

# Efecto de la nisina sobre la conservación del helado tipo italiano

Efrain, Romero-Machado<sup>1</sup>; Eduardo, Héctor-Ardisana<sup>2</sup>

## Resumen

La nisina, antibiótico sintetizado por *Lactococcus lactis*, se ha empleado en la conservación de numerosos alimentos; sin embargo, no existen antecedentes de su uso en la preservación de helados. En este trabajo se investiga el efecto de la nisina en la conservación del helado tipo italiano. Se diseñaron cuatro tratamientos (control sin nisina, y nisina 10, 50 y 100 ppm). A los 0, 30, 60 y 90 días se determinó la presencia de *E. coli*, *Salmonella*, coliformes y aerobios mesófilos por técnicas microbiológicas. Se evaluaron las siguientes propiedades organolépticas: aspecto superficial, dureza, presencia de hielo, cremosidad, gomosidad, presencia de grasa, presencia de espuma, sabores extraños y dulzura. La evaluación fue realizada por un panel de 15 catadores, mediante escalas hedónicas. No se detectó *Salmonella*, *E. coli* o coliformes en las muestras, al parecer por la asepsia de las materias primas, el proceso de elaboración y el almacenamiento a bajas temperaturas. La nisina redujo el crecimiento de los aerobios mesófilos, particularmente a los 90 días. El tratamiento con nisina no provocó cambios importantes en las propiedades organolépticas, excepto en la dulzura a partir de los 60 días, probablemente debido a la incorporación al helado de productos de la desintegración celular microbiana.

**Palabras Clave:** conservación; control de microorganismos; helado tipo italiano; nisina; propiedades organolépticas.

## Effects of nisin on the preservation of italian style ice cream

### Abstract

Nisin, antibiotic synthesized by *Lactococcus lactis*, has been widely used in food conservation; however, there is no history of its use in the preservation of ice cream. This study aimed to investigate the effect of nisin in preserving Italian style ice cream. Four treatments (control without nisin, and nisin 10, 50 and 100 ppm) were designed. The presence of *E. coli*, *Salmonella*, coliforms and mesophilic aerobics was determined by microbiological techniques at 0, 30, 60 and 90 days. The following organoleptic properties were evaluated: surface appearance, hardness, presence of ice, creamy, gumminess, presence of fat, presence of foam, strange flavors and sweetness. The evaluation was carried out by a panel of 15 tasters, using hedonic scales. No *Salmonella*, *E. coli* or coliforms were detected in the samples, apparently for the cleanliness of raw materials, the process of preparation and storage at low temperatures. Nisin reduced the growth of aerobic mesophilic bacteria, particularly at 90 days. Nisin treatment did not cause significant changes in the organoleptic properties, except for sweetness after 60 days, probably due to the incorporation into the ice cream of products from microbial cell disintegration.

**Keywords:** nisin; Italian style ice cream; conservation; microorganisms control; organoleptic properties.

**Recibido:** 15 de agosto de 2015

**Aceptado:** 3 de agosto de 2016

<sup>1</sup>Docente investigador de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, (ESPOCH), Ecuador. Licenciado en Gestión Gastronómica, Máster en Procesamiento de Alimentos. rodrigoromerom@hotmail.es

<sup>2</sup>Docente investigador de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, (ESPOCH), Ecuador. Ingeniero Agrónomo. PhD en Ciencia Agrícolas. ehectorardisana@gmail.com

**I. INTRODUCCIÓN**

El helado tipo italiano se elabora con ingredientes como leche, nata, varios azúcares y aromas, incluyendo frutas y frutos secos (Correu, 2010). Se diferencia del resto de los helados por varias razones como: posee un menor contenido de grasa butírica, de 4 a 8 %; suele ser bajo en azúcar, entre 16 y 22 %, estando esta cantidad cuidadosamente equilibrada con el agua para evitar que ésta se hiele; los tipos de azúcar empleados son la sacarosa y la dextrosa, usándose azúcar invertido para controlar el dulzor del producto final, y contiene una base estabilizadora, que suele ser yema de huevo, en los sabores basados en crema amarilla.

Los productos alimenticios son un medio propicio para el crecimiento de microorganismos que dañan su composición y en muchos casos son nocivos para el consumidor. De ahí que se utilicen diversas técnicas y sustancias de diferente naturaleza, para lograr su preservación del ataque de microbios. Entre los compuestos más usados en la conservación de alimentos se encuentra la nisina, que es un antibiótico peptídico policíclico sintetizado de forma natural por la bacteria *Lactococcus lactis*. Esta molécula contiene diversos aminoácidos (como la lantionina y el β-metil-lantionina). Única aplicada a nivel comercial como bio-conservador de alimentos, en más de 50 países, con una efectividad comprobada, es además considerado como producto seguro con nivel GRAS (Generally Recognized As Safe) y con autorización para su aplicación por la FDA (Food and Drug Administration) (Chen & Hoover, 2003).

La nisina se ha empleado con éxito en la conservación de alimentos cárnicos, vegetales y principalmente en la industria quesera (Ross, 2005). Sin embargo, no existen antecedentes de su uso en la preservación de helados. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la nisina en el control de microorganismos y las propiedades organolépticas del helado tipo italiano, con vistas a su posible uso como conservante de este alimento.

**II. DESARROLLO**

**1. Metodología**

**Materiales y Métodos**

La formulación del helado se realizó según una variante de lo propuesto por Villacís (2010), (Figura 1).



**Figura 1. Procedimiento para la formulación del helado**

La nisina empleada fue la comercializada por Lactocomerce S.A, se añadió en proporciones de 0 (tratamiento control), 10, 50 y 100 ppm, en el momento de la pasteurización. El helado fue almacenado a -170 C. A los 0, 30, 60 y 90 días de almacenamiento, se evaluó el efecto de la nisina sobre el control de microorganismos, para lo cual se utilizaron los procedimientos descritos en las normas técnicas ecuatorianas:

- Microorganismos coliformes: NTE INEN 1 529-7 (INEN, 1990a)
- *E. coli*: NTE INEN 1 529-8 (INEN, 1990b)
- *Salmonella*: NTE INEN 1 529-15 (INEN, 2009)
- Aerobios mesófilos: NTE INEN 1 529-5 (INEN, 2006)

En los mismos momentos de muestreo se evaluaron las siguientes propiedades organolépticas: aspecto superficial, dureza, presencia de hielo, cremosidad, gomosidad, presencia de grasa, presencia de espuma, sabores extraños y dulzura. El panel estuvo compuesto por 15 miembros, profesores de Gastronomía de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, ESPOCH

(Ecuador). Las muestras se tomaron con una cuchara para helado; se tomó y colocó una bola de helado en una copa y entregó a cada miembro del panel, a una temperatura ambiente entre 16 y 270 C. La temperatura de servicio del helado fluctuó entre -60 y -100 C. Para la evaluación se emplearon escalas hedónicas (Tabla 1).

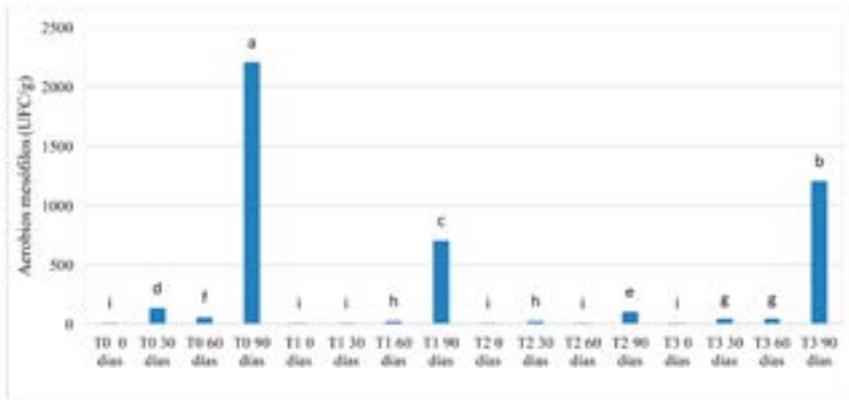
**Tabla 1. Escalas hedónicas para la evaluación de las propiedades organolépticas**

| Propiedad           | Escalas          |                  |                 |                |                  |
|---------------------|------------------|------------------|-----------------|----------------|------------------|
| Aspecto superficial | Mate (5)         | Brillante (3)    | Con líquido (2) |                |                  |
| Dureza              | Muy Duro (1)     | Poco Duro (3)    | Adecuado (5)    | Blando (3)     | Muy Blando (1)   |
| Presencia de hielo  | Nulo (5)         | Muy Ligero (4)   | Ligero (3)      | Definido (2)   | Pronunciado (1)  |
| Cremosidad          | Adecuado (5)     | Poco Cremoso (3) | Acuoso (1)      |                |                  |
| Gomosidad           | Nula (5)         | Ligera (3)       | Pronunciada (1) |                |                  |
| Presencia de grasa  | Nula (5)         | Ligera (3)       | Pronunciada (1) |                |                  |
| Presencia de espuma | Muy Compacto (1) | Compacto (3)     | Adecuado (5)    | Espumoso (3)   | Muy Espumoso (1) |
| Derretimiento       | Muy Rápido (1)   | Rápido (3)       | Adecuado (5)    | Lento (3)      | Muy Lento (1)    |
| Sabores extraños    | Ninguno (5)      | Ligero (3)       | Pronunciado (1) |                |                  |
| Dulzura             | Muy Dulce (1)    | Dulce (3)        | Adecuada (5)    | Poco Dulce (3) | Desabrido (1)    |

Los datos de control de microorganismos se procesaron mediante un análisis de varianza de clasificación doble (4 tratamientos x 4 tiempos de almacenamiento); se tomaron 4 muestras (repeticiones) por cada combinación tratamiento x tiempo de almacenamiento; las medias se compararon a través de la prueba de Tukey con  $p \leq 0,05$ . Para las propiedades organolépticas se consideraron 15 repeticiones (miembros del panel); los datos se procesaron a través de la prueba de Kruskal-Wallis con  $p \leq 0,05$ . En el procesamiento de los datos se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS Statistic v. 20.

**2. Resultados**

**Efecto de la nisina sobre el control de microorganismos:** los exámenes microbiológicos en el laboratorio, a partir de las muestras tomadas a los 0, 30, 60 y 90 días, en los tratamientos que contenían nisina y el control sin el antibiótico, evidenciaron total ausencia de *Salmonella*, coliformes y *E. coli*. Ello demostró que el producto fue elaborado con todas las normas de seguridad e higiene. En cambio, se observó el crecimiento de aerobios mesófilos en todos los casos (Figura 2), con los valores más altos, en las muestras tomadas a los 90 días, en cada uno de los tratamientos.



Legenda: T0: sin nisina; T1: nisina 10 ppm; T2: nisina 50 ppm; T3: nisina 100 ppm a los 0, 30, 60 y 90 días (letras desiguales indican diferencias significativas para la prueba de Tukey con  $p \leq 0.05$ ).

**Figura 2. Presencia de aerobios mesófilos en las muestras tomadas de los tratamientos**

**Efecto de la nisina sobre las propiedades organolépticas:** no se encontraron variaciones entre el control y los tratamientos con nisina en las variables dureza, presencia de hielo, cremosidad, gomosidad, presencia de grasa y derretimiento. Para la variable “aspecto superficial”, a los 60 días se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos. Los valores mayores de esta variable ocurrieron en los tratamientos con mayor concentración de nisina, clasificando como “adecuado”, dentro del rango de la correspondiente escala hedónica (Figura 3).

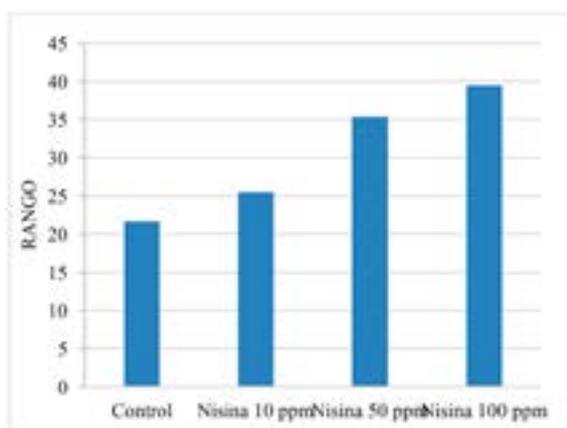


Figura 3. Aspecto superficial del helado tipo italiano conservado sin y con nisina a los 60 días.  $X^2: 11,653$  A: 0,009.

Para la variable “presencia de espuma” a los 90 días se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. El menor valor se obtuvo con el tratamiento de nisina 50 ppm, clasificando dentro del rango de la escala hedónica como “espumoso” (Figura 4).

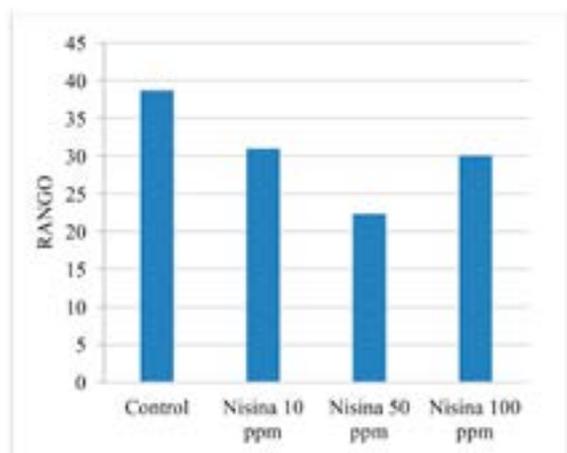


Figura 4. Presencia de espuma en el helado tipo italiano conservado sin y con nisina a los 90 días.  $X^2: 8,578$  A: 0,035.

A los 0 días, se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos para la variable “sabores extraños”. El menor valor otorgado por los panelistas se obtuvo con el tratamiento de nisina 100 ppm, clasificándolo en la categoría “ligeros”, en la escala hedónica (Figura 5).

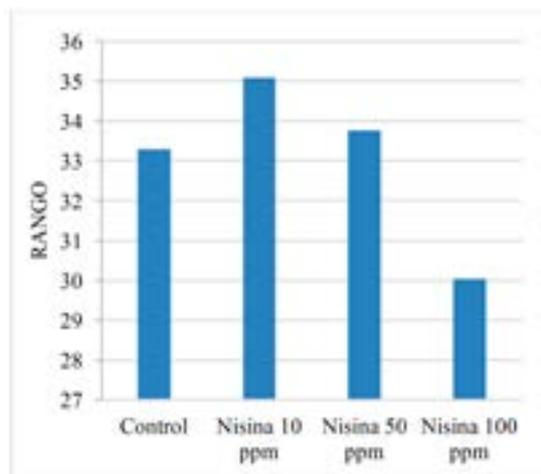


Figura 5. Presencia de sabores extraños en el helado tipo italiano conservado sin y con nisina a los 0 días.  $X^2: 10,934$  A: 0,012.

No se encontraron diferencias significativas para la variable “dulzura” entre el control y los tratamientos con nisina a los 0 y 30 días. Sin embargo, a los 60 y 90 días hubo diferencias entre los tratamientos, correspondiendo en ambos casos los mayores valores (categoría “adecuada” de la escala hedónica) al tratamiento control (Figuras 6 y 7).

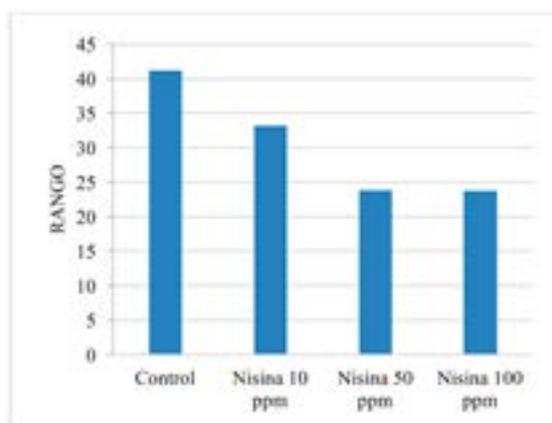
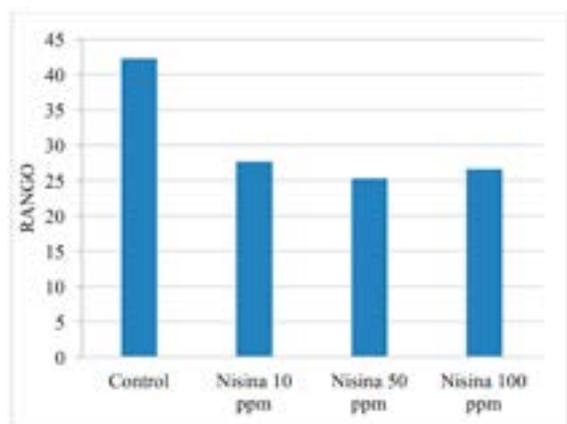


Figura 6. Dulzura en el helado tipo italiano conservado sin y con nisina a los 60 días.  $X^2: 13,318$  A: 0,004.



**Figura 7. Dulzura en el helado tipo italiano conservado sin y con nisina a los 90 días.  $\chi^2$ : 10,684 A: 0,014.**

### 3. Discusión

**Efecto de la nisina sobre el control de microorganismos:** en los análisis efectuados no se detectó, en ninguna de las muestras estudiadas, la presencia de *E. coli*, *Salmonella* o coliformes.

Otros autores, que han estudiado el efecto de la nisina sobre el crecimiento de estos géneros microbianos en otros alimentos, han obtenido resultados similares. La nisina inhibe el crecimiento de *Staphylococcus* y *Salmonella* en carne de cangrejo (De Lima & Goriach-Lira, 2005); impide el desarrollo de *Staphylococcus* en queso de mano preservado con este antibiótico natural (Maldonado & Llanca, 2007). En el queso “telita” tratado con nisina, no se detectó *Salmonella* ni *L. monocytogenes*, y las cantidades de *Staphylococcus* presentes fueron significativamente menores que en el control no tratado (Márquez & García, 2007); tampoco se observó crecimiento de *Staphylococcus* ni de coliformes en queso blanco tratado con nisina (Castro et al, 2009).

Los resultados de estos autores pueden parecer contradictorios, lo cual se debería al hecho que los *Staphylococcus* son bacterias Gram positivas, mientras *Salmonella* y *E. coli* son bacterias Gram negativas, y dado que la nisina no tiene efecto sobre este último tipo de microbios (QuimiNet, 2006), es poco probable esperar que de haber estado presentes, ésta bacteriocina hubiera podido controlarlos. Pero esta afirmación tampoco es absoluta: se ha demostrado también, que un choque térmico puede aumentar la sensibilidad de la célula bacteriana Gram negativa a la nisina, aunque el efecto ocurre mayormente cuando la bacteriocina está presente durante el tratamiento

térmico y no cuando se adiciona después, debido a que las células pueden recuperarse del efecto negativo causado por las temperaturas elevadas (Boziaris & Adams, 2001). Bajo estos supuestos, la pasteurización del helado junto con la nisina, desarrollada en la formulación del helado para esta investigación, podría haber contribuido al control de estas bacterias Gram negativas.

No obstante, como no se advirtió presencia de microorganismos de estos géneros en ninguna de las muestras tomadas y en los controles en los diferentes tiempos de almacenamiento, es imposible, partiendo de los resultados experimentales, señalar a la nisina como causante del control de estos géneros microbianos. La ausencia de estos microorganismos, parece más probable, sea consecuencia de las adecuadas condiciones higiénicas de las materias primas, la preparación de la mezcla y conservación del helado. Estas bacterias, además, son termotróficas (Mossel, Moreno & Struijk, 2003), por lo que su presencia era poco probable, dado las bajas temperaturas a las que se almacena el helado (si la pasteurización ha sido adecuada). Por último, un estudio más detallado a través de la inoculación de cantidades conocidas de estos microorganismos, podría contribuir al análisis del efecto de la nisina sobre ellos.

En cambio, llama la atención que los mayores valores de microorganismos aerobios mesófilos se hayan alcanzado en todos los tratamientos a los 90 días (el máximo tiempo de conservación estudiado), y que el empleo de la nisina, en las tres concentraciones ensayadas, haya conducido a valores significativamente menores que los alcanzados por el control sin nisina, a los 90 días de almacenamiento.

En investigaciones realizadas sobre la conservación de otros alimentos, el efecto inhibitorio de la nisina sobre la cantidad de aerobios mesófilos presentes en el queso blanco, persistió durante los 10 días de almacenamiento del producto (Castro et al, 2009); en salchichas tratadas con nisina, aparecían menos aerobios mesófilos que en el control no tratado (Villarreal, 2006); resultados similares se obtuvieron al emplear la nisina como preservante en hamburguesas (Gómez et al, 2013).

Los aerobios mesófilos son microorganismos que viven en presencia de oxígeno, a temperaturas de rango medio. Según Food News Latam (2015),

un crecimiento elevado de estos microbios puede significar:

- . Excesiva contaminación de la materia prima.
- . Deficiente manipulación durante el proceso de elaboración.
- . La posibilidad que existan patógenos, pues estos son mesófilos.
- . La inmediata alteración del producto.

El recuento de mesófilos, por lo tanto, es un indicador de las condiciones de salubridad de los alimentos. A medida que aumenta el tiempo de almacenamiento es posible que la cantidad de unidades formadoras de colonias de estos se incremente, y el hecho que a los 90 días el empleo de la nisina haya conducido a conteos significativamente menores, que los del control sin nisina, abre una posibilidad para la conservación del helado tipo italiano con la ayuda de esta bacteriocina. No obstante, se requerirán estudios más detallados sobre las concentraciones de nisina a emplear y los tiempos a los que es efectiva para llegar a una mayor precisión sobre sus posibilidades de uso generalizado.

**Efecto de la nisina sobre las propiedades organolépticas:** aunque se encontraron diferencias entre el control y los tratamientos con nisina en las propiedades “presencia de espuma” a los 90 días, y “sabores extraños” a los 0 días de almacenaje, los resultados más preocupantes a los efectos del empleo de esta bacteriocina en la conservación del helado italiano, están relacionados con los cambios en la dulzura a los 60 y 90 días de almacenaje, en los tratamientos con nisina.

Una vez más, los resultados obtenidos por otros autores, en cuanto a la acción de la nisina sobre las propiedades organolépticas de productos alimenticios son contradictorios. En salchichas, el tratamiento conservante con nisina no causó variaciones significativas en el color, sabor y apariencia (Villarreal, 2006). Tampoco se produjeron alteraciones en el sabor del queso “telita” elaborado con nisina con respecto al control (Sangronis & García, 2007). Sin embargo, en hamburguesas, el empleo de nisina redujo los valores de textura y sabor a rangos intermedios, aunque los mantuvo dentro de los límites aceptables (Gómez et al, 2013). Al utilizarla en la carne de pollo no se encontraron diferencias en el olor y el color, pero sí en la textura, el sabor y la aceptabilidad (Moreno, 2012).

Aunque en esta investigación no se realizaron estudios en este sentido, una posible causa de este cambio

en la dulzura puede buscarse en el propio modo de acción bactericida de la nisina. Se conoce que esta bacteriocina provoca la vesiculación del citoplasma, la formación de poros y la desintegración de la célula microbiana (Bizani et al, 2005), como resultado de lo cual el jugo celular se incorpora al medio exterior, en este caso el helado. Los productos celulares así incorporados y acumulados en el tiempo –obsérvese que las diferencias aparecieron a partir de los 60 días- podrían ser los responsables de la variación en la dulzura en el helado.

En todo caso, la ausencia de estudios previos en helados, y en particular en los de tipo italiano, sugieren precaución en el empleo de la nisina para propósitos de conservación de este producto alimenticio, y realizar investigaciones más amplias y detalladas con este fin.

### III. CONCLUSIONES

La ausencia de *Salmonella*, *E. coli* y coliformes en las muestras de helado tipo italiano, al parecer no es consecuencia de la aplicación de la nisina como agente conservante, sino de las adecuadas condiciones asépticas de las materias primas, el proceso de elaboración y el almacenamiento del producto a bajas temperaturas. El empleo de nisina fue efectivo en la reducción del crecimiento de los aerobios mesófilos, en particular a los 90 días de almacenamiento del helado tipo italiano. El tratamiento con nisina no provocó variaciones importantes desde el punto de vista práctico en las propiedades organolépticas del helado tipo italiano, excepto por la variación en su dulzura a partir de los 60 días, lo cual probablemente se deba a la incorporación al helado de productos de la desintegración celular microbiana que causa esta bacteriocina.

### IV. REFERENCIAS

- Bizani, D., Motta, A. S., Morrissy, J. A., Terra, R. M., Souto, A. A. y Brandelli, A. (2005). Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *International Microbiology*, 8 (2), 125-131.
- Bozariis, I. S. y Adams, M. R. (2001). Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 715-724.
- Castro, G., Valbuena, E., Bríñez, W., Sánchez, E., Vera, H. y Tovar, A. (2009). Comparación del empleo de nisina y cultivos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* para la biopreservación de queso blanco. *Revista*

- Científica* FCV-LUZ, XIX (2), 201-209.
- Chen, H. y Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2 (3), 82-106.
- Correu, A. (2010). ¿Cuál es la diferencia entre el gelato italiano y el helado tradicional? Recuperado de <http://www.lagourmandise.org/>
- De Lima, T. C. S., y Gorlach-Lira, K. (2005). Action of nisin and high pH on growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. in pure culture and in the meat of land crab (*Ucides cordatus*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 151-156.
- FoodNewsLatam(2015). ¿Qué son los aerobios mesófilos? Recuperado de <http://www.foodnewslatam.com/inocuidad/53-control-calidad/2499-%C2%BFque-son-los-aerobios-mesofilos.html>
- Gómez, L., Ponce-Alquizira, E., Freitas, R. E. y Rubio, M. S. (2013). Efecto de antimicrobianos naturales sobre la estabilidad físico-química, microbiológica y sensorial de hamburguesas de res mantenidas en refrigeración. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4 (3), 255-270.
- INEN (1990a). Norma Técnica Ecuatoriana NTE 1 529-7:1990. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de microorganismos coliformes por la técnica de recuento de colonias. Recuperado de <http://archive.org/details/ec.nte.1529.7.1990>
- INEN (1990b). Norma Técnica Ecuatoriana NTE 1 529-8:1990. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y *E. coli*. Recuperado de <http://archive.org/stream/ec.nte.1529.8.1990#page/no/mode/2up>
- INEN (2006). Norma Técnica Ecuatoriana NTE 1 529-5:2006. Control microbiológico de los alimentos. Determinación de la cantidad de microorganismos aerobios mesófilos. Recuperado de <http://www.google.com.ec/#q=nte+inen+1529-5>
- INEN (2009). Norma Técnica Ecuatoriana NTE 1 529-15:2009. Control microbiológico de los alimentos. *Salmonella*. Método de detección. Recuperado de <http://archive.org/stream/ec.nte.1529.15.1996#page/no/mode/2up>
- Maldonado, R. y Llanca, L. (2007). Efecto de la incorporación de nisina sobre la supervivencia del *Staphylococcus aureus* en queso de mano. *Revista de la Facultad de Agronomía (Maracay)*, 33, 147- 163.
- Márquez, J. G. y García, C. E. (2007). Efecto de la nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo 'telita' elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 27, 108-111.
- Moreno, C. P. (2012). Estudio del efecto combinado de nisina y ácido láctico en la vida útil de carne de pollo (tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Mossel, D. A. A., Moreno, B. y Struijk, C. B. (2003). *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza, España: Editorial Acrivia.
- QuimiNet (2006). La nisina como conservador alimenticio. Recuperado de <http://www.quiminet.com/articulos/la-nisina-como-conservador-alimenticio-5120.htm>
- Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777-788.
- Sangronis, E. y García, J. (2007). Efecto de la adición de nisina en los parámetros físicos, químicos y sensoriales del queso "telita". *Anales Venezolanos de Nutrición*, 20(1), 12-16.
- Villacís, E. A. (2010). Formulación de helados aptos para diabéticos (tesis de pregrado). Escuela Politécnica Nacional, Guayaquil, Ecuador.
- Villarrol, P. A. (2006). Evaluación de tres tratamientos postpasteurización en salchichas tipo hot dog marca Zamorano (tesis de pregrado). Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.