorial de los quesos, se comparó solamente los **Testigos I** con los **Experimentales III y IV**, seleccionados en base a su simplicidad y buenos resultados, frente a los **Experimentales IX y X**. El número de respuestas correctas (diferenciación de la muestra distinta) fue de 12 sobre 24, en la primera experiencia, y de 11 sobre 24 en la segunda. Utilizando una tabla estadística, basada en una distribución binomial (Santa Cruz y col., 2005), se demostró que no hubo diferencias significativas ( $\alpha=0,05$ ) en las características sensoriales de los quesos testigos y los quesos experimentales ensayados. Según esta tabla, el número mínimo de respuestas correctas para considerar distintas las dos muestras, para ese nivel de confianza y 24 evaluadores, es de 13. Por lo tanto, se puede asegurar que las muestras experimentales no difirieron, en sus características organolépticas generales, del queso testigo. Si bien, tanto el aceite de oliva como el ahumado, son técnicas que se usan normalmente en la industria alimenticia para otorgar *flavour* a los productos, en este caso, estos compuestos podrían alterar las características organolépticas del producto final, lo que constituiría un efecto negativo.

## **CONCLUSIONES**

- El diseño experimental del TFI correspondió a una interesante propuesta aplicativa en relación a los polifosfatos, más allá de sus usos convencionales en la industria alimentaria.

- Los resultados fueron altamente satisfactorios, ya que se logró detener el desarrollo fúngico durante el período de maduración ensayado, prácticamente a nivel del control, en cuatro (4) de las experiencias planteadas. Se seleccionó la metodología más sencilla, desde el punto de vista industrial, para reproducir las experiencias y la misma se reivindicó en la Patente AR084987B1, la cual se expone al final del presente trabajo.

- Mediante el análisis estadístico se confirmó la no existencia de diferencias significativas entre los quesos experimentales y el control, en lo referente a la evaluación sensorial, utilizando el método triangular.

- El uso de polifosfatos a través de esta nueva metodología es un avance importante comparada con el uso de la natamicina como agente antifúngico aplicado a la superficie de quesos durante la maduración. El costo de los polifosfatos es significativamente menor, siendo estos compuestos GRAS y estando disponibles comúnmente en la industria quesera para ser usados con otros fines. Además, el uso de la natamicina está siendo reevaluado en algunos países.

- Los resultados obtenidos permiten concluir que los polifosfatos de cadena larga pueden utilizarse como antifúngicos superficiales en quesos de medio y bajo contenido de humedad.

A photograph of a cheese-making workshop. The room has wooden walls and a wooden ceiling. In the background, there are wooden shelves filled with many wheels of cheese. In the foreground, there is a wooden table with a black and white checkered floor underneath. On the table, there are several wheels of cheese, some in white containers, and a wooden barrel. The text "REFERENCIAS" and "BIBLIOGRÁFICAS" is overlaid on the image.

**REFERENCIAS**

**BIBLIOGRÁFICAS**

- Akhtar, S.; Paredes-Sabja, D.; Sarker, M. (2008). Inhibitory effects of polyphosphates on *Clostridium perfringens* growth, sporulation and spore outgrowth. *Food Microbiology* 25, 802-808.
- Eckner, K.F.; Dustman, W.A.; Rys-Rodriguez, A.A. (1994). Contribution of composition, physicochemical characteristics and polyphosphates to the microbial safety of pasteurized cheese spreads. *Journal of Food Protection* 57, 295-300.
- Fernández, L.; Escobedo, S.; Gutiérrez, D.; Portilla, S.; Martínez, B.; García, P.; Rodríguez, A. (2017). Bacteriophages in the Dairy Environment: From Enemies to Allies. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 6 (4), 27. <https://doi.org/10.3390/antibiotics6040027>.
- Frank, J.; Hassan, A. (1998). Starter cultures and their use (Chapter 6). In: *Applied Dairy Microbiology*, Marth, E. H. and Steele, J. L. (Eds.). Marcel Dekker Inc., pp. 149-160.
- Hayaloglu, A.A.; Kirbag, S. (2007). Microbial quality and presence of moulds in Kuflu cheese. *International Journal of Food Microbiology* 115, 376–380.
- Holley, R.A.; Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology* 22, 273–292.
- Ibrahim, S.A.; Daguri, M.H. (1996). Bulk starter media for mesophilic starter cultures: a review. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 16, 823-828.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications). (1980). *Ecología microbiana de los alimentos 2 - Productos alimenticios*. Acribia S.A., Zaragoza, España.
- Jen, C.M.; Shelef, L.A. (1986). Factors affecting sensitivity of *Staphylococcus aureus* 196E to polyphosphates. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 842-846.
- Josephsen, J.; Neve, H. (2004). Bacteriophage and antiphage mechanisms of lactic acid bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Funtional Aspects* (2° edition), Salminen, S. and Wright, A.V. (Eds.). Marcel Dekker Inc., pp 385-436.

- Khanipour, E.; Flint, S.; McCarthy, O.; Golding, M.; Palmer, J.; Ratkowsky, D.; Ross, T.; Tamplin, M. (2016). Modelling the combined effects of salt, sorbic acid and nisin on the probability of growth of *Clostridium sporogenes* in a controlled environment (nutrient broth). *Food Control* 62, 32-43.
- Knabel, S.J.; Walker, H.W.; Hartman, P.A. (1991). Inhibition of *Aspergillus flavus* and selected Gram-positive bacteria by chelation of essential metal cations by polyphosphates. *Journal of Food Protection* 54, 360-365.
- Kure, C. F.; Skaar, I.; Brendehaug, J. (2004). Mould contamination in production of semi-hard cheese. *International Journal of Food Microbiology* 93, 41–49.
- Kure, C. F.; Wasteson, Y.; Brendehaug, J.; Skaar, I. (2001). Mould contaminants on Jarlsberg and Norvegia cheese blocks from four factories. *International Journal of Food Microbiology* 70, 21–27.
- Lebron, C. I.; Molins, R.A.; Walker H.W.; Kraft, A. A.; Stahr, H. M. (1989). Inhibition of growth and aflatoxin production of aspergilli in medium containing phosphates, *Journal of Food Protection* 52, 4-6.
- Lee, R.M.; Hartman P.A.; Olson, D.G.; Williams, F.D. (1994b). Metal ions reverse the inhibitory effects of selected food-grade phosphates in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection* 57, 284-288.
- Lee, R.M.; Hartman, P.A.; Olson, D.G.; Williams, F.D. (1994a). Bactericidal and bacteriolytic effects of selected food-grade phosphates, using *Staphylococcus aureus* as a model system. *Journal of Food Protection* 57, 276-283.
- Lee, R.M.; Hartman, P.A.; Stahr, H.M.; Olson, D.G.; Williams, F.D. (1994c). Antibacterial mechanism of long-chain polyphosphates in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection* 57, 289-294.

- Loessner, M.J.; Maier, S.K.; Schiwiek, P.; Scherer, S. (1997). Long-chain phosphates inhibit growth of *Clostridium tyrobutyricum* in processed cheese spreads. *Journal of Food Protection* 60, 493-498.
- Maier S.K.; Scherer S.; Loessner M. (1999). Longchain polyphosphate causes cell lysis and inhibits *Bacillus cereus* septum formation, which is dependent on divalent cations. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3942.
- Moineau, S. ; Lévesque, C. (2005). Control of bacteriophages in industrial fermentations. In: *Bacteriophages: biology and applications*, Kutter E. and Sulakvelidze, A. (Eds.). CRC Press, Boca Ratón, pp. 285-296.
- Molins, R.A. (1991). *Phosphates in food*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Molins, R.A.; Kraft, A.A.; Olson, D.G.; Hotchkiss, D.K. (1984). Recovery of selected bacteria in media containing 0.5% food grade poly- and pyrophosphates. *Journal of Food Science* 49, 948-949.
- Montagna, M.T.; Santacroce, M. P.; Spilotros, G.; Napoli, C.; Minervini, F.; Papa, A.; Dragoni, I. (2004). Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern Italy. *Mycopathologia* 158, 245–249.
- Nelson, K.A.; Busta, F.F.; Sofos, J.N.; Wagner, W.K. (1983). Effect of polyphosphates in combination with nitrite-sorbate or sorbate on *Clostridium botulinum* growth and toxin production in chicken frankfurter emulsions. *Journal of Food Protection* 46, 846-850.
- Northolt, M.D.; Frisvad, J.C.; Samson, R.A. (1995). Occurrence of food-borne fungi and factors for growth. In: *Introduction to food-borne fungi (4<sup>th</sup> edition)*, Samson, R., Hoekstra, E., Frisvad, J. and Filtenborg, O. (Eds.). Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands, pp. 243-285.
- Obritsch, J.; Ryu, D.; Lampila, L.; Bullerman, LL. (2008). Antibacterial Effects of Long-Chain Polyphosphates on Selected Spoilage and Pathogenic Bacteria. *Journal of Food Protection* 71, 1401-1405.



- Oliveira, R.; Margalho, L.; Nascimento, J.; Costa, L.; Portela, J.; Cruz, A.; Sant'Ana, A. (2016). Processed cheese contamination by spore-forming bacteria: A review of sources, routes, fate during processing and control. *Trends in Food Science and Technology* 57, 11-19.
- Pitt, J.I.; Hocking, A.D. (1997). *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic and Professional, London.
- Post, F.J.; Coblenz, W.S.; Chou, T.W.; Salumke, D.K. (1968). Influence of phosphate compounds on certain fungi and their preservative effects on fresh cherry fruit (*Prunus cerasus*, L.). *Applied Microbiology* 16, 138-142.
- Post, F.J.; Krishnemurthy, G.B.; Flanagan, M.D. (1963). Influence of sodium hexametaphosphate on selected bacteria. *Applied Microbiology* 11, 430-435.
- Quinto, M.; Spadaccino, G.; Rotunno, T.; Sinigaglia, M.; Ciccarone, C.; Fox, P.F. (2007). Effects of different surface treatments on ripening of Canestrato Pugliese cheese. *International Dairy Journal* 17, 1240–1247.
- Rajkowski, K.T.; Calderone, S.M.; Jones, E. (1994). Effect of polyphosphate and sodium chloride on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in ultra-high temperature milk. *Journal of Dairy Science* 77, 1503-1508.
- Ray, B.; Bunia, A. (2007). Indicators of microbial food spoilage (Chapter 22). In: *Fundamental Food Microbiology* (4<sup>th</sup> edition). CRC Press, Boca Ratón, pp. 245-250.
- Salvadori del Prato, O. (1998). *Trattato di Tecnologia Casearia*. Bologna, Italy: Edagricole.
- Samson, J.; Moineau, S. (2013). Bacteriophages in food fermentations: new frontiers in a continuous arms race. *Annual Review of Food Science and Technology* 4, 347-368.
- Santa Cruz, M.; Martínez, C.; Varela, P. (2005). Principios básicos de análisis sensorial. En *Estimación de la vida útil sensorial de los alimentos*, Hough, G. y Fiszman, S. (Eds.). Programa CYTED Amanuel 4, Madrid, pp. 17-41.

- Shelef, L.A.; Seiter, J.A. (2005). Indirect and Miscellaneous Antimicrobials (Chapter 7). En: Antimicrobials in Food (3<sup>th</sup> edition), Davidson, P., Sofos, J. and Branen, A. (Eds). CRC Press, Boca Ratón, pp.574 – 619.
- Sobrero, M.S. (2002). Identificación de mohos en el proceso de elaboración de jugos cítricos. Tesis para acceder al grado académico de Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.
- Sofos, J.N. (1986). Use of phosphates in low-sodium meat products. *Food Technology* 40, 52-68.
- Sofos, J.N.; Busta, F.F. (1980). Alternatives to the use of nitrite as an antibotulinal agent. *Food Technology* 34, 244-251.
- Suárez, V.B.; Capra, M.L.; Rivera, M.; Reinheimer, J.A. (2007a). Inactivation of calcium-dependent lactic acid bacteria phages by phosphates. *Journal of Food Protection* 70, 1518-1522.
- Suárez, V.B.; Carrasco, M.; Frisón, L.; Basílico, M. de; Simonetta, A.; Rivera, M.; Reinheimer, J.A. (2007b). Inhibición por fosfatos de grupos microbianos alteradores de interés en alimentos. *La Alimentación Latinoamericana* 268, 50-57.
- Suárez, V.B.; Carrasco, M.; Simonetta, A.; Rivera, M.; Reinheimer, J.A. (2007c). Phosphates as inhibitors of yeasts isolated from food sources. *Italian Journal of Food Science* 19, 255-262.
- Suárez, V.B.; Frisón, L.; Basílico, M.Z. de; Rivera, M.; Reinheimer, J.A. (2005). Inhibitory activity of phosphates on moulds isolated from foods and food processing plants. *Journal of Food Protection* 68, 2475 - 2479.
- Suárez, V.B.; Reinheimer, J.A.; Meinardi, C. (2020). Fosfatos como antimicrobianos y antivirales en la industria láctea. Uso como antifúngico en quesos de mediana y larga maduración (Capítulo 7). En: Avances y tendencias en la industria láctea. La contribución argentina desde el INLAIN, Reinheimer, J. (Ed.). Ediciones UNL, pp. 187-203.

- Wagner, M.; Busta, F. (1985). Inhibition of *Clostridium botulinum* 52A Toxicity and Protease Activity by Sodium Acid Pyrophosphate in Media Systems. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 16-20.
- Wendorff, W. L.; Riha, W. E.; Muehlenkamp, E. (1993). Growth of moulds on cheese treated with heat or liquid smoke. *Journal of Food Protection* 56, 963–966.
- Wendorff, W.; Wee, C. (1997). Effect of smoke and spice oils on growth of moulds on oil-coated cheeses. *Journal of Food Protection* 60, 153–156.
- Whitehead, W.E.; Ayres, J.W.; Sandine, W.E. (1993). Symposium: Recent developments in dairy starter cultures: Microbiology and Physiology. *Journal of Dairy Science* 76, 2344-2353.
- Zaika, L.; Kim, A. (1993). Effect of Sodium Polyphosphates on Growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 56, 577-580.
- Zaika, L.; Scullen, J.; Fanelli, J. (1997). Growth Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Sodium Polyphosphate as Affected by Polyvalent Metal Ions. *Journal of Food Science* 62, 867-872.



**FINANCIACIÓN Y**

**PRODUCCIÓN CIENTÍFICA**

## **FINANCIACIÓN DEL TRABAJO FINAL INTEGRADOR**

Contrato para actividades de asistencia técnica entre SUDAMFOS S.A. y UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL. **Título:** “Evaluación de la acción de fosfatos como antihongos en la superficie de quesos duros”. Exp. N° 531934. Fecha: 03/Nov/2008. Se adjunta, al final del TFI, la correspondiente documentación validatoria.

- Las hormas de queso Sardo para el estudio experimental fueron cedidas gentilmente por Milkaut S.A.

## **TRANSFERENCIAS DERIVADAS DEL TRABAJO FINAL INTEGRADOR**

### ***Publicaciones***

“Polifosfatos como nuevos antifúngicos aplicados en la superficie de quesos durante la maduración”. V. Suárez, Tremmel, G., Reinheimer, J., Dorbessan, O. y Meinardi, C. Libro de Actas (CD rom), Sesión 7, XIII Congreso CYTAL – AATA 2011, 19-21/10/2011, Buenos Aires, Argentina.

“Polifosfatos como nuevos antifúngicos aplicados en la superficie de quesos durante la maduración”. V. Suárez, Tremmel, G., Reinheimer, J., Dorbessan, O. y Meinardi, C. Tecnología Láctea Latinoamericana 69, 36-41 (2011).

“Polyphosphates as inhibitors of surface mould growth on hard cheese during ripening”. Viviana B. Suárez, Gustavo J. Tremmel, Mauricio Rivera, Jorge A. Reinheimer and Carlos A. Meinardi. International Journal of Dairy Technology 65 (3), 410-415 (2012).

“Polifosfatos como nuevos antifúngicos aplicados en la superficie de quesos durante la maduración”. V. Suárez, Tremmel, G., Reinheimer, J., Dorbessan, O. y Meinardi, C. Revista Argentina de Lactología 27, 65-73 (2012).

**Capítulo de libro**

Redacción del Capítulo “Fosfatos como antimicrobianos y antivirales en la industria láctea. Uso como antifúngico en quesos de mediana y larga maduración”, Capítulo 7. Viviana B. Suárez, Jorge A. Reinheimer y Carlos A. Meinardi. En “Avances y tendencias en la industria láctea. La contribución argentina desde el INLAIN”. Ediciones UNL (ISBN 978-987-749-203-3), pp. 187-203 (2020).

**Presentación a reuniones científicas**

“Polifosfatos como nuevos antifúngicos aplicados en la superficie de quesos durante la maduración”. V. Suárez, G. Tremmel, J. Reinheimer, O. Dorbessan y C. Meinardi. XIII Congreso CYTAL – AATA Centro de Convenciones UCA, Buenos Aires, Argentina, 17-21 de octubre 2011.

“Polifosfatos como inhibidores del crecimiento fúngico superficial durante la maduración de quesos”. Suárez Viviana, Tremmel Gustavo, Reinheimer Jorge, Dorbessan Oscar y Meinardi Carlos. II Simposio Argentino de Lactología, Facultad de Ingeniería Química (UNL), Santa Fe, Argentina, 16 y 17 de Agosto 2012.

“Polifosfatos como nuevos inhibidores del desarrollo superficial de hongos durante la maduración de quesos”. Suárez Viviana, Tremmel Gustavo, Dorbessan Oscar, Rivera Mauricio, Reinheimer Jorge y Meinardi Carlos. Trabajo seleccionado Concurso **INNOVAR 2012**, Secretaría de Planeamiento y Políticas en Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (MINCyT), Tecnópolis, 24-30/09/2012, Buenos Aires, Argentina.

**Disertaciones del Dr. Jorge Reinheimer**

“La vinculación tecnológica del INLAIN (UNL-CONICET) con la industria láctea nacional”. 1er. Encuentro Latinoamericano para PYMES lácteas, Santa Fe, 2-3/10/2013.

“Defectos microbianos en quesería”, disertación realizada en la Universidad Tecnológica del Uruguay (UTEC), Sede de La Paz, 19/10/2016.

“La microbiología de la leche cruda y la importancia tecnológica de los grupos microbianos presentes” y “Defectos microbianos en quesería”. Seminarios dictados en la Universidad Tecnológica de Uruguay (UTEC), Sede de La Paz, 12/09/2017.

“Ciencia, Tecnología e Industria: la experiencia del INLAIN”. Disertación en el panel “Investigación Aplicada” en el marco del tercer Congreso Regional de Innovación y Desarrollo, Facultad de Ing. Qca. (UNL), 20/09/2018.

“Microorganismos clásicos y nuevos como alterantes de productos lácteos fermentados”. Disertación en la Mesa Redonda “Microorganismos deteriorantes: el reto de la industria alimentaria”. V Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos (AAM), Buenos Aires, 25/09/2019.

**Protección a la propiedad Intelectual**

- Patente AR084987B1, Título de Patente de Invención: “Una composición protectora que controla el desarrollo de la microflora de superficies de quesos de mediana y baja humedad”, INPI (Instituto Nacional de Propiedad Industrial), Ministerio de Producción (República Argentina), otorgada el 31 de enero 2019, por un período de 20 años a partir de su presentación (vencimiento: 21 de octubre de 2031). Titulares: Universidad Nacional del

Litoral - CONICET - SUDAMFOS S.A. Inventores: Reinheimer, Jorge, Meinardi, Carlos, Suárez, Viviana, Tremmel, Gustavo y Dorbessan, Oscar.

Se adjuntan, al final del TFI, las dos primeras páginas de la patente como documentación validatoria.