

60
2EJ



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EMPLEO DE LA FERMENTACION LACTICA EN
MUSCULO FRESCO DE CAZON PARA AUMENTAR
EL TIEMPO DE ANAQUEL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

SILVIA GUZMAN BELTRAN



DIRECTORA DE TESIS: DRA. CELIA BARRENA GONZALEZ
CODIRECTORA DE TESIS: DRA. EDITH PONCE ALOUICIRA

1999

271519

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Empleo de la fermentación láctica en músculo fresco de cazon como método alternativo para aumentar el tiempo de anaquel".

realizado por Silvia Guzmán Beltrán

con número de cuenta 9119665-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Dra. Celia Barrera González
Propietario

Propietario Dra. Edith Ponce Alquícira

Propietario Dr. Raúl Salas González

Suplente Ing. Iveta Imiriskova Vrablova de Sosa

Suplente Biol. Fernando Hernández Sánchez

[Handwritten signatures and stamps]

Consejo Departamental de Biología

[Handwritten signature]
Dra. Edna María Suárez Díaz
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

A mi familia con mucho cariño

A mis padres

Gracias por su apoyo, ustedes son la fuerza y la energía con la que camino...

También gracias por su amor y su paciencia, siempre han estado conmigo en las noches más oscuras de mi vida, su presencia alumbra mi camino porque son como la luz en el amanecer.

A mis hermanos

Paty gracias por ser mi mejor amiga, siempre estas conmigo cuando más te necesito...

Marquito, tan chiquito y ya con la pena de soportarme... te quiero mucho hermanito

A mis Directoras de Tesis: la Dra. Celia Barrena González y a la Dra. Edith Ponce Alquicira por su apoyo, dedicación, enseñanzas y amistad que siempre me brindaron.

A la Dra. Isabel Guerrero Legarreta de la UAM-I por el apoyo en la elaboración del proyecto.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel y al Ing. Abel Blancas del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM, por su apoyo e interés que siempre mostraron.

A los Sinodales: el Dr. Raúl Salas González por sus aportaciones valiosas en la parte estadística, al Biol. Fernando Hernández Sánchez e Ing. Iveta Imiriskova Vrablova por sus observaciones y comentarios.

A la Fundación UNAM por la beca otorgada para el proyecto de Tesis.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias.

Esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Industrial del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Y en el Laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas en el Dpto. de Biotecnología, en la UAM-Iztapalapa.

ÍNDICE

I. Resumen

II. Generalidades

1.0 Bacterias Lácticas.....	1
1.1 Características.....	1
1.2 Clasificación.....	1
1.3 Metabolitos producidos.....	2
1.3.1 Ácidos orgánicos.....	3
1.3.1.1 Clasificación por metabolismo de ácido láctico.....	3
1.3.1.2 Síntesis y modo de acción de ácidos orgánicos.....	3
1.3.2 Peróxido de Hidrógeno.....	4
1.3.3 Diacetilo.....	5
1.3.4 Dióxido de Carbono.....	5
1.3.5 Bacteriocinas.....	5
1.3.5.1 Clasificación.....	6
1.3.5.2 Caracterización y modo de acción.....	7
1.3.5.3 Aplicaciones.....	8
2.0 Pescado.....	11
2.1 Composición química.....	11
2.2 Descomposición.....	11
2.2.1 Autólisis.....	12
2.2.2 Contaminación microbiana.....	12
2.2.2.1 Factores que influyen en la contaminación.....	13
2.2.2.2 Principales microorganismos de contaminación.....	13
2.3 Compuestos indicadores.....	15

2.4 Métodos de Conservación.....	17
2.4.1 Congelación.....	18
2.4.2 Refrigeración.....	19
2.4.3 Envasado en Atmósferas Modificadas.....	19
2.4.4 Conservadores Químicos.....	21
2.4.5 Irradiación.....	21
2.4.6 Fermentación Láctica.....	22

III. Justificación.....24

IV. Objetivos.....26

V. Metodología

3.0 Fuente de obtención de cepas de bacterias lácticas.....	27
4.0 Pruebas de identificación de bacterias lácticas.....	27
4.1 Evaluación de las características morfológicas de las colonias.....	27
4.2 Morfología microscópica.....	27
4.3 Capacidad de disminuir el pH.....	28
5.0 Selección.....	28
5.1 Detección de compuestos antimicrobiales.....	28
5.2 Detección de producción de bacteriocinas.....	29
6.0 Caracterización de cepas seleccionadas.....	30
6.1 Cinética de crecimiento.....	30
6.2 Perfil de ácidos orgánicos.....	30
7.0 Caracterización de la bacteriocina L5.....	31
7.1 Producción en fermentador.....	31
7.2 Purificación Parcial.....	31

7.3	Cuantificación de la bacteriocina.....	32
7.4	Espectro de actividad L5.....	32
7.5	Comparación del espectro de actividad de L5 y nisina.....	33
8.0	Fermentación láctica en músculo fresco de cazón (<i>Rhizopriondon longurio</i>).....	33
8.1	Preparación de los inóculos.....	34
8.2	Preparación de las muestras de músculo fresco de cazón.....	34
8.3	Tratamientos.....	34
8.4	Empacado y almacenamiento.....	35
8.5	Muestreo.....	36
8.6	Análisis Microbiológicos.....	36
8.7	Análisis Físicoquímicos.....	37
8.8	Detección de la producción de bacteriocinas.....	38
9.0	Análisis estadístico.....	38

VI. Resultados

10.0	Descripción de las bacterias lácticas utilizadas.....	40
11.0	Detección de compuestos antimicrobiales.....	41
12.0	Características de las cepas seleccionadas.....	43
13.0	Caracterización de la bacteriocina L5 producida por <i>Lactococcus lactis</i> L5.....	49
14.0	Efecto de la fermentación láctica en músculo fresco de cazón.....	53
14.1	Análisis físicoquímicos.....	55
14.2	Análisis microbiológicos.....	62

VII. Discusión.....	68
VIII. Conclusiones.....	74
IX. Bibliografía.....	75
X. Anexo	

I. RESUMEN

Los objetivos del presente estudio, fueron seleccionar y caracterizar cepas de bacterias lácticas productoras de sustancias antimicrobianas, en particular buenas productoras de ácido láctico y/o bacteriocinas, así como caracterizar y conocer el espectro de actividad de la bacteriocina.

Lactobacillus plantarum y *Micrococcus kristinae-variens* (**LM3**), *Lactobacillus pentosus* (**Lp**) *Lactococcus lactis* L5 (**L5**) y **MM2** cepa aislada de tejido muscular de cazón, en proceso de identificación (**MM2**), fueron las cepas que tuvieron la capacidad de crecer rápidamente, presentando mayor capacidad antagonista, disminuyendo eficientemente el pH por la producción de ácidos orgánicos (láctico principalmente). *Lactococcus lactis* L5 produjo bacteriocinas, cuando esta cepa fue cultivada en condiciones óptimas y se purificó parcialmente, el metabolito mostró un aumento del 400 % en la capacidad de inhibición sobre la cepa indicadora. Además de un espectro de actividad diferente a la nisina.

Por otro lado, estas cepas se inocularon solas y en mezclas sobre músculo fresco de cazón envasado al vacío, durante la fermentación láctica para determinar su capacidad de inhibir a microorganismos contaminantes como: *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* y enterobacterias.

Como se sabe el músculo de pescado, por su composición y alto contenido de humedad, resulta un sustrato ideal para el desarrollo de las bacterias. En pescado fresco almacenado al vacío, las bacterias lácticas pueden dominar sobre el resto de la microflora por exclusión competitiva y por la producción de sustancias antimicrobiales inhibiendo a *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* y enterobacterias, organismos responsables de la descomposición, esto se ve reflejado en el aumento del tiempo de anaquel.

En las muestras inoculadas se detectaron cantidades menores de diaminas biogénicas, (putrescina y cadaverina principalmente) con respecto a muestras sin inocular, estos compuestos son indicadores de descomposición.

II. GENERALIDADES

1.0 Bacterias lácticas

1.1 Características

Las bacterias lácticas se caracterizan como un grupo de bacterias Gram positivas, no esporuladas, fermentadoras de carbohidratos, productoras de una gran cantidad de ácido láctico, son ácido tolerantes, negativos a la prueba de catalasa, que no reducen nitratos, no son móviles y son anaerobios facultativos (Nakazawa y Hosono, 1990).

1.2 Clasificación

Se reconocen siete géneros principalmente de bacterias lácticas: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium* y *Bifidobacterium* (manual de Bergey's, 1989), en la siguiente tabla se describen con base al tipo de fermentación, morfología y al desarrollo en su hábitat aerobio.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE BACTERIAS LÁCTICAS

Género	Morfología	Tipo de fermentación	Producción de gas	Aerobicidad
<i>Streptococcus</i>	Pares o cadenas de cocos	Homoláctica	-	+
<i>Lactococcus</i>	Pares o cadenas de cocos	Homoláctica	-	+
<i>Pediococcus</i>	Cadenas de 4 cocos	Homoláctica	-	+
<i>Leuconostoc</i>	Pares o cadenas de cocos	Heteroláctica	+	+
<i>Lactobacillus</i>	Bastones	Homoláctica Heteroláctica	-	+
<i>Bifidobacterium</i>	Bastones o Polimórficos	Heteroláctica	-	-
<i>Carnobacterium</i>	Cocos individuales o en pares	Heteroláctica	+	+

Tabla 1. Características y clasificación de las bacterias lácticas a nivel genérico de acuerdo a Kunihiko Hayakawa (tomada de Nakazawa y Hosono, 1990)

1.3 Metabolitos Producidos

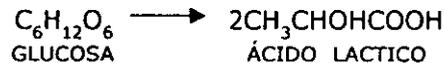
Los microorganismos están en constante competencia por los nutrientes y por un ambiente favorable, las bacterias lácticas producen metabolitos que inhiben el crecimiento de otros organismos durante la fermentación láctica en ciertos alimentos y bebidas fermentadas. Estos metabolitos incluyen a los ácidos: láctico, acético y propiónico; además de otros compuestos como: diacetilo, peróxido de hidrógeno y proteínas con poder bactericida llamadas bacteriocinas (Hoover y Steenson, 1993).

1.3.1 Ácidos orgánicos

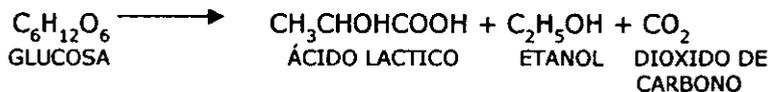
1.3.1.1 Clasificación por metabolismo de ácido láctico

El ácido láctico es el producto principal de las bacterias lácticas, por lo tanto, se han clasificado por la conversión de carbohidratos a lactado en bacterias homofermentativas o heterofermentativas:

Las bacterias homofermentativas convierten la glucosa en ácido láctico en una proporción del 100% (Nakazawa y Hosono, 1990).



Mientras que en las heterofermentativas, la glucosa generalmente es fermentada a ácido láctico, dióxido de carbono y alcohol.



1.3.1.2 Síntesis y modo de acción de ácidos orgánicos

Las bacterias lácticas fermentan los carbohidratos por diferentes vías metabólicas y durante este proceso, se obtienen ácidos orgánicos (principalmente láctico y acético) que no son utilizados por las células y se excretan al exterior (Klander, 1983). Los ácidos orgánicos contribuyen al desarrollo de sabor, aroma y textura de los alimentos, pero también a su estabilidad mediante la inhibición de microorganismos indeseables que alteran la calidad del producto (Requena y Peláez, 1995).

El mecanismo de acción de los ácidos orgánicos se basa en su disociación, siendo la fracción no disociada la que posee actividad inhibitoria (García *et al*, 1995) ya que puede atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma, causando una disminución del pH interno y provocar un cambio en el gradiente de protones, teniendo un efecto bacteriostático y finalmente provocando la muerte de la célula (Requena y Peláez, 1995).

Las bacterias lácticas pueden sobrevivir y desarrollarse en presencia de un pH relativamente bajo a diferencia de otros grupos microbianos con metabolismo respiratorio (Smulders *et al*, 1986). Las bacterias lácticas poseen un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, almacena energía (Michels *et al*, 1979; Tseng y Montville, 1993).

1.3.2 Peróxido de hidrógeno

Este es un metabolito primario generado en todas las bacterias lácticas. El peróxido se acumula en el medio de crecimiento debido a que estos microorganismos no producen catalasa.

La acción bactericida de este compuesto se atribuye a su efecto altamente oxidante, actuando como intermediario en la reducción de oxígeno para generar radicales hidroxilo, (Lípidos de la membrana y el ADN) (Juven *et al*, 1988).

1.3.3 Diacetilo

Se produce durante la degradación del ácido cítrico en *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus sp.* (Guerrero y Lara, 1995). Posee un efecto antimicrobiano a altas concentraciones, pero a concentraciones bajas, puede ser metabolizado por algunos microorganismos y su acción antimicrobiana es mayor frente a microorganismos Gram negativos, levaduras y mohos (Jay, 1982).

Aunque el diacetilo se considera como sustancia GRAS (Generally Recognize As Safe) su utilidad es reducida, debido a que se requieren cantidades elevadas para que ejerza un efecto inhibitorio y a que posee un sabor intenso (Requena y Peláez, 1995).

1.3.4 Dióxido de Carbono

Es producido por bacterias lácticas heterofermentativas a partir de hexosas, contribuye a una reducción en el potencial redox y es tóxico para las bacterias aerobias que llevan a cabo descomposición (Church y Wood, 1991).

1.3.5 Bacteriocinas

Las bacteriocinas de las bacterias lácticas son componentes proteicos, que presentan gran variación en sus pesos moleculares, propiedades bioquímicas, modo de acción y espectro de actividad (Klaenhammer, 1993).

1.3.5.1 Clasificación

Klaenhammer toma dos criterios para la clasificación de bacteriocinas de bacterias lácticas: el modo de acción bactericida y contener una región proteica. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas pueden ser divididas en cuatro grandes grupos:

Clase I Lantibióticos. Son péptidos pequeños que se distinguen de otras bacteriocinas por el contenido de deshidroaminoácidos y aminoácidos tioeter (lantionina y 3-metilantionina). Esta clase se divide a su vez en dos subgrupos de acuerdo a su estructura: Los de tipo A comprenden formas helicoidales anfipáticas con dos a siete cargas positivas y masas moleculares entre 2,164 y 3,488 Daltons (Da). El tipo B comprende de moléculas globulares con carga negativa o neutra que tienen masas entre 1,959 y 2,041 Da (Jack *et al*, 1995).

Clase II No lantibioticos. Pequeños péptidos termoestables (<10 kDa) que se dividen en tres subclases: IIa Bacteriocinas que muestran actividad antilisteria, con una secuencia homóloga (entre 38 y 55% de identidad) en la región N-terminal; estas se encuentran en una gran variedad en bacterias lácticas como *Pediococcus* (pediocina PA-1), *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Enterococcus*. Las del tipo IIb Incluyen bacteriocinas cuya actividad depende de la acción de dos péptidos complementarios. Por ultimo el tipo IIc incluye péptidos thiol-activados que requieren residuos reducidos de cisteína para su actividad (Jack *et al*, 1995 y Ingolf *et al*, 1996).

Clase III Bacteriocinas termolábiles de alto peso molecular (>30 kDa) (Jack *et al*, 1995).

Clase IV Bacteriocinas compuestas por complejos proteicos, lípidos y carbohidratos: Este grupo no ha sido caracterizado adecuadamente a nivel bioquímico, investigaciones recientes sugieren que la actividad bactericida de estos compuestos, puede deberse a interacciones de bacteriocinas no definidas unidas a constituyentes celulares o del medio de cultivo (Ingolf *et al*, 1996).

1.3.5.2 Características y modo de acción

Las bacteriocinas son de naturaleza proteica y se inactivan por proteasas incluyendo aquellas de origen pancreático (tripsina y α -quimiotripsina) y algunas de origen gástrico, como la pepsina. Desde el punto de vista biotecnológico esta característica es interesante ya que facilitaría su inactivación durante su paso por el tracto gastrointestinal, sin ser absorbidos como compuestos activos (Lloyd y Drake, 1975).

En general, la mayoría resisten un tratamiento térmico equivalente a la pasteurización y son estables a valores de pH ácido o neutro (De Vuyst y Vandame, 1994; Huot *et al*, 1996a y Huot *et al*, 1996b)

La acción bactericida de las bacteriocinas sobre células sensibles generalmente es rápida (Zadjel *et al.*, 1983) y afectan la permeabilidad de la membrana por medio de la formación de canales o poros. Algunos minutos después del contacto, hay una pérdida de moléculas tales como K^+ y ATP. Este agotamiento de las reservas energéticas de la bacteria conduce a una disminución de la síntesis de macromoléculas (ADN, ARN, proteínas) llevando finalmente a la muerte celular (Jack *et al*, 1995).

Normalmente las bacterias que las producen son inmunes a su propia bacteriocina, se cree que la producción de éstas les confiere una ventaja competitiva contra otras bacterias en el mismo nicho ecológico (Hoover, 1992).

Las bacteriocinas son activas contra grupos bacterianos emparentados (Gram positivas) y generalmente no inhiben a bacterias Gram negativas, levaduras y hongos (Hoover y Steenson, 1993). Sin embargo se han encontrado bacteriocinas que presentan un espectro de actividad más amplio como la nisina y la bacteriocina J46 (Barrena-González *et al*, 1996b y Huot *et al*, 1996a).

La membrana de las bacterias Gram negativas también es sensible a la nisina pero su membrana exterior las protege. Si las células de cepas Gram negativas son tratadas con agentes quelantes como el EDTA, se provoca una alteración en los componentes lipopolisacáridos y las bacteriocinas pueden actuar sobre estas (Scannel *et al*, 1997).

1.3.5.3 Aplicación

Nisina

Es un polipéptido antibacteriano de aproximadamente 3500 Da producida por algunas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Hoover, 1992). Esta tiene una amplia aplicación comercial, fue usada por primera vez como conservador en 1951 y fue aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) para su uso como aditivo (Stiles, 1996).

La nisina está presente en forma natural en la leche y ha sido consumida por humanos por cientos de años. No ocasiona problemas toxicológicos, porque es inactivada por quimi tripsina al ser consumida.

En muchos países poco industrializados, donde la capacidad de refrigeración es limitada y deficiente, se adiciona nisina a la leche para evitar su descomposición. En Egipto la leche suplementada con nisina se mantiene satisfactoriamente por 21 días a 37 °C, solo con el proceso de pasteurización. En Europa Oriental se adiciona nisina como conservador en vegetales (Hoover, 1992).

Por otra parte, la nisina es usada junto a procesos de pasteurización ya que también es efectiva contra cepas termófilas como *Clostridium sp* que forman esporas, incrementando el tiempo de conservación del producto (Mazzota, 1997).

Un experimento realizado con carne curada sugiere que la nisina puede ser utilizada como bioconservador siendo equivalente a los nitritos en el control de *Clostridium* a una concentración de 2,000 UI/ml que corresponden a 50 ppm de nisina. Para obtener el mismo efecto de inhibición con nitritos se requieren 120 ppm (Scott y Taylor, 1981).

Actualmente la nisina es utilizada como conservador en alimentos y bebidas acidificadas donde las bacterias Gram positivas requieren control, algunos ejemplos en los que puede causar problemas durante el proceso de fermentación son: el desarrollo de *Lactobacillus* en vinos provoca un carácter viscoso o aceitoso por la síntesis de polisacáridos; *Pediococcus* en cerveza, puede alterar las propiedades sensoriales típicas, por la producción de diacetilo (Hoover y Steenson, 1993).

Otras bacteriocinas aún no han sido autorizadas como aditivo en alimentos. No obstante algunos estudios han mostrado que las bacteriocinas tienen gran potencial para su uso como conservadores, en particular la pediocina A por su efecto antibutírico y la pediocina ACh/PA-1 con actividad anti-*Listeria*, en la conservación de cárnicos (Stiles, 1996).

2. PESCADO

2.1 Composición química

Los principales componentes químicos de la carne de pescado son agua (entre 50 y 73.5%), proteína bruta (25%) y lípidos (2.5%), en conjunto forman hasta el 98% del peso total de la carne. Estos componentes tienen máxima importancia en lo referente al valor nutritivo, propiedades texturales, calidad sensorial y capacidad de almacenamiento de la carne. Los restantes constituyentes como los carbohidratos, vitaminas y sales minerales están presentes en menor cantidad (Zdzislaw, 1990).

- Proteínas

El contenido de proteína bruta está constituido por las proteínas y otros compuestos nitrogenados tales como ácidos nucleicos, nucleótidos, aminoácidos, urea, etc. Los músculos están constituidos por varios grupos de proteínas: las que forman la fracción sarcoplásmica, que comprende hasta un 30% de la cifra total de proteína presente, estas desempeñan las funciones bioquímicas en las células; las proteínas miofibrilares del sistema contráctil comprenden entre 40 y 60%; y las proteínas del tejido conjuntivo (colágeno y elastina) que constituyen alrededor del 3 al 10%, siendo responsables principalmente de la integridad de los músculos (Zdzislaw, 1990).

2.2 Descomposición

La pérdida de la calidad del pescado, ocurre durante las primeras fases de almacenamiento. La descomposición es causada por reacciones enzimáticas autolíticas que ocurren en el tejido y a la actividad bacteriana presente en la carne (Zdzislaw, 1990).

2.2.1 Autólisis

Se le llama autólisis al proceso de descomposición *post mortem*, en el cual participan enzimas endógenas de la carne. Estas pueden causar la degradación del ATP, la cual consiste en una gradual y progresiva desfosforilación hasta AMP, también ocurren cambios en la concentración de azúcares y glucofosfatos que contribuyen a la pérdida gradual del carácter dulce del pescado muy fresco, hay una disminución del pH por la producción de ácido láctico a partir de glucógeno. Tal acidificación influye en la liberación de fosfatos inorgánicos y amoníaco como consecuencia de la degradación enzimática del ATP. Durante las etapas posteriores de los cambios *post mortem*, la descomposición de los compuestos nitrogenados provoca el incremento del pH (Zdzislaw, 1990).

2.2.2 Contaminación microbiana

Se admite que el tejido muscular interno de los peces sanos y vivos es estéril (Gill, 1979), la microflora se localiza en: mucílago externo, agallas e intestino. La flora inicial del pescado es muy diversa, depende de la calidad microbiológica del lugar de captura, manejo y condiciones de almacenamiento (Gill y Newton, 1980 y Zdzislaw, 1990).

Si el pescado no es eviscerado inmediatamente, los microorganismos de descomposición pueden atravesar la pared intestinal difundiéndose posteriormente al músculo, este tipo de contaminación es muy frecuente durante la evisceración. Además, la microflora presente en agallas, piel y en la materia fecal del pez puede contaminar la piel de éste antes de la captura y difundirse posteriormente a la musculatura durante el proceso de fileteado (Ponce *et al*, 1997).

2.2.2.1 Factores que influyen en la contaminación

El tipo de flora que inicialmente invade la superficie de la carne fresca depende de los microorganismos presentes en el ambiente circundante, aunque posteriormente predominan los organismos que crecen más rápido como las bacterias lácticas y que tienen menores interacciones negativas con especies patógenas (Gill y Newton, 1977 y Gill 1986), esto varía dependiendo de las condiciones de almacenamiento, lo cual esta en función de factores exógenos y endógenos (Bucio, 1998).

Los factores exógenos son aquellos relacionados con el ambiente externo, como son la temperatura de almacenamiento y la disponibilidad de oxígeno en la atmósfera inmediata a la superficie de la carne, ambos son determinantes en el tipo de microorganismos dominantes en la carne. Así, dependiendo de la cantidad de oxígeno disponible se presenta el crecimiento de microorganismos aeróbios, microaerofilicos, anaerobios o anaerobios facultativos y dependiendo de la temperatura pueden ser psicrófilos, mesófilos o termófilos (Jay, 1992 y Zdzislaw, 1990).

Los factores endógenos que influyen en el crecimiento de los microorganismos en la carne varían con la naturaleza de los animales: la especie, la raza y la edad y de sus características fisicoquímicas *post mortem*, como el pH, el potencial redox y la disponibilidad de nutrientes selectivos de bajo peso molecular que están presentes en la superficie de la carne (Gill, 1976; 1982 y Zdzislaw, 1990).

2.2.2.2 Principales microorganismos de contaminación

Los principales microorganismos que participan en la descomposición del pescado se presentan a continuación:

- *Pseudomonas*

Es un género de organismos Gram negativos, aeróbios estrictos que, utilizan preferentemente la glucosa (Gill, 1986). Son los principales microorganismos en la contaminación aerobia de la carne cuando utilizan glucosa no producen compuestos odoríferos. Pero cuando la glucosa se agota degradan aminoácidos liberando compuestos azufrados (Macmeeking, 1982 y Greer, 1989).

Cuando existe limitación de oxígeno por empaques al vacío, las *Pseudomonas* utilizan aminoácidos aún cuando haya glucosa presente (Newton y Rigg, 1979). Probablemente la degradación de aminoácidos sea menos eficiente, con un incremento en la formación de subproductos odoríferos (Gill, 1986).

- *Brochothrix thermosphacta*

Es un microorganismo Gram positivo, anaerobio facultativo que puede presentarse en la carne almacenada en condiciones aeróbicas o anaerobias, aunque es de mayor importancia en estas últimas. La glucosa es el único substrato metabolizable para su crecimiento (Grau, 1979). El ácido acético y la acetoina son los principales productos del metabolismo de la glucosa en aerobiosis, los ácidos isovalérico e isobutírico son producidos por el metabolismo de la leucina y valina respectivamente. Las proporciones relativas de estos productos finales también se ven afectadas por las condiciones de desarrollo. A concentraciones bajas de glucosa y cerca del pH neutro, se favorece la producción de ácidos grasos; mientras que concentraciones altas de glucosa y a pHs bajos se favorece la producción de acetoina (Manual de Bergey's, 1989).

El alto potencial de descomposición de *B. thermosphacta* se debe a la producción de esos compuestos odoríferos (Dainty y Hibbbard, 1980). *B. thermosphacta* lleva a cabo metabolismo fermentativo en condiciones de anaerobiosis y el principal producto final es el L(+) ácido láctico, formándose solo pequeñas cantidades de ácidos volátiles, teniendo por lo tanto bajo potencial de contaminación bajo condiciones anaerobias, y probablemente es el principal microorganismo que contamina la carne empacada al vacío (Gill, 1986). Para el desarrollo de *B. thermosphacta* el pH óptimo es de 7.0, pero puede desarrollarse a pH de 5.0-9.0 (Brownlie, 1966).

- Enterobacterias

Son organismos anaerobios facultativos que incluyen un gran número de patógenos potenciales y organismos con alto potencial de alteración sensorial. Pueden ser dominantes a altas temperaturas y en condiciones anaerobias. Utilizan glucosa y algunos glucosa 6-fosfato (Gill, 1986). A altos valores de pH algunas especies utilizan aminoácidos azufrados, como la cisteína.

2.3 Compuestos indicadores

El metabolismo *post mortem* de los compuestos nitrogenados en la carne del pescado es el principal responsable de la pérdida gradual de frescura. La putrefacción, se debe a la descomposición de algunos componentes no proteicos que participan en el aroma a pescado, a la formación de compuestos aromáticos volátiles y a la degradación parcial de la carne; además de cambios en las proteínas que originan coloraciones y propiedades reológicas indeseables en el músculo. Durante los primeros días se debe a la autólisis, mas tarde influye el metabolismo bacteriano que conduce la descomposición final (Zdzislaw, 1990)

Muchos compuestos odoríferos se forman por la degradación de aminoácidos libres y por los aminoácidos liberados por proteólisis, los productos resultantes como las aminas, aldehídos, sulfuros y ácidos grasos de cadena corta, exhiben perceptibles olores pútridos indeseables.

Las aminas son indicadores químicos de la aceptabilidad o contaminación microbiana en productos cárnicos empacados al vacío (Dainty *et al*, 1986). Algunos productos de descarboxilación como la putrescina y la cadaverina son formadas principalmente por la acción de las bacterias, pueden suponer un peligro para la salud, por ejemplo, pueden provocar efectos tóxicos sobre el sistema cardiovascular.

En siguiente tabla se muestra los aminoácidos precursores para la formación de aminas biogénicas

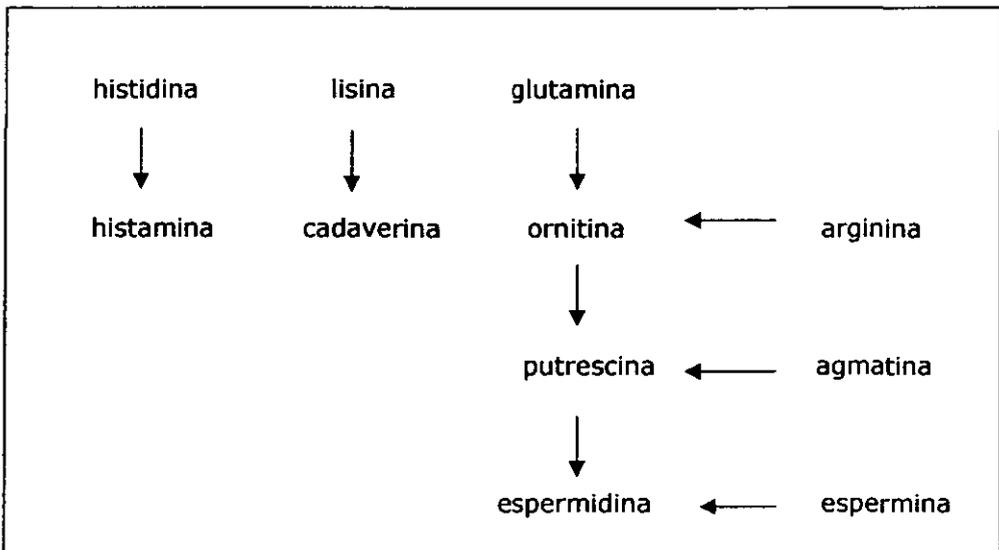


Tabla 2. Aminoácidos precursores para la formación de aminas biogénicas tomada de Zdzislaw (1990).

2.4 Métodos de conservación

La composición química y las características biológicas de la carne y pescado son un sustrato muy nutritivo para el crecimiento de bacterias, mohos y levaduras, que sólo puede detenerse en condiciones extremas como la congelación a temperaturas muy bajas (Gill, 1986). Debido a que la refrigeración es inadecuada para evitar el crecimiento de microorganismos psicrófilos es necesario modificar o utilizar procedimientos complementarios de conservación, que junto con la refrigeración consiguen aumentar la vida útil y garantizar la calidad sanitaria de la carne fresca (García *et al*, 1995).

Teniendo en cuenta la importancia de los microorganismos en la alteración de la carne, es necesario que la manipulación, almacenamiento y conservación de los productos cárnicos, retrasen o inhiban el crecimiento microbiano. Los métodos idóneos para la conservación de la carne y el pescado, deben reunir una serie de características entre las que destacan las siguientes: 1. Reducir o eliminar eficazmente la presencia de microorganismos patógenos y saprófitos. 2. No alterar las características sensoriales de la carne y pescado fresco. 3. Ser aceptados favorablemente por el consumidor (García *et al*, 1995).

En investigaciones recientes se han planteado métodos que pueden utilizarse conjuntamente con la congelación y la refrigeración, para aumentar la vida útil de la carne fresca y garantizar su calidad sanitaria. Algunos de ellos son: los envasados en atmósferas modificadas, como el empaque al vacío; el empleo de conservadores químicos; la irradiación y la utilización de bacterias lácticas y/o bacteriocinas (García *et al*, 1995).

2.4.1 Congelación

Congelar los alimentos supone reducir la temperatura por debajo del punto de congelación, de manera que la mayor parte del agua contenida en el alimento se transforme en hielo. El punto de congelación depende de la concentración de diferentes solutos en los líquidos tisulares.

La baja actividad del agua (a_w) de la fase líquida en el pescado congelado, aunada con la concentración elevada de los solutos que se debe a la formación de hielo, así como temperatura baja de almacenamiento, inhiben en conjunto la actividad bacteriana y ejercen efecto letal contra algunos microorganismos. Determinadas bacterias psicrotróficas pueden crecer incluso a temperaturas inferiores al punto de congelación, con una intensidad muy inferior al de los tejidos sin congelar, como algunas cepas de *Pseudomonas* que pueden crecer a menos 10 °C. Algunos mohos y levaduras crecen a -15 ó -18°C.

Inclusive a temperaturas bajas de almacenamiento, no se evita el desarrollo de cambios químicos y enzimáticos. Por lo general la congelación no inactiva por completo a la mayoría de las enzimas, aunque a temperaturas muy bajas la actividad puede disminuir considerablemente. Si bien, las reacciones de descomposición son muy lentas a -30°C, sus resultados originan alteraciones en las propiedades sensoriales del pescado congelado, cuando el depósito se prolonga durante muchos meses. Los componentes tisulares que provocan estos cambios son principalmente las proteínas y los lípidos (Zdzislaw, 1990).

2.4.2 Refrigeración

La refrigeración (a 4°C aproximadamente) es muy utilizada durante la manipulación inmediata a la pesca a bordo de los barcos. Consiste por lo general en un enfriamiento rápido para evitar la pérdida de los atributos de frescura del pescado por autólisis, desecación, oxidación de lípidos y pigmentos. La microflora ocasiona cambios posteriores indeseables en la calidad. Sin embargo, en refrigeración el tiempo de anaquel con una calidad sensorial admisible es corta, entre 5 y 8 días.

2.4.3 Envasado en atmósferas modificadas

El uso de atmósferas modificadas o controladas permite la disponibilidad de "alimentos frescos" indicando con esto que nunca han sido congelados. Lo cual puede representar una ventaja para el consumidor, ya que reduce costos en comparación con el almacenamiento en congelación. Además estos productos envasados no tienen cambios en la textura, aumentando el tiempo de anaquel (Guerrero y Lara, 1995).

La conservación de productos cárnicos en atmósferas distintas a la del aire persigue disminuir la tasa respiratoria de microorganismos patógenos limitando su crecimiento y retardar las reacciones enzimáticas, para prolongar la vida útil del producto. El envasado en atmósferas modificadas consiste en introducir la carne en bolsas impermeables al aire e insulfar la mezcla de gases elegida de acuerdo con las necesidades de su periodo de almacenamiento. El envasado al vacío puede considerarse como un tipo de atmósfera modificada, en el que tras envasar la carne en recipientes adecuados, se elimina el aire por medio de vacío y se realiza un sellado hermético de los envases.

La principal ventaja del envasado en atmósferas modificadas es la extensión de la vida útil de la carne entre 50 y un 400%, proporcionando un producto de buena calidad. Esto permite la distribución de la carne fresca a distancias mayores. (García *et al*, 1995).

En la carne envasada al vacío, el oxígeno residual se consume rápidamente debido al crecimiento microbiano y a la respiración muscular, alcanzándose al cabo de unos dos días niveles de CO₂ del orden del 20 al 30%. De esta manera el envasado al vacío puede considerarse como una atmósfera enriquecida con CO₂ (García *et al*, 1995).

En el envasado en atmósferas, el dióxido de carbono se utiliza por su capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano, aunque el mecanismo de acción no se conoce con exactitud. Su uso produce, en términos generales, un incremento en la fase de latencia y el tiempo de generación de los microorganismos alterantes de la carne. Su efecto varía con el tipo de microorganismo y la fase de crecimiento en que se encuentre. El CO₂ tiene un efecto inhibitor selectivo y por ello las bacterias psicrófilas aerobias Gram negativas y los mohos son especialmente sensibles a sus efectos, al mismo tiempo que se estimula el crecimiento de la flora láctica de crecimiento más lento.

En la carne envasada al vacío predominan los microorganismos de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Carnobacterium*. Sin embargo, en atmósferas modificadas enriquecidas en CO₂ y O₂ el principal responsable de la alteración de la carne es *Brochothrix thermosphacta* (García *et al*, 1995).

2.4.4 Conservadores Químicos

Se ha probado la eficacia de muchos compuestos químicos, como: ácido bórico, ácido salicílico, nitritos, ácido benzoico, cloraminas, peróxido de hidrógeno, fosfatos, propionatos y dióxido de azufre, los cuales se aplicaban en forma de baños o bien como aditivos del hielo empleado en la refrigeración. Estos resultados no han sido satisfactorios para aplicaciones a nivel comercial, debido a la escasa actividad de estos compuestos en las concentraciones que no producen efectos sensoriales rechazables y por suponer una amenaza para la salud pública, por ejemplo; se ha probado que el nitrito sódico impide el deterioro del pescado mezclado con hielo, sin embargo no se considera como conservador eficaz de la frescura, ya que al ser consumida puede originar la formación de nitrosaminas tóxicas y cancerígenas (Zdzislaw, 1990).

2.4.5 Irradiación

Las bacterias Gram negativas no esporuladas cuentan con la más alta sensibilidad a las radiaciones ionizantes. Una población bacteriana en fase de crecimiento logarítmico es más sensible que las de fase estacionaria. Las radiaciones que son necesarias para alcanzar la esterilización, es decir, para reducir la tasa bacteriana en 12 órdenes de magnitud origina en el pescado diversos cambios sensoriales indeseables, por la aparición de sabores extraños.

Diversas investigaciones indican que el pescado es adecuado para tratarlo con irradiación, con objeto de prolongar la vida útil del pescado, pero el tratamiento solo se lleva a cabo en países donde se cuenta con esta tecnología (Zdzislaw, 1990).

2.4.6 Fermentación láctica

La fermentación láctica es uno de los métodos más antiguos para preservar alimentos. Además de este propósito, incluye mejoras de las propiedades sensoriales como el sabor, aroma, apariencia visual, textura y consistencia que lo hacen más apetecibles y en algunos casos mejora su calidad nutricional (Shirai *et al*, 1995).

Las bacterias lácticas requieren para su crecimiento de azúcares como lactosa además de aminoácidos, vitaminas y otros factores. La leche es el medio típico y satisfactorio para su desarrollo aunque otros alimentos son excelentes medios de crecimiento, ejemplo de ello son los vegetales, las masas de cereales y las carnes, incluyendo el pescado (Shirai *et al*, 1995).

Las bacterias lácticas están presentes en forma natural en la carne y pescado, cuando se añade sal, ácidos orgánicos o se empaca al vacío, estas bacterias pueden dominar la microflora y antagonizar con otros microorganismos de descomposición, debido a que las bacterias lácticas no necesitan oxígeno para crecer, son tolerantes a valores de pH bajos (García *et al*, 1995), producen ácidos orgánicos (ácido láctico principalmente), peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y compiten por el substrato (Alexsson, 1993).

En general, las condiciones que favorecen el crecimiento de las bacterias coadyuvan a un incremento considerable de la vida útil de la carne ya que mejoran la calidad microbiológica (Farber *et al*, 1990).

La fermentación láctica modifica el material proteico en condiciones poco severas y no produce cambios significativos en las características sensoriales (Stiles, 1996 y Ponce *et al*, 1997) a diferencia de otros procedimientos utilizados para la elaboración de concentrados e hidrolizados (Ponce *et al*, 1997). Por lo tanto, la fermentación láctica es un método eficiente para enfrentar los problemas de extensión de la vida útil del pescado.

III. JUSTIFICACIÓN

Recientemente, en la industria alimentaria, las investigaciones se han enfocado a la búsqueda de conservadores de origen natural, ya que los conservadores utilizados tradicionalmente como los nitritos, nitratos y ácidos, que son de origen químico, se usan para eliminar microorganismos patógenos que pueden representar un riesgo para la salud humana (Hoover y Steenson, 1993).

Debido a que la refrigeración es inadecuada para evitar el crecimiento de microorganismos psicrófilos es necesario modificar o utilizar procedimientos complementarios de conservación, que junto con la refrigeración consigan aumentar la vida útil y garanticen la calidad sanitaria de la carne fresca (García, *et al*, 1995).

El minimizar los procesos de elaboración (los consumidores piensan que son más naturales) o eliminar los productos químicos para conservar los alimentos, es más atractivo, ya que se prefiere lo natural, con apariencia fresca y se tiende a seleccionar alimentos no procesados (Hoover, 1992).

Se ha incrementado una mayor demanda de productos cárnicos incluyendo el pescado, con calidad y apariencia fresca, esto ha provocado el uso de atmósferas modificadas como empaque al vacío, lo que trae como consecuencia, el desarrollo de una microflora altamente competitiva que consiste en primer lugar de bacterias lácticas.

Estas bacterias son capaces de competir en carne empacada al vacío, por su resistencia a los efectos del dióxido de carbono sobre la célula y a la producción de sustancias antimicrobiales que incluyen peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos y bacteriocinas (McMullen y Stiles, 1996).

El uso potencial de bacteriocinas producidas por bacterias lácticas como bioconservadores para aumentar la vida útil y la calidad sanitaria de cárnicos es inmenso. Se han encontrado bacteriocinas que reducen el crecimiento de bacterias patógenas e inhiben la germinación de esporas bacterianas como *Clostridium*. Este método de conservación no ha sido explotado en la industria y es por lo tanto, un campo muy amplio de investigación con aplicaciones comerciales futuras.

IV. OBJETIVOS

1. Seleccionar y caracterizar cepas de bacterias lácticas sobreproductoras de ácido láctico y/o bacteriocinas.

2. Caracterizar a la bacteriocina **L5** producida por *Lactococcus lactis L5*.

3. Empleo de la fermentación láctica en músculo fresco de cazón empacado al vacío como método alternativo para aumentar el tiempo de conservación por efecto de bacterias lácticas sobreproductoras de ácido láctico y/o bacteriocinas.

V. METODOLOGÍA

3.0 Fuente de obtención de las cepas de bacterias lácticas

Se aislaron 12 cepas de bacterias lácticas a partir de productos lácteos, embutidos y pescado. Por otra parte, también se probaron cepas de colección, en ambos grupos se realizaron pruebas para seleccionar cepas sobreproductoras de ácido láctico y/o bacteriocinas.

4.0 Pruebas de identificación de bacterias lácticas.

Se hicieron pruebas para detectar la naturaleza y pureza de las cepas, que consistieron en:

4.1 Evaluación de las características morfológicas de las colonias.

Se evaluaron los parámetros morfológicos como: forma, borde, pigmentación y olor, esto se determinó en cultivos de 48 h en placas de agar en medio Elliker* a una temperatura de 30 °C en jarras de anaerobiosis con atmósfera enriquecida de CO₂ (Gaspak, BBL).

4.2 Morfología microscópica.

Se realizó una tinción de Gram en cultivos de 24 h en medio Elliker líquido, crecidos en jarras de anaerobiosis enriquecidas con atmósfera de CO₂ (Gaspak, BBL).

* Ver pagina 1

4.3 Capacidad para disminuir el pH.

Se realizaron cultivos en medio líquido Elliker o MRS* durante 24 h a 30 °C en jarras de anaerobiosis en atmósfera enriquecida de CO₂ (Gaspack, BBL) para las todas cepas y se midieron los valores de pH al inicio y final de la fermentación.

5.0 Selección

5.1 Detección de compuestos antimicrobiales

Este método nos permite la detección de microorganismos que poseen características inhibitorias y la fácil detección de un porcentaje pequeño de microorganismos útiles presentes en la población, así como la eliminación de microorganismos que al no presentar actividad, carecen de valor para nuestros fines.

Se realizó una selección cruzada, para detectar la producción de sustancias antimicrobiales, mediante el método diferido de Mayr-Harting, *et al* (1972) el cual consistió; en crecer las cepas en placas de agar con medio Elliker, usando un inóculo al 1%. Se crecieron durante 48 h a 30 °C en jarras de anaerobiosis con atmósfera enriquecida con CO₂ (Gaspack, BBL). Posteriormente se colocó una segunda capa homogénea, con otra cepa, en medio Elliker semisólido aproximadamente 40-50 °C (70 µl cepa/10 ml de medio) y se dejó incubar 24 h, posteriormente se observó la presencia de halos de inhibición en la capa superficial.

5.2 Detección de producción de Bacteriocinas

Una vez seleccionadas las cepas con actividad inhibitoria se realizó una segunda selección mediante la técnica de pozos de agar (plate-diffusion test) establecida por Schilliner y Lucke en 1989, para detectar la producción de metabolitos de tipo bacteriocinas en las diferentes cepas. Para este propósito las posibles cepas productoras (**P**) se incubaron en medio Elliker al 1% de inóculo a 30 °C de temperatura en jarras de anaerobiosis con atmósfera enriquecida de CO₂ (Gaspack, BBL) durante 18 h. Después las células fueron removidas del cultivo por centrifugación a 10,000 rpm a 4 °C durante 10 minutos, el sobrenadante se ajustó a pH 6.0 y se esterilizó por filtración a través de membranas millipore con tamaño de poro de 45 µm.

Por otra parte, se creció un cultivo de la cepa indicadora (**S**) hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm entre 0.18 y 0.2. Con este cultivo, se hicieron diluciones seriadas en solución salina hasta 10⁻² (8.5 NaCl g/l) y se inoculó en medio Elliker semisólido (70 µl de la dilución/10 ml). Se dejó solidificar y posteriormente se hicieron pozos de 6 mm de diámetro sobre la placa. En los pozos se colocó 25 µl del sobrenadante de **P**.

Posteriormente, la caja contenedora se dejó toda la noche en refrigeración (4 °C) para que el sobrenadante difundiera en el agar, después se incubaron por 24 h a 30 °C en jarras de anaerobiosis en microaerofilia. De esta manera se pudo observar una zona de inhibición después de la incubación, lo cual permitió considerar la presencia de una sustancia antimicrobial del tipo bacteriocina producida por las cepas de bacterias lácticas.

La selección de estas bacterias lácticas se hizo con el fin de encontrar cepas con gran capacidad de competir por el sustrato, durante la fermentación láctica del músculo de cazón fresco, así como detectar la producción de ácido láctico y/o bacteriocinas que inhiban cepas contaminantes.

6.0 Caracterización de cepas seleccionadas

6.1 Cinética de crecimiento

De 22 cepas de bacterias lácticas se seleccionaron 5 cepas, de acuerdo a su capacidad para producir sustancias del tipo bacteriocina y sobreproductoras de ácido láctico de las cuales se evaluó la cinética de crecimiento, siguiendo la evolución de la densidad óptica a 600 nm y los cambios de pH a lo largo del tiempo. Esto se realizó en cultivos en tubos de 50 ml con 40 ml de medio MRS, inoculando al 10% (v/v) a partir de un cultivo de 18 horas. Se incubó durante 25 horas a 30°C en una atmósfera reducida de oxígeno. Tomando muestras por duplicado cada hora.

6.2 Perfil de ácidos orgánicos

La concentración de ácido láctico se midió en cultivos de 24 h, inoculados al 1% e incubados en atmósfera reducida en O₂. La concentración del ácido láctico se determinó mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC), acoplado un detector de índice de fracción Perrkin-Elmer 250 Norwalk, C.T. (EUA), con una columna Phenomex rezex organic acid 00H-0138-60 de 300 X 7.8 mm y usando H₂SO₄ (60 mM) como fase móvil.

7.0 Caracterización de la bacteriocina L5

7.1 Producción en fermentador

Se cultivó *Lactococcus lactis* L5 en medio Casein Glucose Broth (CGB*) durante 18 horas en un fermentador de 4 litros "New Brunswick Scientific" con controladores automáticos de pH manteniéndolo a un valor de 5.5 por la adición de NaOH 1.5 N estéril con agitación de 200 rpm en una atmósfera reducida de oxígeno y a una temperatura de 30 °C (Barrena-González, 1996a).

7.2 Purificación parcial

Se realizó una purificación parcial de la bacteriocina L5 para aumentar la actividad. Se centrifugó el cultivo de 18 h a 10,000 rpm a 4°C durante 45 min, se ajustó el pH del sobrenadante a 6 con NaOH 1.5 N a 4 °C, se hizo una precipitación por salado con sulfato de amonio al 60%, adicionándolo poco a poco durante 48 horas a 4 °C en agitación constante. Después se centrifugó el sobrenadante a 10,000 rpm durante 45 minutos a 4 °C y se recuperó el precipitado en 60 ml de tampón fosfatos, se vertió la solución en membranas de diálisis previamente preparadas (ver anexo 3) con tamaño de poro de 600-800 Da. Las bolsas de diálisis se colocaron en amortiguador de fosfatos 25 mM pH 6 y se dializó en 4 litros a 4 °C durante 48 horas con cambios cada 6 horas. Posteriormente, el dializado se filtró a través de una membrana millipore de 0.45 µl y se congeló a -20 °C en volúmenes de 10 ml, para evitar su degradación (Grajales, 1999). Se realizaron pruebas de actividad mediante la técnica de pozos de agar (Schilliner y Lucke, 1989) para detectar la presencia de la bacteriocina antes y durante todo el proceso de purificación (extracto crudo, dializado y filtrado).

* ver anexo 1

7.3 Cuantificación de la bacteriocina

Para la cuantificación de la bacteriocina se hizo el título, el cual se definió como el recíproco de la dilución más alta donde se detectó inhibición de la cepa indicadora (**L1**), expresada como Unidades Arbitrarias (UA) por mililitro (Huot, 1996a). Para ello se llevaron a cabo diluciones seriadas de la bacteriocina L5 parcialmente purificada, de 10^{-1} hasta 10^{-64} en tampón fosfatos 25 mM pH 6, para realizar la técnica de pozos de agar teniendo a *Lactococcus lactis B37* (**L1**) como microorganismo indicador (8 UA/25 μ l de bacteriocina se adicionaron en los pozos).

7.4 Espectro de actividad de L5

Se probaron diferentes cepas para observar el espectro de actividad de la bacteriocina por medio de la técnica de pozos de agar, a continuación se enlistan las cepas probadas:

CEPAS Y CONDICIONES DE DESARROLLO

Cepa	Gram positivas	Condiciones de crecimiento
LM3*	<i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Micrococcus kristinae-variens</i>	MRS, 30°C
Lp*	<i>Lactobacillus pentosus</i>	MRS, 30°C
L1**	<i>Lactococcus lactis B-37</i>	ELLIKER, 30°C
L2**	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	ELLIKER, 30°C
L3**	<i>Lactococcus lactis B-35</i>	ELLIKER, 30°C
L4**	<i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i>	ELLIKER, 30°C
Bt*	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	BT, 30 °C
	Gram negativos	
Ec**	<i>Escherichia coli</i>	LB, 30°C
Ps*	<i>Pseudomona fragi</i>	TSB, 30°C

TABLA 3. Cepas y condiciones de desarrollo usados en este estudio. Cepas de la Universidad Autónoma Metropolitana-1* y del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM**.

7.5 Comparación del espectro de actividad de L5 y Nisina

Para llevar a cabo la comparación de la bacteriocina L5 y la nisina (Sigma Chem. Co. Louis. MO, EUA) se hicieron pruebas de actividad de la nisina sobre las cepas antes mencionadas. Se realizó una solución de nisina (0.05 g/5 ml con amortiguador de fosfatos 25 mM pH 6), primero se disolvió en 2 ml de HCl 0.02 N, se ajustó el pH 5.8-6.0 con NaOH 1 N y se aforó a 5 ml con amortiguador de fosfatos pH 6.0. Se esterilizó por filtración con una membrana millipore con tamaño de poro de 45 μ m.

8.0 Fermentación láctica en músculo fresco de cazón

Dado que la fermentación láctica modifica el material proteico en condiciones poco severas y no produce grandes cambios en las características sensoriales (Stiles, 1996 y Ponce *et al*, 1997) y es un método eficiente para enfrentar los problemas de extensión de vida útil en productos cárnicos, se decidió emplear la fermentación láctica en músculo fresco de cazón (*Rhizopriondon longurio*) empacado al vacío como método alternativo para aumentar el tiempo de conservación utilizando dos cepas de bacterias lácticas sobreproductoras de ácido láctico y/o bacteriocinas.

Las cepas que se utilizaron para llevar a cabo la fermentación láctica en músculo fresco son las siguientes:

Lactococcus lactis subsp. lactis (L5)

Lactobacillus pentosus (Lp)

Lactobacillus plantarum y *Micrococcus kristinae-variens* (LM3)

Bacteria Láctica aislada de tejido muscular de cazón, en proceso de identificación (MM2)

8.1 Preparación de los inóculos

Las cepas se inocularon en matraces de 250 ml en medio MRS líquido a 30 °C, la incubación se mantuvo durante aproximadamente 24 h, hasta que la suspensión de células alcanzó una densidad óptica de 1.0 a 600 nm. Las cepas se usaron inmediatamente después transcurrido el tiempo de incubación

8.2 Preparación del músculo fresco de cazón.

Se utilizó el músculo de cazón fresco, obtenido de un mercado local. La piel y el hueso fueron eliminados a fin de trabajar únicamente con el tejido muscular, posteriormente se molió en condiciones asépticas.

Se prepararon muestras de 250 g a las que se adicionó dextrosa al 5% (p/p) (este valor fue establecido en experimentos anteriores en el laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas UAM-I) y se inocularon con la cepa sobreproductora de ácido láctico (**LM3**, **Lp** y **MM2**) y la cepa productora de bacteriocina (**L5**) al 2.5% (v/p) de inóculo de cada cepa. De esta manera, se tenían 6 muestras de 60 g, para cada uno de los tiempos en los 8 tratamientos.

8.3 Tratamientos

El objetivo de estos tratamientos fue estudiar el efecto de dos cepas de bacterias lácticas: una productora de bacteriocinas y otra sobreproductora de ácido láctico durante la fermentación de músculo de cazón. Con el fin de reducir la carga microbiana responsable de la descomposición.

En trabajos realizados en la UAM-I por Ponce *et al* (1997) se llevaron a cabo pruebas de fermentación inoculando porciones de tejido muscular de cazón adicionando dextrosa y empacando al vacío, se encontró que la cantidad de inóculo y dextrosa tenían un efecto significativo sobre el músculo de cazón, donde valores entre 5 y 7 % (p/p) de dextrosa y 2.5 y 7 % (p/v) de inóculo no afecta significativamente entre ellas. Por otra parte, de acuerdo al índice de similitud (índice R) para carne fresca inoculada con bacterias lácticas, se observó que la jugosidad no se ve alterada, además el perfil descriptivo mostró similitud en cuanto a sabor residual, olor y textura. En cuanto al sabor se describió una ligera acidez en las muestras fermentadas con respecto a un control de carne sin inóculo (Ponce *et al*, 1997). Tomando en cuenta estos resultados se decidió utilizar los porcentajes de inóculo descritos en la tabla siguiente:

Inóculo	Porcentaje
Sin inóculo	0%
L5	2.5 %
Lp	2.5 %
LM3	2.5 %
MM2	2.5 %
L5+MM2	5.0 %
L5+LM3	5.0 %
Lp+L5	5.0 %

Tabla 4. Estos son las ocho diferentes condiciones, que se utilizaron para inocular el músculo de cazón, el tratamiento sin inóculo representa el control

8.4 Empacado y almacenamiento

Las muestras se empacaron en condiciones asépticas, en películas de Cryovac al vacío en una empacadora Multivac (Kansas). Es importante mencionar que se revisó escrupulosamente el buen sellado de las bolsas de plástico. Las muestras se almacenaron a 19 °C por 10 días

8.5 Muestreo

El muestreo se realizó cada tercer día para los 8 diferentes tratamientos. Para evaluar la cinética microbiana, análisis fisicoquímicos y la producción de bacteriocina durante la fermentación del músculo de cazón.

8.6 Análisis Microbiológicos

Se cuantificaron las poblaciones de *Pseudomonas*, *Brochothrix thermosphacta* y enterobacterias como indicadores de descomposición y de la capacidad de las bacterias lácticas para competir exitosamente por el substrato durante la fermentación láctica. Esto se realizó mediante conteo en placa equiparando el número de células bacterianas como las unidades formadoras de colonias.

Las muestras fueron tomadas con la siguiente técnica: el empaque se abrió en condiciones asépticas con tijeras previamente desinfectadas y se tomó la muestra.

Para el conteo en placa se utilizaron 10 g de muestra a los que se le añadieron 90 ml de solución salina peptonada (1:10). La muestra se homogeneizó moliendo en licuadora durante 30s. Esta se tomó como la primera dilución y a partir de esta se hicieron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} y finalmente se sembraron 100 μ l de cada dilución haciéndolo por duplicado en medios específicos para cada microorganismo en condiciones estériles.

El número de colonias fue contado en las cajas petri que presentaron un número de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) entre 30 y 300. Cuando el número de colonias fue superior a 300 y se encontraron aleatoriamente distribuidas, se contaron solo las colonias en las áreas indicadas en un cuenta colonias y posteriormente se calculó la población total de la caja.

La cuenta en placa de *Brochothrix thermosphacta* se realizó en medio STAA*, enterobacterias fueron en medio VRB* (Agar bilis rojo neutro-cristal violeta) y *Pseudomonas* en GSP* (Glutamate Starch Penicillin).

8.7 Análisis fisicoquímicos

- pH

Se pesaron 10g de muestra de músculo de cazón en condiciones asépticas y se homogenizó en licuadora con 100ml de agua destilada, se filtró a través de manta de cielo para eliminar tejido conectivo y se registró el pH en el potenciómetro (ver anexo 2. pH).

- Acidez Total Titulable (ATT)

Se utilizaron 10g de músculo de cazón y se homogenizó en la licuadora con 200 ml de agua destilada, se filtró en manta de cielo, el filtrado se colocó en un matraz de 250 ml y se aforó con agua destilada (quedando una dilución 1:5). La titulación se realizó con NaOH 0.01 N, usando fenolftaleína como indicador. La ATT es expresada en porcentaje de ácido láctico (Ver anexo 2. ATT).

- Extracción de diaminas biogénicas

La extracción de diaminas biogénicas se realizó derivatizando con cloruro de benzoilo y la separación se hizo mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC) en una columna de fase reversa C-18 (5 μ m 125X2.5 mm) X 9.82 m² con un detector ajustado a 254 nm usando como eluyente metanol y H₂O, con un flujo de 0.5 ml/min (ver anexo 2)

* Ver anexo 1

8.8 Detección de la producción de bacteriocinas

Se pesaron 10 g de muestra fermentada homogeneizada en 100 ml de agua destilada se filtró y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos, se ajustó el pH 6.0 y se hizo la prueba de pozos de agar, utilizando a la cepa **L1** como sensible (Schilliner and Lucke, 1989).

9.0 Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y se analizaron estadísticamente en el paquete SAS (SAS Institute, versión 6.10) por la prueba de análisis de varianza no paramétrica (kruskal-Wallis), donde la variación total de un conjunto de datos se divide en varios componentes y cada uno de ellos se asocia a una fuente específica de variación, de manera que durante el análisis es posible encontrar la magnitud con la que contribuye cada una de esas fuentes en la variación total (Daniel, 1997).

Esta prueba no paramétrica, se utilizó porque las poblaciones de las cuales se extrajeron las muestras no siguieron una distribución normal y tuvieron varianzas diferentes. En esta análisis no se utiliza directamente mediciones de cantidades conocidas, solo se toman en cuenta rangos, los cuales representan la magnitud de cada observación respecto a la magnitud de cualquier otra observación (Daniel, 1997).

En este estudio se consideró como fuente de variación al inóculo y se midió la magnitud en la que contribuye sobre las variables de respuesta. Se consideraron como variables: los cambios de pH, la acidez total titulable, la concentración de diaminas biogénicas y el crecimiento en la población de bacterias responsables de la descomposición como: *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* y enterobacterias.

Cuando hubo diferencias significativas por la fuente de variación, el análisis de datos se hizo mediante una agrupación de los rangos por la prueba de kruskal-Wallis (Daniel, 1990), para detectar las diferencias o similitudes entre los tratamientos.

VI. RESULTADOS

10.0 Descripción de las bacterias lácticas utilizadas

Las 22 cepas, se describieron como cepas típicas de bacterias lácticas: Gram positivas, no esporuladas, ácido tolerantes que proliferan en hábitats con atmósfera rica en CO₂. De acuerdo a la morfología de las colonias todas son: circulares, cóncavas, con margen entero, blancas y cremosas de las cuales el 73% correspondió a cocos y el 17% a bacilos, todas con capacidad de disminuir eficientemente el pH entre rangos de 4.7 y 3.74, cuando crecieron en medio Elliker líquido, en una atmósfera rica en CO₂ durante 24 horas a 30 °C de temperatura (ver tablas 5 y 6).

CEPAS AISLADAS

Cepa	Fuente	Gram	Morfología	pH
ASY	Bebida con bacilos lácteos	+	cocos	4.4
BSY	Bebida con bacilos lácteos	+	cocos	4.4
CSY	Yoghurt casero	+	cocos	4.7
DSY	Yoghurt casero	+	cocos	4.4
ESC	Crema casera	+	cocos	4.6
FSS	Salchicha	+	cocos	4.4
GSQ	Queso fresco	+	cocos	4.5
MM1	Pescado	+	cocos	4.7
MM2	Pescado	+	cocos	4.3
M5	Pescado	+	cocos	4.4
PM3	Pescado	+	bacilos	4.4
PM7	Pescado	+	bacilos	4.4

TABLA 5. Cepas aisladas. Se describe la fuente donde fueron aisladas, dentro de sus características son: la respuesta a la tinción de Gram, morfología microscópica y cambios de pH presentado al final de la incubación.

CEPAS DE COLECCIÓN

Cepa	Fuente	Morfología	Gram	PH
LM3*	<i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Micrococcus kristinae-varians</i>	Bacilos y cocos	+	3.74
La*	<i>Lactobacillus alimentari</i>	Bacilos	+	4.43
Lh*	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Bacilos	+	4.38
Sc*	<i>Staphylococcus carnosus</i>	Cocos	+	4.40
Lp*	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Bacilos	+	4.70
L1**	<i>Lactococcus lactis</i> B-37 NRRL-B- 2356	Cocos	+	4.50
L2**	<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> ATCC-B-147	Cocos	+	4.31
L3**	<i>Lactococcus lactis</i> B-35 NRRL-B- 633	Cocos	+	4.73
L4**	<i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i> BM-B-149	Cocos	+	4.38
L5**	<i>Lactococcus lactis</i> BM-B-337	Cocos	+	4.35

TABLA 6 (*) cepas de la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa y (**) cepas de la colección del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Dentro de sus características fueron: la respuesta a la tinción de Gram, morfología microscópica y los cambios de pH presentado al final de la incubación.

11.0 Detección de compuestos antimicrobiales

- Selección primaria

Esta técnica de selección cruzada es para detectar la producción de sustancias antimicrobiales por el método diferido de Mayr-Harting, *et al* (1972). Se observó que las cepas sembradas en la parte superficial de la caja no crecieron por efecto antagónico de las colonias de las cepas crecidas en la capa inferior.

En esta prueba preliminar se detectó que todos los microorganismos tienen la capacidad de producir sustancias antimicrobiales, que pueden consistir en: ácidos orgánicos (láctico, acético y propiónico), diacetilo y bacteriocinas, comunes en las bacterias lácticas ya que se inhibieron entre sí.

- Detección de la producción de bacteriocinas

En las pruebas realizadas para la detección de bacteriocinas se encontró que la cepa de *Lactococcus lactis* (L5), es capaz de producir bacteriocinas cuando es crecida en medio líquido Elliker, MRS y CGB, con atmósfera reducida de oxígeno y rica en CO₂ a una temperatura de 29-30 °C. Se observó que esta bacteriocina tiene efecto antagónico contra cepas relacionadas como *Lactococcus lactis subsp cremoris* (L4) y *Lactococcus lactis* B37 (L1). Esta última cepa es inhibida más eficazmente, ya que el efecto fue más pronunciado cuando se sometió al extracto crudo en pruebas de mortalidad (Grajales, 1999).

12.0 Características de las cepas seleccionadas

De acuerdo a pruebas preliminares se seleccionaron 5 cepas de bacterias lácticas, capaces de disminuir eficientemente el pH, debido a la producción de ácidos orgánicos, una de estas cepas fue capaz de producir bacteriocinas (L5), la quinta cepa (L1) fue seleccionada por ser el microorganismo más sensible a la bacteriocina.

La caracterización de las cepas tuvo el objeto de conocer el crecimiento y los cambios de pH a lo largo del tiempo, el perfil de ácidos orgánicos además de la cantidad de ácido láctico producido por estas cepas, con el fin de detectar los metabolitos responsables del efecto antagonista contra bacterias de descomposición, durante la fermentación láctica de músculo fresco de cazón.

Las cepas seleccionadas se enlistan a continuación:

Lactococcus lactis B37 **L1**

Lactococcus lactis BM-B-337 **L5**

Lactobacillus pentosus **Lp**

Lactobacillus plantarum y *Micrococcus kristinae-variens* **LM3**

Bacteria láctica aislada de músculo de cazón, en proceso de identificación
MM2

Las cinco cepas seleccionadas tuvieron la capacidad de crecer a una temperatura de 30°C durante 25 horas en medio MRS líquido en una atmósfera reducida de oxígeno.

En la figura 1 se observa el crecimiento de la cepa **L1** utilizada como sensible durante las pruebas de actividad bactericida.

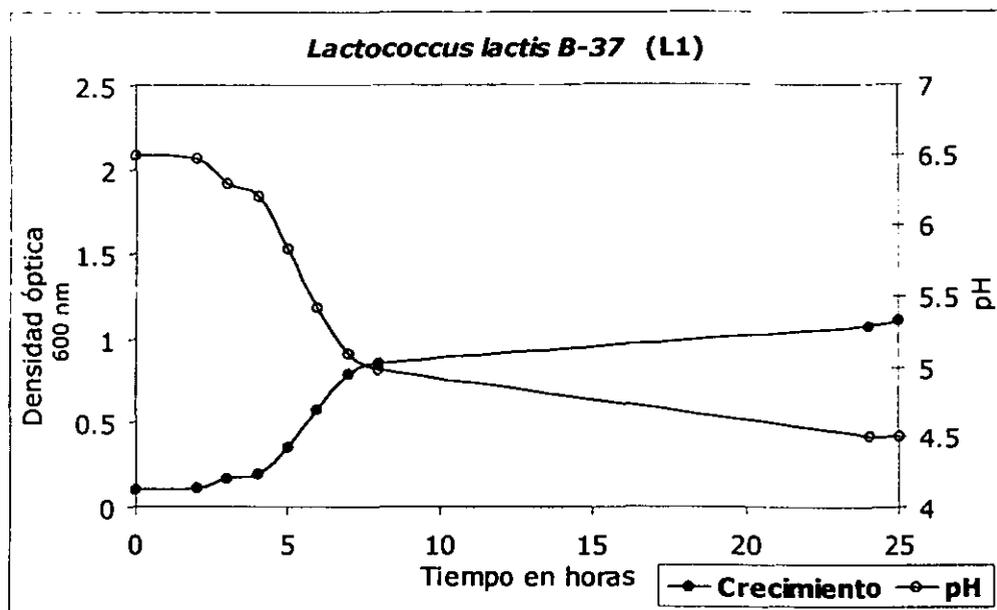


FIGURA 1 Curva de crecimiento de **L1** y cambios en el pH. La cepa se creció en medio MRS a una temperatura de 30°C en una atmósfera reducida de oxígeno durante 25 horas.

La cepa **L1** tuvo una fase de adaptación (Lag) de aproximadamente 4 h, alcanzando su estado estacionario a las 10 h, que se prolonga hasta las 25 h. Los mayores cambios de pH fueron durante la fase exponencial y fue esta capaz de disminuir el pH hasta valores de 4.5

En la figura 2 se muestra el crecimiento de *Lactococcus lactis* L5 en el tiempo. Esta cepa mostró capacidad de producción de bacteriocinas y además produjo 22% de ácido láctico de acuerdo a la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC).

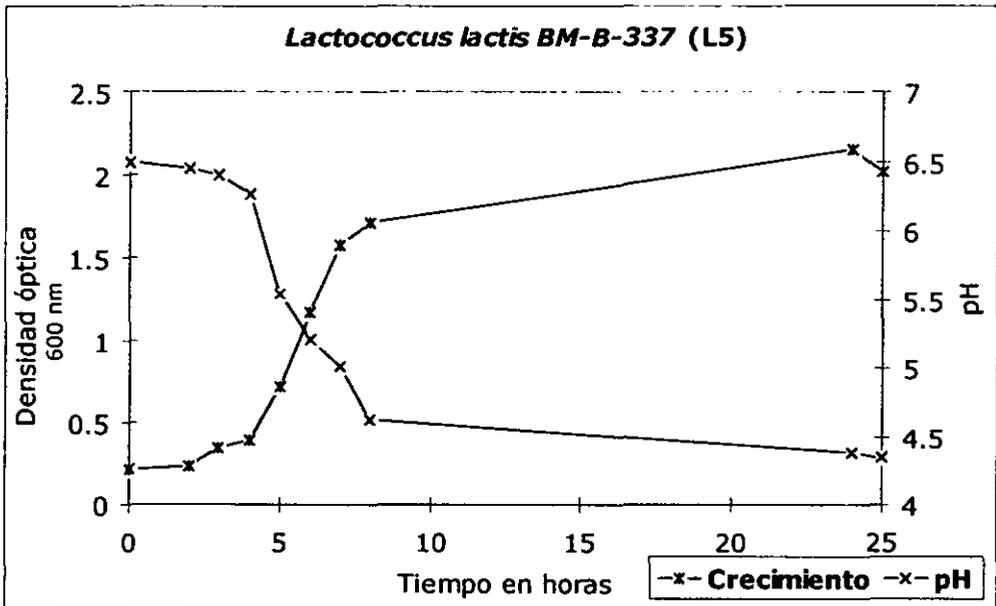


Figura 2. Curva de crecimiento de L5 y cambios en el pH. La cepa se creció en medio MRS a una temperatura de 30°C en una atmósfera reducida de oxígeno durante 25 horas.

Tiene una fase Lag corta de 2 h aproximadamente, alcanzando su estado estacionario a las 8 h y manteniéndolo 25 h. Los cambios de pH están relacionados con el crecimiento donde se observa que los mayores cambios están durante la fase exponencial, L5 tuvo la capacidad de disminuir el pH hasta valores de 4.35.

En la figura 3 se observa el crecimiento y los cambios del pH durante la incubación de *Lactobacillus pentosus* (Lp). Este microorganismo ha sido utilizado como cepa iniciadora en productos cárnicos a nivel comercial. En investigaciones anteriores se utilizó en carne cruda de: cerdo y res para llevar a cabo una fermentación láctica controlada con el objeto de aumentar el tiempo de anaquel (Ponce *et al*, 1997 y Bucio, 1998).

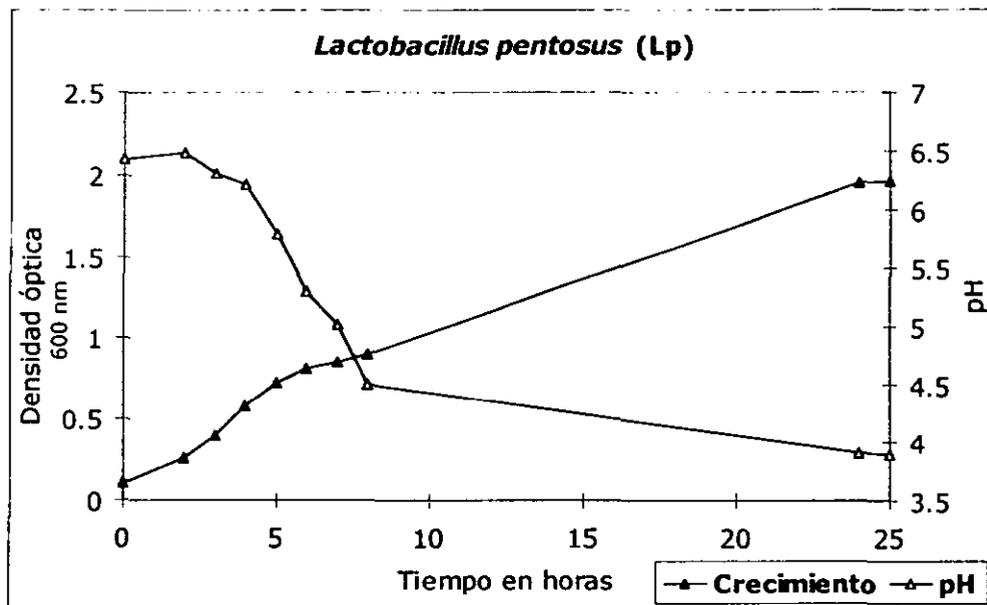


FIGURA 3. Curva de crecimiento de Lp y cambios en el pH. La cepa se creció en medio MRS a una temperatura de 30°C en una atmósfera reducida de oxígeno durante 25 horas.

Lactobacillus pentosus (Lp) tuvo la capacidad de disminuir el pH eficientemente desde la segunda hora de incubación, detectándose cambios rápidos de pH durante las primeras 6 horas. El crecimiento fue lento y continuo durante el tiempo de incubación.

En la figura 4 podemos observar el crecimiento de las cepas *Lactobacillus plantarum* y *Micrococcus kristinae-variants* (LM3). Cepas con gran capacidad de disminuir el pH, además han sido utilizadas como cepas iniciadoras en productos cárnicos a nivel comercial en carne cruda de: cerdo y res para llevar a cabo una fermentación láctica controlada con el objeto de aumentar el tiempo de anaquel (Ponce *et al*, 1997 y Bucio, 1998).

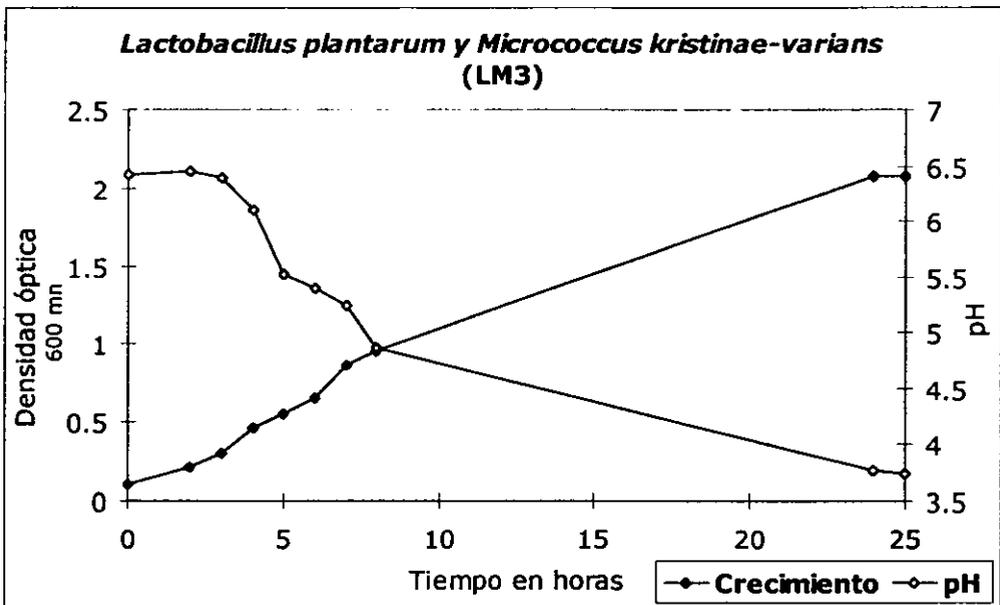


FIGURA 4. Curva de crecimiento de LM3 y cambios en el pH. La cepa se creció en medio MRS a una temperatura de 30°C en una atmósfera reducida de oxígeno durante 25 horas.

Mostró un crecimiento lento y continuo desde el inicio. En las primeras 3 h de incubación, el crecimiento es lento y sin cambios en el pH, después hay una disminución rápida de pH entre las 3-5 h y después de las 7 h. Se observa que existe una correlación entre la disminución de pH y el crecimiento, a lo largo del tiempo de incubación.

En la figura 5 se observa el crecimiento de **MM2** cepa aislada de tejido muscular de cazón, la cual esta en proceso de identificación. De acuerdo al perfil de ácidos orgánicos (por la técnica de HPLC) se muestra que el ácido láctico fue el principal componente detectado, con una producción promedio de 40mg/ml, también se observaron pequeñas cantidades de ácido acético y propiónico, por lo que esta cepa se considero como bacteria láctica heterofermentativa (Ponce *et al*, 1997).

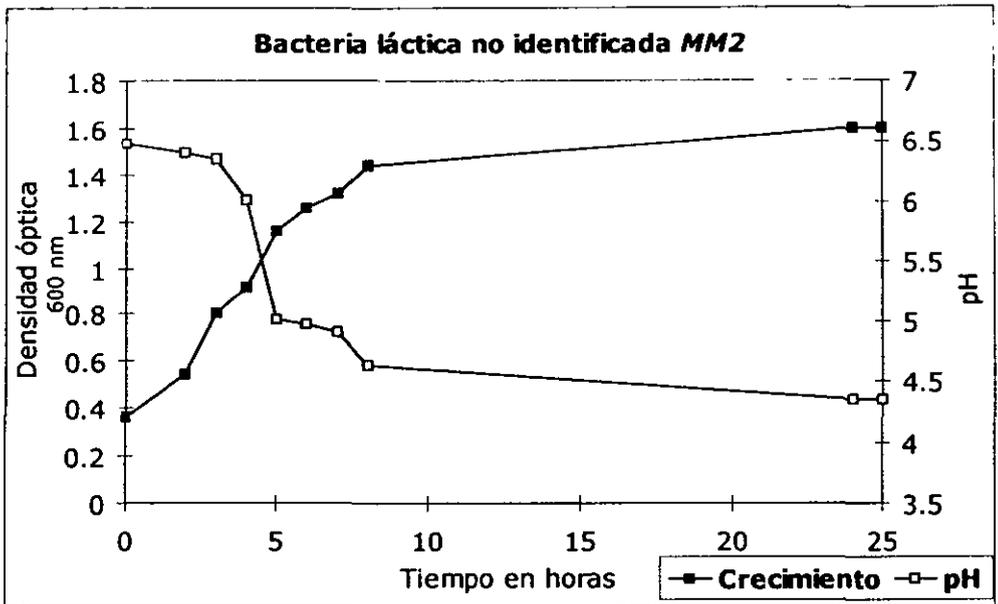


FIGURA 5. Curva de crecimiento de **MM2** y cambios en el pH. La cepa se creció en medio MRS a una temperatura de 30°C en una atmósfera reducida de oxígeno durante 25 horas.

Se muestra que la cepa denominada **MM2** presentó un crecimiento de tipo exponencial y alcanzó su estado estacionario a las 10 h de incubación manteniéndose en esta etapa hasta las 25 horas. Respecto al pH se observó que la mayor disminución fue a las 4 h con valores de 6 a 4.8, los cambios posteriores fueron lentos alcanzando un pH final de 4.4.

13.0 Caracterización de la bacteriocina L5 producida por *Lactococcus lactis* L5

Las condiciones de crecimiento de L5 en fermentador fueron consideradas las óptimas, anteriormente se describió que la producción de la bacteriocina inicia a la 4 h manteniéndose hasta las 18 h. La producción de bacteriocina es proporcional al crecimiento celular, es decir entre mayor crecimiento mayor producción del metabolito (Grajales, 1999).

En investigaciones anteriores se estudiaron las características más sobresalientes del metabolito con el fin de hacer una purificación parcial, tomando en cuenta sus propiedades fisicoquímicas, así como su naturaleza química. Estudios preliminares de laboratorio (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) demostraron que el extracto crudo denominado L5 fue sensible a proteasas (α -quimiotripsina y tripsina), corroborando su naturaleza proteica.

Respecto a sus características fisicoquímicas se observó que la bacteriocina es estable a pH entre 2 y 6 a temperaturas entre 10 y 40°C y a temperaturas de refrigeración, ya que conserva el 96.72% de su actividad después de 14 días, mientras que a temperaturas de congelación conserva el 100% de su actividad después de 72 días (Grajales, 1999).

La purificación de la bacteriocina se realizó de la siguiente forma: a partir de un cultivo de 8 horas obtenido del fermentador, se separaron las células por centrifugación y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente el sobrenadante se precipitó por medio de la adición de sulfato de amonio al 60% durante 48 h a 4°C y se centrifugó para obtener la bacteriocina, se dializó para eliminar las sales de amonio y se esterilizó por filtración.

Durante este proceso se llevó a cabo la técnica de pozos de agar, para observar la presencia o ausencia de actividad bactericida, en la tabla 9 se observa lo obtenido:

PRUEBAS DE ACTIVIDAD DURANTE LA PURIFICACIÓN

Bacteriocina L5	Cepa sensible (L1)	UA/ml
Sobrenadante del cultivo	+	320
Sobrenadante del pp*	-	-
Dializado y Filtrado pp*	+	1280

TABLA 7. Detección de la actividad durante el proceso de purificación, para fines comparativos se presentan la actividad bactericida en unidades arbitrarias por mililitro (pp* es el precipitado).

- **Quantificación de la bacteriocina L5**

Para cuantificar la bacteriocina se determinaron las unidades arbitrarias definidas como: el recíproco de la dilución mas alta, donde se detectó inhibición de la cepa sensible (L1), expresada como Unidades Arbitrarias (UA) por mililitro (Huot *et al*, 1996a).

En el extracto crudo se observó actividad hasta la dilución 1/8 en 25 µl del extracto en cada pozo.

Las Unidades Arbitrarias por mililitro son:

$$UA = (1/25 \mu l * 8/1) * 1000 = 320 \quad \mathbf{320 UA/ml}$$

Mientras que en la bacteriocina parcialmente purificada se encontró actividad hasta la dilución 1/32 en 25 µl de bacteriocina adicionada en cada pozo, se obtuvo que:

Las Unidades Arbitrarias por mililitro son:

$$UA = (1/25 \mu l * 32/1) * 1000 = 1280 \quad \mathbf{1280 UA/ml}$$

De acuerdo a los resultados obtenidos se logró concentrar la bacteriocinas 4 veces con respecto al extracto crudo.

- Espectro de actividad

Se realizaron pruebas de presencia o ausencia de actividad de la bacteriocina L5 y la nisina con el fin de comparar el espectro de actividad de cada una. En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos:

COMPARACIÓN DEL ESPECTRO DE ACTIVIDAD L5 Y NISINA

Cepas	L1	L5	Lp	LM3	MM2	Bt	Ps	Ec
Bacteriocina								
L5	+	-	-	-	-	-	-	-
Nisina	+	+	+	+	+	+	-	+

TABLA 8. Comparación del espectro de actividad de dos bacteriocinas. Los signos positivos representan la inhibición de la cepa por la bacteriocina correspondiente y los signos negativos representan que no hubo inhibición por el metabolito. **Gram positivos** L1 (*Lactococcus lactis* B-37), L5 (*Lactococcus lactis* L5), Lp (*Lactobacillus pentosus*), LM3 (*Lactobacillus plantarum* y *Micrococcus kristinae-variens*), MM2 (cepa en proceso de identificación) y Bt (*Brochothrix thermosphacta*). **Gram negativos** Ps (*Pseudomona fragi*), Ec (*Escherichia coli*).

La nisina tiene la capacidad de inhibir a todas las bacterias Gram positivas, que corresponden a las cepas de bacterias lácticas (**L1**, **L5**, **Lp**, **LM3** y **MM2**) y *Brochothrix thermosphacta* (cepa indicadora de descomposición), mientras que en *Pseudomona fragi* y *Escherichia coli* (Bacterias Gram negativas) no se observó inhibición. Por otra parte **L5** sólo inhibió a *Lactococcus lactis* **L1**.

14.0 Efecto de la fermentación láctica en músculo fresco de cazón

Las bacterias lácticas están presentes en forma natural en la carne y el pescado, tienen la capacidad de dominar la microflora y antagonizar con microorganismos de descomposición, debido a que las bacterias lácticas son tolerantes a valores de pH bajos, producen ácidos orgánicos (ácido láctico principalmente), peróxido de hidrogeno, bacteriocinas y compiten por el sustrato (Alexsson.1993).

La fermentación láctica incrementa considerablemente la vida útil de la carne, modifica el material proteico en condiciones poco severas y no produce cambios significativos en las características sensoriales (Farber *et al*, 1990; Ponce *et al*, 1997 y Stiles, 1996).

El objetivo de este estudio fue emplear la fermentación láctica en músculo fresco de cazón (*Rhizopriondon longurio*) empacado al vacío como método alternativo para aumentar el tiempo de conservación por efecto de dos cepas de bacterias lácticas sobreproductoras de ácido láctico y/o bacteriocinas. Esto se evaluó detectando los cambios de pH, la formación de acidez total titulable expresada como porcentaje de ácido láctico y la producción de bacteriocinas, estos parámetros están relacionados con el efecto antagónico de las bacterias lácticas contra microorganismos de descomposición como *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* y enterobacterias. El efecto de estos microorganismos se pudo medir por la inhibición en la población contaminante durante la fermentación del músculo de cazón, así como por la producción de compuestos indicadores de putrefacción como la cadaverina y la putrescina.

De acuerdo al análisis estadístico según Kruskal-Wallis se encontró, que la fuente de variación tiene efecto significativo sobre las variables de respuesta, como se describe a continuación en la tabla siguiente:

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA SEGÚN KRUSKAL-WALLIS

Variabes de respuesta	Media Poblacional	Grados de libertad	Valor de Significancia
pH	5.24	7	0.0000**
ATT	0.147 % ac. Láctico	7	0.0000**
<i>B. thermosphacta</i>	78.283 10 ⁶ UFC/g	7	0.0117*
<i>Pseudomonas</i>	2.911 10 ⁶ UFC/g	7	0.0002**
Enterobacterias	0.309 10 ⁶ UFC/g	7	0.0208*

TABLA 9. Análisis estadístico para los parámetros evaluados, referidos como variables de respuesta. (* ≤ 0.05) diferencia significativa y (** ≤ 0.005) diferencia altamente significativa.

De acuerdo al análisis de estadístico, los rangos de las variables de respuesta, tienen diferencia significativa entre las muestras sin inocular (testigo) y las inoculadas con las 4 cepas seleccionadas (**Lp**, **LM3**, **MM2** y **L5**), no obstante se observó un efecto altamente significativo sobre el pH, acidez total titulable (ATT) y en la inhibición en la población de *Pseudomonas*, cuando se asociaron al inóculo como fuente de variación.

14.1 Análisis fisicoquímicos

- Acidez total titulable y pH

En la Figura 6 y 7 se muestra el pH y la formación de acidez en muestras de cazón adicionadas con dextrosa al 5% (p/p) e inoculadas con las diferentes cepas seleccionadas, en donde se observa una disminución del pH de un valor inicial de 5.5 hasta valores cercanos a 4.0 que coinciden con el aumento en la acidez total.

Para las muestras inoculadas con 2 cepas; **L5** con **Lp**, **LM3** y **MM2** (**L5+Lp**, **L5+LM3** y **L5+MM2**) alcanzaron los valores menores de pH entre 4.5 hasta 4.0 y manteniéndose al final de la fermentación. Respecto a la acidez total se obtuvieron los valores mayores que oscilan entre 2.8 y 3.1%.

Cuando se inoculó solo una cepa, **L5** mostró el menor valor de pH (4.5) y el 2.3% de acidez al octavo día, manteniéndose al final de la fermentación, siendo los más bajos con respecto a las otras cepas. **MM2** alcanzó un valor de pH 4.6 y 1.69% al octavo día, aumentando el pH a 5.4 y disminuyendo los valores de acidez 1.4% al final de la fermentación. **LM3** alcanzó su valor más bajo de pH al sexto día de la fermentación a pH de 4.7 y 1.28% de acidez, aumentando en los subsiguientes días, teniendo un valor final de pH 5.12 y 1.87% respectivamente. **Lp** no fue capaz de disminuir el pH durante la fermentación, alcanzando un valor mayor de 7.7 al cuarto día, teniendo un valor de pH final de 6.0 que esta relacionado con los valores de acidez presentados de 0.52% y 1.2%. Para el testigo con dextrosa al 5% (sin inocular) el pH alcanzó valores cercanos a 7.0 y 0.66% de acidez al cuarto día de almacenamiento, después el pH disminuyó una unidad manteniéndose el octavo día y aumentando finalmente a pH 6.3 y 1.2 % de acidez.

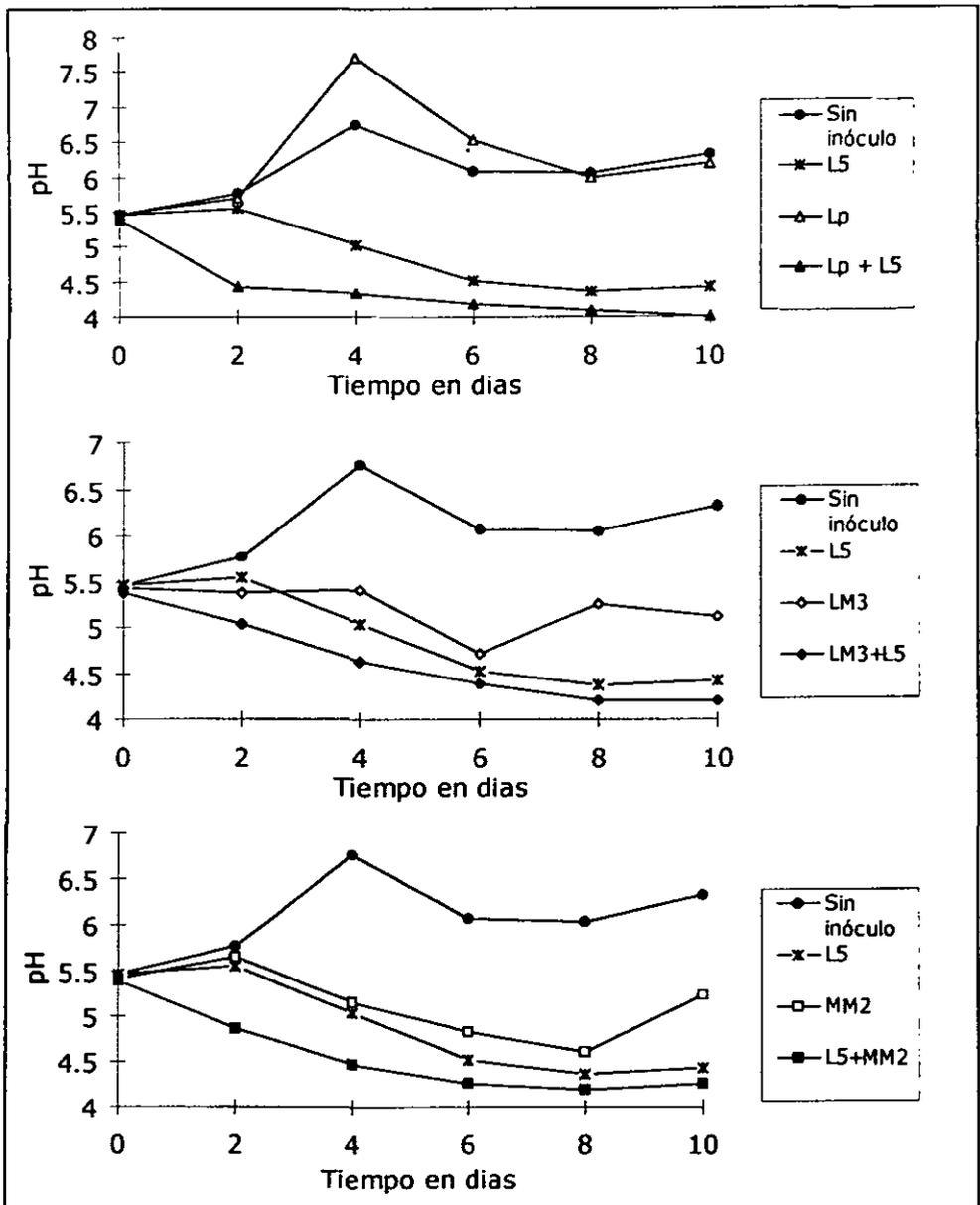


FIGURA 6 Cambios de pH durante la fermentación láctica de músculo fresco de cazón. Las muestras de cazón fueron inoculadas con diferentes cepas de bacterias lácticas **L5**, **Lp**, **LM3** y **MM2** y almacenadas durante 10 días a 19°C.

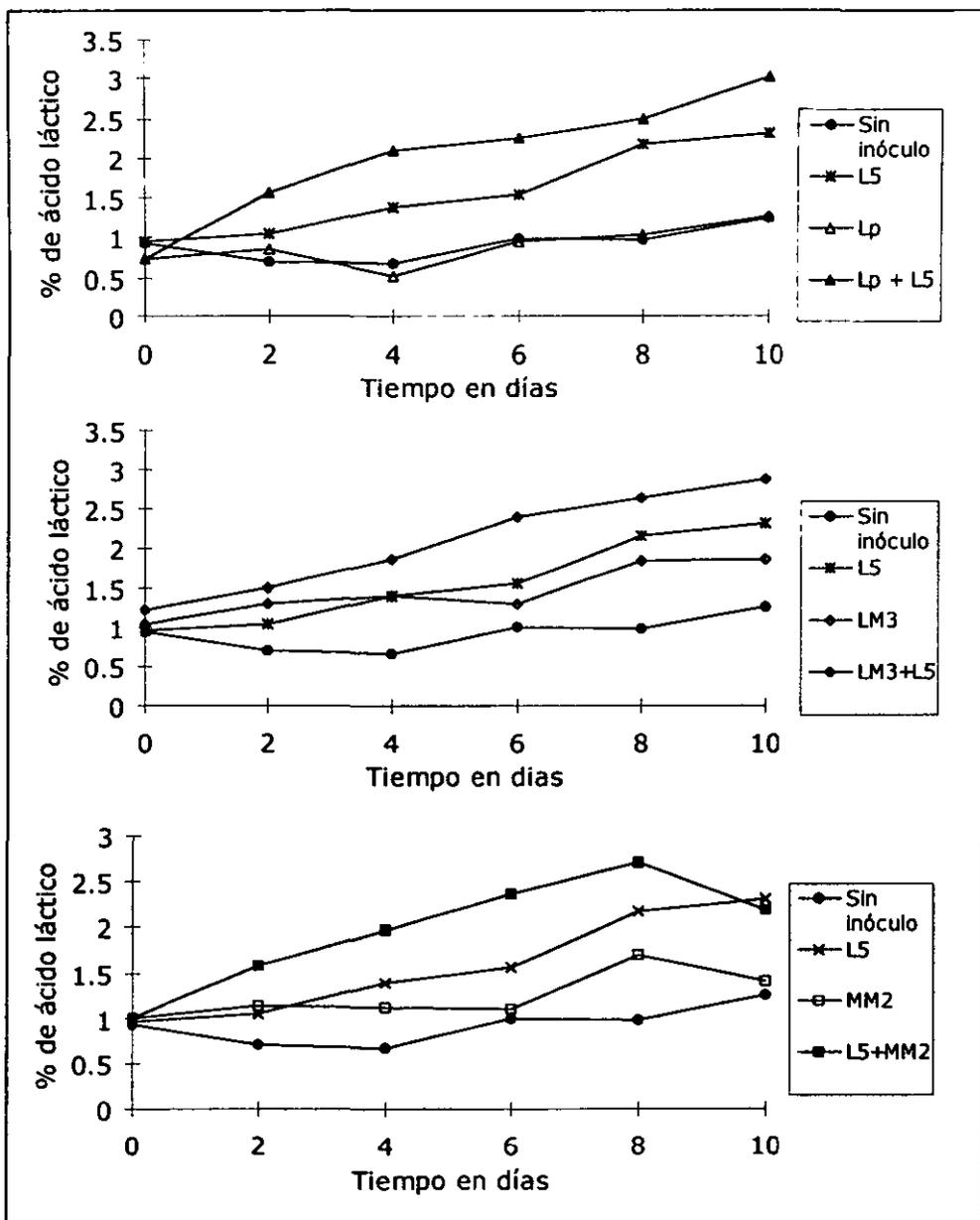


FIGURA 7 Cambios en la Acidez Total Titulable (ATT) expresada como porcentaje de ácido láctico, durante la fermentación láctica de músculo fresco de cazón. Las muestras de cazón fueron inoculadas con diferentes cepas de bacterias lácticas L5, Lp, LM3 y MM2 y almacenadas durante 10 días a 19°C.

En el análisis estadístico, respecto a la comparación de los tratamientos según Kruskal-Wallis, se muestran las diferencias entre ellos para el pH. En la siguiente tabla se muestra la agrupación de los rangos para esta variable.

AGRUPACIÓN DE MEDIAS SEGÚN KRUSKAL-WALLIS

Grupo	Inóculo	Rangos
A	Sin inóculo	101.50
A	Lp	100.67
B	L5+Lp	60.33
B	MM2	58.50
B	L5	49.92
B C	LM3	32.50
C	L5+MM2	30.83
C	L5+LM3	20.17

Tabla 10. Agrupación de los rangos según K-W para pH. Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa.

En las pruebas estadísticas se mostró que la utilización de dos cepas (**L5+LM3**, **L5+MM2** y **L5+Lp**), tiene diferencia significativa, comparada con el empleo de una cepa (**LM3**, **MM2**, **Lp** y **L5**). De acuerdo a los valores obtenidos se encontró que las muestras inoculadas con la cepa **Lp** y el testigo (muestras sin inocular) no tienen diferencias entre los valores de las medias durante la fermentación.

AGRUPACIÓN DE MEDIAS SEGÚN KRUSKAL-WALLIS

Grupo	Inóculo	Rangos
A	L5+LM3	90.88
A	L5+MM2	85.17
B	LM3	78.71
B	L5	68.71
B C	MM2	65.92
C D	L5+Lp	48.33
C D	Lp	35.42
D	Sin inóculo	31.58

Tabla 11. Agrupación de los rangos según K-W para pH. Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa.

En la agrupación de los rangos para el efecto de la acidez total titulable durante la fermentación, se obtuvo que las muestras inoculadas con **L5+LM3** y **L5+MM2** (grupo A) son los que presentan los valores mas altos (entre 90.88 y 85.17), encontrándose una diferencia entre las muestras inoculadas con una cepa: **L5, LM3 y MM2** (grupo B) con valores entre 78.71 y 65.92. Sin embargo se obtuvo que las muestras inoculadas con **Lp** y sin inóculo (grupo D) no difieren significativamente entre ellas teniendo los valores más bajos (entre 48.33 y 31.58).

- Concentración de diaminas biogénicas

Se llevó a cabo la extracción de diaminas biogénicas por el método de Hwang *et al* (1995), la concentración inicial y final se midió por la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). En la siguiente tabla se presentan las concentraciones de diaminas biogénicas, al inicio y al final de la fermentación.

CONCENTRACIÓN DE PUTRESCINA

Tratamiento	Concentración Inicial mg/g	Concentración final Mg/g
Sin inóculo	0.0099	0.089
L5	0.0099	0.016
LM3	0.0099	0.011
L5+Lp	0.0099	0.011
MM2	0.0099	0.011
L5+LM3	0.0099	0.073
L5+MM2	0.0099	0.016

Tabla 12. Concentración de putrescina al inicio y final de la fermentación en músculo fresco de cazón.

CONCENTRACIÓN DE CADAVERINA

Tratamiento	Concentración Inicial mg/g	Concentración Final mg/g
Sin inóculo	0.0218	0.041
L5	0.0218	0.028
LM3	0.0218	0.028
L5+Lp	0.0218	0.022
MM2	0.0218	0.023
L5+LM3	0.0218	0.022
L5+MM2	0.0218	0.022

Tabla 13. Concentración de cadaverina al inicio y final de la fermentación en músculo fresco de cazón.

En las tablas anteriores (12 y 13) se puede observar que la muestra sin inocular (control) tiene los valores mayores en la concentración de cadaverina (0.089mg/g) y putrescina (0.04mg/g) al final de la fermentación, mientras que las muestras inoculadas tienen menor concentración promedio de putrescina (0.0119mg/g) y de cadaverina (0.0241mg/g).

14.2 Análisis Microbiológico

- *Brochothrix thermosphacta*

En la siguiente tabla se muestra la agrupación de rangos por la técnica de Kruskal-Wallis para la población de *B. thermosphacta* en los diferentes tratamientos inoculados con las cepas de bacterias lácticas.

AGRUPACIÓN DE MEDIAS SEGÚN KRUSKAL-WALLIS

Grupo	Inóculo	Rangos
A	Sin inóculo	78.58
B	MM2	74.54
B	LM3	64.29
B	L5	57.94
B	L5+Lp	55.67
B	Lp	52.33
C	L5+MM2	49.88
C	L5+LM3	35.25

Tabla 14. Agrupación de los rangos según K-W para *B. thermosphacta*. Medias con la misma letra no presentan diferencia significativa.

La fermentación láctica en músculo fresco de cazón tuvo efecto estadísticamente significativo, sobre la inhibición en la población de *B. thermosphacta*. De acuerdo a la agrupación de rangos, se obtuvo que las muestras inoculadas con: **L5+LM3** y **L5+MM2** (grupo C) con rangos entre 48.88 y 35.25, tuvieron diferencia significativa con respecto a las muestras inoculadas con **L5**, **Lp**, **LM3**, **MM2** y **L5+Lp** (grupo B) teniendo los valores mas altos entre 52.3 y 74.54.

En la figura 8 se observa el comportamiento de la población de *B. thermosphacta*, sometida a los diferentes inóculos. Las muestras inoculadas inhibieron mas eficientemente a la población obteniendo valores muy similares en las muestras inoculadas.

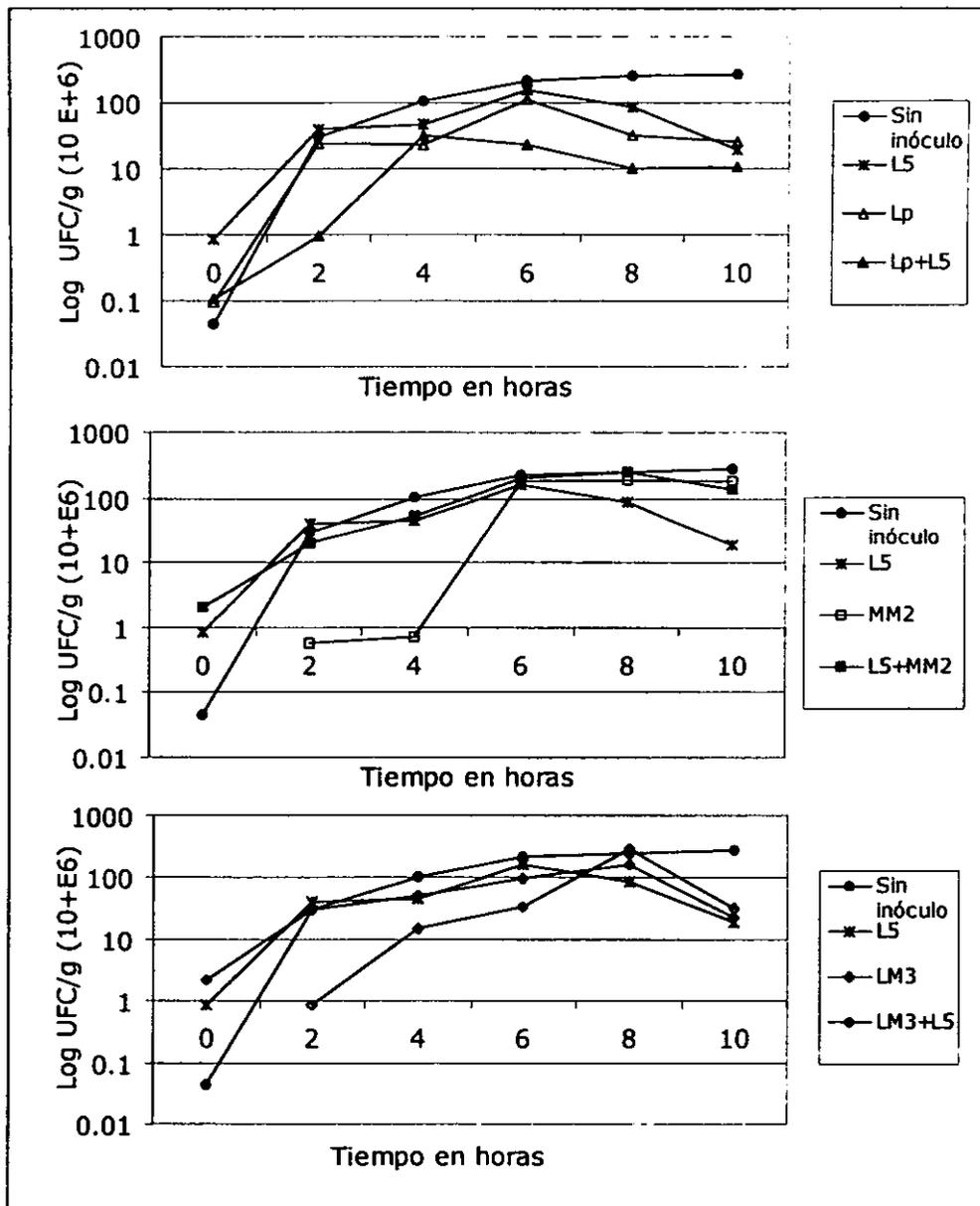


FIGURA 8. Población de *Brochothrix thermosphacta* durante la fermentación láctica de músculo fresco de cazón. Las muestras de cazón fueron inculadas con diferentes cepas de bacterias lácticas L5, Lp, LM3, almacenadas durante 10 días a 19°.

- Enterobacterias

En la siguiente tabla se muestran la agrupación de rangos para la población de enterobacterias en los diferentes tratamientos.

AGRUPACIÓN DE RANGOS SEGÚN KRUSKAL-WALLIS

Grupo	Inóculo	Rangos
A	Sin inóculo	73.83
A	LP	73.52
A	MM2	63.08
A	L5+Lp	61.54
A	L5+MM2	59.92
A	LM3	57.00
A	L5	54.46
B	L5+LM3	28.42

Tabla 15. Agrupación de los rangos según Kruskal-Wallis para pH. Rangos con la misma letra no presentan diferencia significativa.

En el análisis de estadístico se obtuvo que hay diferencia significativa en la muestra inoculada con **L5+LM3** (28.42) y los otros tratamientos con valores de los rangos entre 73.83 y 54.46.

En la figura 9 se observa que en las muestras inoculadas con una cepa (**L5**, **Lp**, **LM3** y **MM2**) o dos cepas (**L5+Lp**, **L5+LM3**, y **L5+MM2**) son capaces de inhibir eficientemente la población de enterobacterias, mostrándose menor crecimiento de la población de enterobacterias con respecto al testigo.

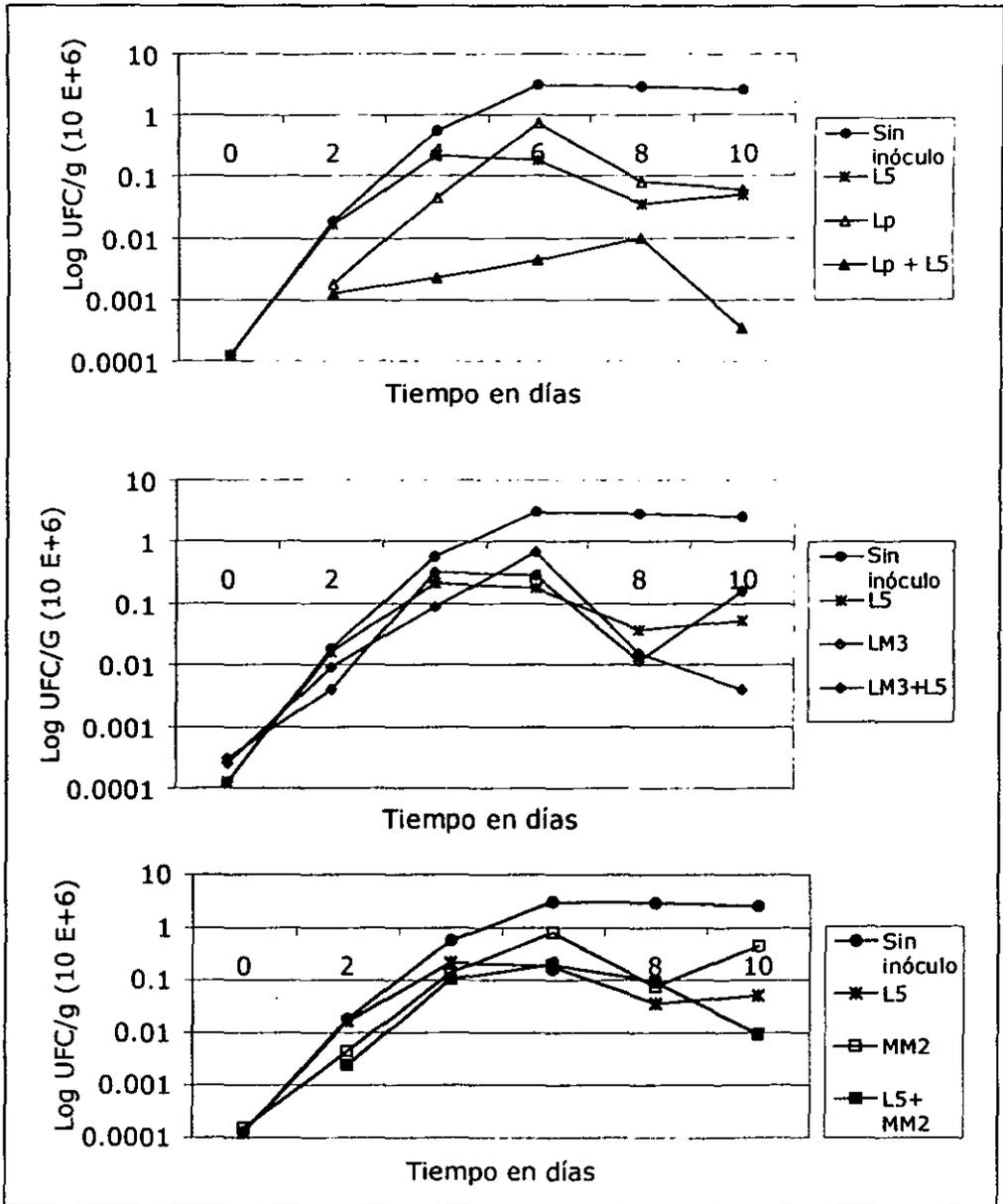


FIGURA 9. Población de enterobacterias durante la fermentación láctica de músculo fresco de cazón. Las muestras de cazón fueron inoculadas con diferentes cepas de bacterias lácticas L5, Lp, LM3 y MM2, almacenadas durante 10 días a 19°C.

- *Pseudomonas*

En la siguiente tabla se observa la agrupación de medias por la técnica de Kruskal-Wallis para la población de *Pseudomonas* en las diferentes muestras de cazón inoculadas con las cepas de bacterias lácticas.

AGRUPACIÓN DE RANGOS SEGÚN KRUSKALL-WALLIS

Grupo	Inóculo	Rangos
A	Sin inóculo	82.60
A	Lp	75.67
A	L5+Lp	73.33
B	MM2	60.92
B	L5	50.90
B	LM3	45.33
B	L5+MM2	45.32
B	L5+LM3	31.21

Tabla 16. Agrupación de los rangos según Kruskal-Wallis, para la población de *Pseudomonas*. Rangos con la misma letra no presentan diferencia significativa.

En el análisis estadístico se obtuvo que hay diferencia significativa entre las muestras inoculadas con **L5**, **LM3**, **MM2**, **L5+LM3** y **L5+MM2** (rangos entre 60.92 y 31.21) y las adicionales con **Lp** y el testigo (rangos entre 82.6 y 73.33).

En la figura 10 se ilustra el crecimiento de la población en el tiempo de las muestras sometidas a los tratamientos con **L5**, **LM3**, **MM2**, **L5+LM3** y **L5+MM2**, se observa claramente mayor crecimiento en la población de *Pseudomonas* con las muestras inoculadas con **Lp** y el control, concordando con los resultados obtenidos estadísticamente.

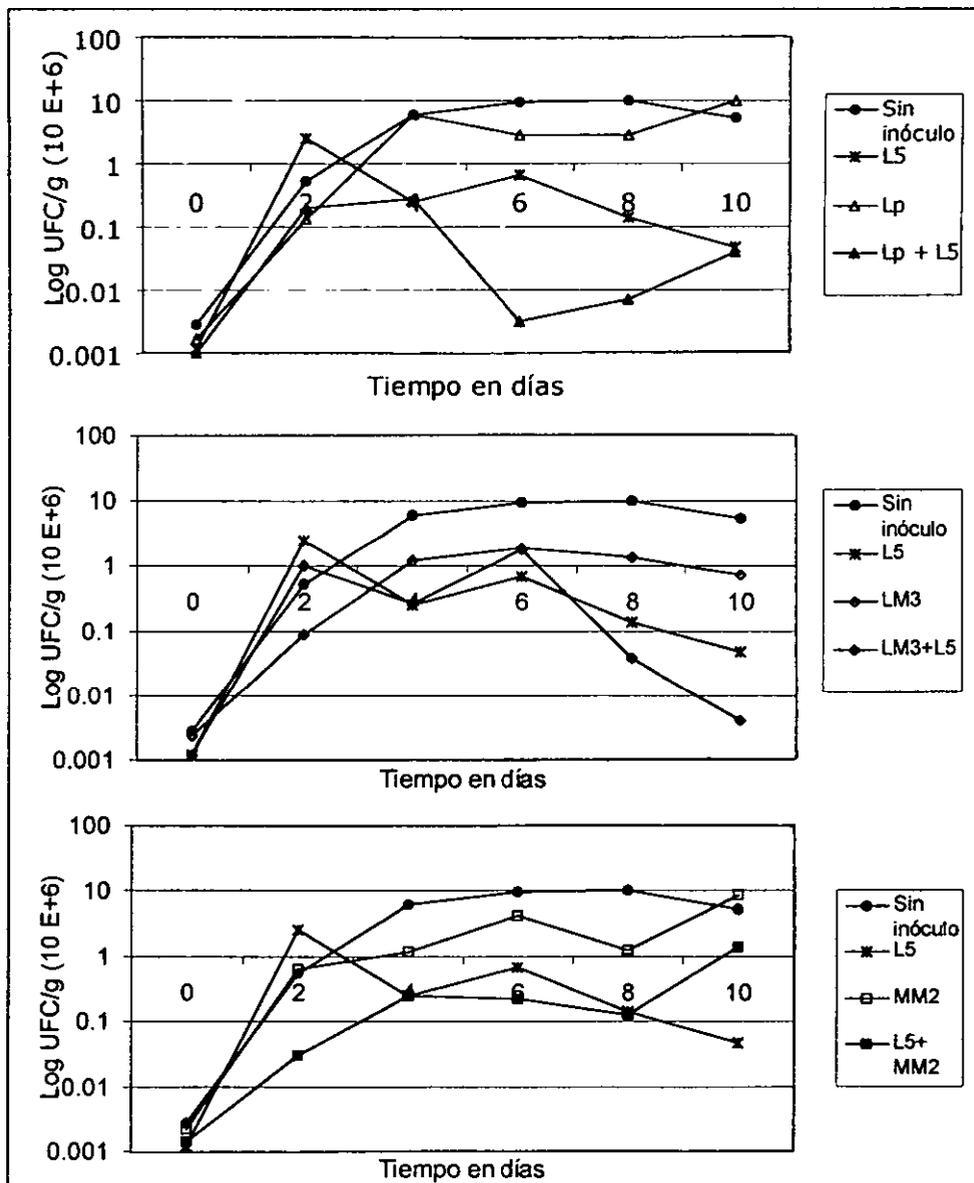


FIGURA 10. Población de *Pseudomonas* durante la fermentación láctica de músculo fresco de cazón. Las muestras de cazón fueron inoculadas con diferentes cepas de bacterias lácticas L5, Lp, LM3 y MM2, almacenadas durante 10 días a 19°C.

VII. DISCUSIÓN

La biopreservación se refiere a la extensión de vida útil de los alimentos usando microorganismos y/o sus productos antimicrobiales (Hugas, 1998).

En carnes, las bacterias lácticas constituyen parte de la flora natural, la cual puede desarrollarse fácilmente (Shirai *et al*, 1995 y Hugas, 1998). El desarrollo de bacterias lácticas en este sustrato puede causar efecto antagónico sobre bacterias patógenas y contaminantes, a través de varios mecanismos como: competencia por el sustrato y la producción de compuestos antimicrobiales entre ellos: ácidos láctico, acético y propiónico, diacetilo, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Hoover y Steenson, 1993).

En este estudio se llevó a cabo una selección de bacterias lácticas de las cuales, 4 cepas presentaron capacidad antagonista elevada; disminución del pH por la producción de ácidos orgánicos (ácido láctico principalmente) y la producción de bacteriocinas. Esto, con el fin de utilizar las cepas seleccionadas como microorganismos iniciadores de la fermentación láctica controlada en músculo de cazón. Pensando en un método alternativo de conservación que aumente el tiempo de anaquel y que se refleja en la disminución de microorganismos de descomposición como: *Brochothrix thermosphacta*, enterobacterias y *Pseudomonas*.

Dentro de las características que presentaron las cepas seleccionadas fueron: la capacidad de crecer rápidamente, alcanzando su máximo crecimiento entre las 8 y las 24 horas de incubación; y la disminución rápida de pH alcanzando valores finales entre pH 4.7 y 3.75, con una producción de ácido láctico entre 22 y 45 mg/mL.

Los criterios adicionales que se tomaron en cuenta para la elección de las cepas comerciales (**Lp** y **LM3**) fueron: que estas cepas son empleadas comúnmente como cultivos iniciadores en diferentes tipos de sustratos (Hammes y Hertel, 1998) y son capaces de crecer en sustratos cárnicos empacados al vacío, disminuyendo eficazmente la población de cepas de descomposición (Ponce *et al*, 1997).

Por otra parte **L5**, tuvo la capacidad de producir bacteriocinas, esta actividad antimicrobiana ofrece posibilidades interesantes para prologar la vida de anaquel de la carne fresca (Hugas, 1998), para ello era necesario tomar en consideración las condiciones que favorecen la producción de la bacteriocina, así como las características fisicoquímicas del metabolito.

Lactococcus lactis **L5** tuvo la capacidad de producir bacteriocinas cuando se inoculó en medio líquido Elliker, MRS y CGB, con atmósfera reducida de oxígeno y rica en CO₂ a una temperatura de 29-30 °C. **L5** empieza a producir la bacteriocina en una fase temprana a la 4 h de incubación manteniéndose hasta las 18 h (Grajales, 1999). Esta característica es muy importante para determinar si es efectiva contra microorganismos de descomposición. McMullen y Stiles (1996) encontraron que en *Leuconostoc gelidum* **UAL187**, el desarrollo rápido y la producción temprana de su bacteriocina son necesarios para que tenga efectos como conservador en carne fresca.

Respecto a las características fisicoquímicas se observó que la bacteriocina es estable a pH entre 2-6.2, a temperaturas entre 10-40°C y a temperaturas de refrigeración ya que conserva el 96.72% de su actividad después de 14 días (Grajales, 1999).

Estos parámetros fueron importantes de considerar ya que, conociendo sus características fisicoquímicas se puede saber en que tipo de alimentos puede aplicarse, en este caso se utilizó en músculo fresco de cazón con valores de pH entre 5.5 y 6 al inicio de la fermentación, almacenándolo a una temperatura de 19 °C durante 10 días.

Uno de los objetivos de esta investigación fue la selección de una cepa productora de bacteriocinas, que junto a cepas iniciadoras sobreproductoras de ácido láctico llevaran a cabo una fermentación láctica, este método modifica el material proteico en condiciones poco severas y no produce cambios en las características sensoriales (Stiles, 1996 y Ponce *et al*, 1997), siendo eficiente para enfrentar los problemas de extensión de la vida útil de productos cárnicos.

En las pruebas realizadas en el músculo de cazón, todas las muestras fueron almacenadas bajo las siguientes condiciones: se empacaron al vacío, el cual consistió en la eliminación del aire y realizando un sellado hermético de las muestras, el oxígeno residual fue consumido rápidamente debido al crecimiento microbiano aerobio (estricto y facultativo como: *Brochothrix thermosphacta*, enterobacterias y *Pseudomonas*) y también a la respiración muscular. Teniendo una atmósfera enriquecida con CO₂ alcanzándose al cabo de unos dos días niveles de CO₂ del orden del 20-30% (García *et al*, 1995)

Este compuesto puede inhibir el crecimiento bacteriano, ya que puede producir un incremento en la fase de latencia y tiempo de generación de los microorganismos que alteran la carne, al mismo tiempo se estimuló el crecimiento de la flora láctica de las cepas inoculadas **LS**, **Lp**, **LM3** y **MM2** y las bacterias lácticas nativas de la carne, en general son consideradas:

Carnobacterium piscicola y *C. divergens*; *Lactobacillus sakei*, *Lb. curvatus* y *Lb. plantarum*; *Leuconostoc mesenteroides* y *Lc. gelidum*, ya que no necesitan oxígeno para crecer (Hugas, 1998).

En las muestras inoculadas con **L5**, **LM3** y **MM2** se obtuvieron valores de pH bajos y porcentajes de acidez total titulable altos, estos resultados se relacionan con gran producción de ácidos orgánicos. Así, las bacterias lácticas adicionadas pudieron dominar sobre el resto de la microflora, ya que son tolerantes a valores de pH bajos y ácidos orgánicos, utilizando a la dextrosa adicionada como sustrato, evitando el desarrollo del resto de los microorganismos (menor carga microbiana) nativos del pescado (Alexsson, 1993; Garcia *et al*, 1995). Se encontró que la población de los microorganismos indicadores de descomposición valorados disminuye (*Brochothrix thermosphacta*, enterobacterias y *Pseudomonas*).

El conteo en placa de la población de *Brochothrix thermosphacta* es menor en las muestras inoculadas, debido a que los valores de pH de la carne tratada con las bacterias iniciadoras fue inferior al rango de pH mínimo en condiciones anaerobias (pH 5.8). La disminución de la población puede deberse a las bacterias adicionadas a las muestras de cazón y a las bacterias lácticas de la carne, así como a la presión de competencia por el uso de la dextrosa por parte de las bacterias lácticas inoculadas en mayor número (Bucio, 1998).

En las muestras inoculadas la población de Enterobacterias es menor por la disminución del pH, la presencia de estos microorganismos depende de valores de pH altos aunque en condiciones de empaquetado al vacío se ha encontrado que la población se ve disminuida (Dainty *et al*, 1986).

Respecto a la población de *Pseudomonas* fue menor en los tratamientos inoculados con **L5, LM3 y MM2**, respecto al control y las inoculadas con **Lp**. En general el modo de acción antagónico de las bacterias lácticas contra bacterias Gram negativas en ambiente anaerobio es mediante la producción de ácidos orgánicos, que disminuyen el pH a niveles inhibitorios para las bacterias Gram negativas, concordando con lo observado donde, las muestras con valores de pH bajos, la población de *Pseudomonas* se vio disminuida.

En otras investigaciones han encontrado que el empaque al vacío es un factor determinante para el crecimiento lento de *Pseudomonas* (Newton y Ring, 1979 y Bucio, 1998).

Durante la fermentación no se detectó actividad de bacteriocinas en las muestras inoculadas con **L5**. Esto puede deberse a: i) que el sistema empleado para la detección de bacteriocinas no haya sido el adecuado, ii) se produjeran concentraciones tan pequeñas que no pudieron detectarse con el método tradicional, iii) la bacteriocina producida haya sido inactivada por la interacción con componentes de la carne y iv) por que no se produjera la bacteriocina durante la fermentación en músculo.

La producción de ciertas bacteriocinas en el laboratorio no implica que sea eficiente en alimentos, la mayoría de los productos cárnicos son sistemas complejos con un gran número de factores que influyen sobre el crecimiento de las cepas iniciadoras, y sobre la producción del metabolito (Hugas, 1998).

Respecto a la producción de diaminas biogénicas, se ha encontrado que la acumulación de aminas biogénicas en alimentos se debe usualmente a la descarboxilación de los aminoácidos, proceso llevado a cabo por enzimas de origen microbiano principalmente (Hernandez-Jover *et al*, 1997).

El consumo de alimentos con concentraciones pequeñas de estos compuestos no causan problemas en el organismo. Sin embargo, el consumo de grandes cantidades de algunas aminas biogénicas pueden tener efectos toxicológicos. Las diaminas como la putrescina y la cadaverina pueden reaccionar con nitritos formando nitrosaminas cancerígenas (Hernandez-Jover *et al*, 1997).

En investigaciones anteriores se ha encontrado que el aumento en la concentración de putrescina y cadaverina, esta relacionada con el crecimiento de microorganismos de descomposición, estos compuestos se han utilizado como indicadores de contaminación en carnes (Edwards *et al*, 1985).

En general se detectaron concentraciones más altas de cadaverina que putrescina, la producción de estos compuestos se atribuye a las bacterias Gram negativas, ya que son capaces de generar diaminas durante el almacenamiento de carne empacada al vacío, se ha encontrado que hay una correlación entre el crecimiento de bacterias Gram negativas y la formación de diaminas (Edwards *et al*, 1985).

VIII. CONCLUSIONES

- Las 4 cepas de bacterias lácticas seleccionadas **L5, Lp, LM3** y **MM2**, cuando se inocularon solas o en mezclas, tuvieron la capacidad de disminuir eficientemente el pH, producir grandes cantidades de ácido láctico a partir de dextrosa e inhibir a microorganismos responsables de la descomposición.
- La fermentación láctica es un método alternativo para aumentar el tiempo de anaquel de músculo fresco de cazón, ya que puede retrasar o inhibir el crecimiento microbiano responsable de la descomposición.
- Las concentraciones de compuestos indicadores de la descomposición se vieron disminuidas en las muestras inoculadas, con respecto al testigo, lo que representa una mayor vida útil del músculo de cazón.
- Los logros alcanzados en este estudio de las bacteriocinas (caracterización química) aumentan las posibilidades de optimizar las condiciones, para la utilización de las bacterias lácticas productoras de bacteriocinas para su uso como bioconservadores en cárnicos.
- El uso de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas puede ofrecer un método indirecto para incorporar bacteriocinas en alimentos, esto depende de la habilidad del cultivo para desarrollarse y producir bacteriocinas en un sistema complejo.



IX. BIBLIOGRAFÍA

Alexsson L. 1993. Lactic acid bacteria: Clasification and Physiology. En: Lactic Acid Bacteria. Salminen S. Ed Von Wright A Marcel DeKker, Inc New York. p 1-55

Barrena-Gonzalez, C. 1996a. Etude de deux bacteriocines produites par *Lactococcus lactis subsp cremoris* et *lactococcus lactis subsp lactis*. Tesis de Doctorado. Faculté des Siencies Universite de Nancy, Francia. 161 pp

Barrena-Gonzalez, C., E. Huot y H. Petitdemange. 1996b. Mode of action of a bacteriocin (J46) produced by *Lactococcus lactis subsp cremoris* J46. *Journal of Food Protection*. 59 (9), 955-962.

Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology. 1989. Vol. 2 Ed Sneath P., Murray R., Williams & Wilkins. Los Angeles, EUA.

Bhunja A. K., M. C. Johnson y B. Ray. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Applied Bacteriology*. 65, 261-268.

Brownlie, 1966. En Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology. 1989. Vol. 2 Sneath P., Murray R., Williams & Wilkins. Los Angeles, EUA.

Bucio, G. A. 1998. Uso de bacterias ácido lácticas para la conservación de carne fresca. Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana. 109 pp

Church, P. N. y J. M. Wood. 1991. Manual of manufacturing meat quality. Elsevier Applied Science. Londres. 345 pp

Dainty R. H. y C. M. Hibbard. 1980. Aerobic metabolism of *Brochotrix thermosphacta* growing on meat surfaces and in laboratory media. *Journal of Applied Bacteriology*. 48, 387-396.

Dainty R. H., R. A. Edwards, C. M. Hibbard y S. V. Ramantanis. 1986. Bacterial sources of putrescine and cadaverine in chill stored vacuum-packaged beef. *Journal of Applied Bacteriology*. 61, 117-123.

Daniel W. Wayne, 1990. Applied non parametric statistics. Ed. John Wiley & Sons, INC, USA. pp 526.

Daniel W. Wayne, 1997. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa, México. pp 878.

Davis, 1951. En: Merck Igoda. 1990. Indicaciones, control de calidad y conservación de medios de cultivo granulados. Cultivos especializados. División de diagnosticos. México.

De Vuyst, L. y E. J. Vandamme 1994. Antimicrobial potential of LAB. En: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Ed De Vuyst L. y E. J. Vandamme. Blackie Academic and professional, Nueva York, EUA. pp 92-129.

Edwards R. A., R. H. Dainty y C. M. Hibbard. 1985. Putrescine and cadaverine formation in vacuum packed beef. *Journal of Applied Bacteriology*. 58, 13-19.

Elliker, P. R., A. Anderson y G. Hannessen. 1956. An agar culture medium for lactic streptococci and lactobacilli. *Journal Dairy Science*. 39, 1611-1612.

Farber, J. M., D. W. Warburton, L. Gour, y M. Milling. 1990. Microbiological quality of foods packaged under modified atmospheres. *Food Microbiology*. 7, 327-334.

García T. R. Martín, B. Sanz y P. E. Hernández. 1995. Revisión: Extensión de la vida útil de la carne fresca. I: envasado en atmósferas modificadas y utilización de bacterias lácticas y bacteriocinas. *Revista española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 35 (1), 1-18.

Gill C. O. 1976. Substrate limitation of bacterial growth at meat surfaces. *Journal of Applied Bacteriology*. 41, 401-410.

Gill, C. O. y K. G. Newton. 1977. The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *Journal Applied Bacteriology*. 43, 189-195.

Gill, C. O. y K. G. Newton. 1980. Growth of bacteria on meat at room temperatures. *Journal Applied Bacteriology*. 49, 315-323.

Gill, C. O. 1982. Microbial interaction with meats. En *Meat Microbiology*. M. H. Brown. Ed Applied Science. Londres

Gill, C. O. 1986. The control of microbial spoilage in fresh meats. En: Pearson, A. M. Y T. R. Duston (Eds), *Advances in Meat Reserch*. Vol 2: Meat and Poultry Microbiology: Westport: The avi Publishing Inc.

Grajales E., 1999. Caracterización de la bacteriocina L5 producida por *Lactococcus lactis* L5. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. 80pp

Grau, F. H. 1979. Nutricional requirements of *Microbacterium thermosphactum*. *Applied Enviromental Microbiology*. 37, 362-364.

Greer, G. C. 1989. Red Meat, poultry and fish. En: *Enzymes of Psycrotrophs in raw foods*. McKelar, R. C. Ed CRC Press, Inc. Florida, EUA.

Guerrero I. y P. Lara. 1995. Efectos químicos y microbiológicos de la aplicación de atmósferas modificadas en la conservación de la carne fresca. *Ciencias*. 46, 350-369.

Hammes W. P. y C. Hertel. 1998. New developments in meat starter cultures. *Meat Science*. 49. Suppl. 1, S125-S138.

Hernandez-Jover T., M. Izquierdo-Pulido, M. T. Veciana-Nogués, A. Mariné_font y C. Vidal-Carou. 1997. Effect of starter on biogenic amine formation during fermented sausage production. *Journal of Food Protection*. 60 (7), 825-830.

Hoover D. G, 1992. Bacteriocins: Activities and Applications. Encyclopedia of Microbiology Vol 1. Academic Press Inc. USA. p 181-201.

Hoover D. y L. Steenson. 1993. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Food Science and Technology, Academic Press. Inc. Nueva York, EUA.

Hugas, M.1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*. 49. Suppl. 1, S139-S150.

Huot, E., J. Meghrous, C. Barrena-Gonzalez y H. Petitdemange. 1996a. Bacteriocin J46, a new bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* J46: Isolation and characterization of the protein and its gene. *Anaerobe*. 2 (3), 137-145.

Huot, E., C. Barrena-Gonzalez y H. Petitdemange. 1996b. Comparative Effectiveness of Nisin and bacteriocin J46 at different pH values. *Letters in Applied Microbiology*. 22 (1), 76-79.

Hwang D., S. Chang, C. Shiao y C. Cheng. 1995. Biogenic amines in the flesh of salisish. *Journal Food Science*. 60 (5) 926-928.

Ingolf F. Nes, Dzung Bao Diep, Leiv Sigve Havarstein, May Bente Bruberg, Vicent Eijsink y Helge Holo. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70, 113-128.

Jack, R. W., J. R. Tagg y B. Ray. 1995. Bacteriocin of gram-positive bacteria. *Microbiology Review*. 59, 171-200.

Jay M. J. 1982. Antimicrobial properties of Diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology*. 44 (3), 525-532.

Jay M. J. 1992. Modern Food Microbiology. 4ª Edición. Chapman & Hall. Nueva York.

Juven B. J., H. Weisslowicz y S. Harel. 1988. Detection of hydrogen peroxide produced by meat lactic starter cultures. *Journal of Applied Bacteriology*. 65, 357-360.

Klaenhamer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*. 12, 39-86.

Klander, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*. 49, 209-224.

Lloyd, A. G. y J. J. P. Drake, 1975. Problems posed by essential food preservatives. *Br. Med. Bull.* 31, 214-219.

MacMeeking, T. A. 1982. Microbial spoilage of meats. En: *Developments in Food Microbiology*. Vol. 1. Robinson, R. K. Elsevier Applied Science Publishers, Londres.

Mayr-Harting, A., A. J. Hedges y R. C. W. Berkeley. 1972. En Hoover D. y L. Steenson. 1993. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Food Science and Technology, Academic Press. Inc. Nueva York, EUA.

Mazzota, A. S., A. D. Crandall y T. J. Montville. 1997. Nisin resistance in *Clostridium botulinum* spores and vegetative cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (7), 2654-2659.

McMullen M. L y M. E. Stiles. 1996. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *Journal of Food Protection Supplement*. 64-71.

Merck Igoda. 1990. Indicaciones, control de calidad y conservación de medios de cultivo granulados. Cultivos especializados. División de diagnósticos, México.

Michels, P. A. M., J. P. J. Michels, J. Boonstra, W. N. Konings. 1979. Generation of an electrochemical proton gradient in bacteria by the excretion of metabolic end products. *FEMS Microbiology Letters*. 5, 357-364.

Nakazawa Yuki y Hosono Akiyoshi. 1990. Functions of Fermented Milk. Challenges for the health sciences. Elsevier Applied Science. EUA. 768 pp.

Newton, K. G. y W. J. Rigg. 1979. The effect of film permeability on the storage life and microbiology of vacuum-packed meat. *Journal Applied Bacteriology*. 47, 433-441.

Ponce E, V. M. Alanís, M. Contreras e I. Guerrero. 1997. Aislamiento de bacterias formadoras de ácido presentes en pescado. Memorias, VII Congreso Nacional de Biotecnología y II Simposio Internacional sobre Ingeniería de Bioprocesos. p 337.

Requena T. Y C. Peláez 1995. Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Revista española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 35 (1), 19-44.

Ronald M. Atlas. 1993. Handbook of Microbiological. Ed. Lawience C. Parks. Londres.

Scannel A. G. M., C. Hill, D. J. Buckley y E. K. Arendt. 1997. Determination of the influence of organic acids and nisin on shelf-life microbiological safety aspects of fresh pork sausage. *Journal of Applied Bacteriology*. 83, 407-412.

Schilliner, U. y F. K Lucke. 1989. Antibacterial activityof *Lactobacillus sake* isolated from meat, *Applied Enviromental Microbiology*. 55, 1901-1906.

Scott, V. N. y S. L. Taylor. 1981. Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *Journal of food Science*. 46, 117-120.

Shirai, M K., I. Guerrero y P. Lara. 1995. Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencias*. 47, 125-137.

Smulders F. J. M., P. Barendsen, J. G. van Logtestijn, D. A. A Moseel y G. M. van der Marel. 1986. Review: Lactic acid: considerations in favour of its acceptance as a meat descontaminant. *Journal Food Technology*. 21, 419-436.

Stanier et al 1966. En Merck Igoda. 1990. Indicaciones, control de calidad y conservación de medios de cultivo granulados. Cultivos especializados. División de diagnosticos, México.

Stiles E. Michael. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 70, 331-345.

Tseng y Montville, 1993 Metabolic regulation of end product distribution in Lactobacilli: causes and consequences. *Biotechnol. Prog.* 9, 113-121.

Zadjel, J. K. And W. T. Drobrzanski. 1983. Isolation and preliminary characterization of *Lactococcus cremoris* strain 202 bacteriocin. *Acta Microbiol. Pol.* 32, 119-12

Zdzislaww Esikorski. 1990. Tecnología de los productos del mar. Recursos, composición nutritiva y conservación. Editorial Acribia. 350 pp

X. ANEXO

ANEXO 1. Formulación de medios

Bacterias Lácticas

- Conservación a - 20 °C (Barrena-González, 1996a)

MEDIO DE LECHE	G/L
Leche descremada	100
Extracto de Levadura	5
Carbonato de Calcio	10
Glucosa	10
Ajustar el pH con NaOH 1 N	7

- Medios de crecimiento (Elliker, 1956)

MEDIO ELLIKER	G/L
Triptona	20
Extracto de levadura	5
Cloruro de Sodio	5
Acetato de Sodio	1.5
Ácido Ascórbico	0.5
Sacarosa	5
Lactosa	5
Glucosa	5
Agar	15
Ajustar el pH con NaOH 1 N	6.6

MRS (Atlas de Ronald, 1993)

MEDIO MRS	g/L
Peptona	10
Extracto de Carne	10
Extracto de Levadura	5
Glucosa	20
Fosfato de Potasio	2
Acetato de Sodio	5
Citrato de Amonio	2
Sulfato de Magnesio	0.2
Sulfato de Manganeso	0.2
Tween 80	1 ml
Ajustar el pH con NaOH 1 N	6.8

- Medios para la producción de bacteriocinas (Bhunia *et al*, 1988)

Medio CGB	g/L
Triptona	20
Glucosa	10
Extracto de Levadura	5
Citrato de Amonio	2
Fosfato de Sodio dibásico	2
Sulfato de Magnesio	0.1
Sulfato de Manganeso	0.05
Tween 80	1 ml
Ajustar pH con NaOH 1 N	7

Pseudomonas

- Medio selectivo para cuenta en placa (Stanier *et al*, 1966)

GSP	g/ L
Glutamato monosódico	10
Almidón	20
K ₂ HPO ₄	2
Sulfato de magnesio	0.5
5-rojo de fenol	0.36
Agar	15
Penicilina G sodica	100000 u

Se mezclan todos los componentes, aforar con agua destilada a un litro, se ajusta el pH con NaOH 3.5 % a pH 7.2, se esteriliza a 120 lb a 120 °C por 15 minutos. Se deja enfriar a 50 °C aproximadamente, se incorpora la penicilina.

Principio

Como base nutritiva se utiliza únicamente el glutamato y almidón que no pueden ser aprovechados por microorganismos acompañantes (Stanier *et al*, 1966). El almidón es degradado por *Aeromonas* con formación de ácido, pero no por *Pseudomonas*. Para mejorar la selectividad se añade penicilina al medio de cultivo como sustancia inhibidora selectiva.

Tiempo de incubación: hasta 3 días a temperatura ambiente (aprox. 25 °C).

Características de las colonias

	Crecimiento	Color
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bueno	rojo-violeta
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Bueno	amarillo
<i>E coli</i>	Nulo-ligero	-

- Medio de crecimiento

Tripticasa soya (DIFCO) (Atlas de Ronald, 1993)

TSB	G/lit
Bacto triptona (digerido pancreatico de caseina)	17
Bacto Soya (digerido de harina de soya)	3
Cloruro de sodio	2.5
Difosfato de potasio	5
Agar	15

Brochothrix thermosphaca

- Medio selectivo para cuenta en placa (Atlas de Ronald, 1993).

STAA	g/L
Peptona de carne	20
Peptona de levadura	2
Sulfato de magnesio	0.1
K ₂ HPO ₄	0.1
Agar	13
Glicerol	15 ml
Sulfato de estreptomina	1,000 ug

Quando este estéril aprox. a 50 °C de T°, se agrega la estreptomina

Principio

Medio de cultivo para el aislamiento de *B. thermosphacta* en carne. Las colonias son pequeñas, blancas cremosas. El sulfato de estreptomycin es un inhibidor selectivo antimicótico (Merck, 1990).

- Medio de crecimiento (Atlas de Ronald, 1993)

<i>B. thermosphacta</i>	g/L
Peptona de carne	20
Peptona de Levadura	2
Sulfato de magnesio	0.01
K ₂ HPO ₄	0.01
Agar	13
Glicerol	15 ml

Enterobacterias

- Cuenta para bacterias coliformes

Agar Bilis rojo neutro-cristal violeta (BRV de BIOXON) (Davis, 1951).

BRV	g/L
Extracto de Levadura	3
Peptona de gelatina	7
Mezcla de sales biliares	1.5
Lactosa	10
Cloruro de Sodio	5
Rojo neutro	0.03
Agar	15
pH final	7.4 ±0.2

Medio selectivo (48 g/L) para la demostración y numeración de bacterias coliformes inclusive *E coli* según Davis (1951).

Principio

El cristal violeta y las sales biliares inhiben el crecimiento sobre todo de la flora Gram positiva acompañante, la degradación de la lactosa a ácido se pone de manifiesto por el viraje a rojo indicador del pH rojo neutro por una precipitación de las sales biliares.

El tiempo de incubación 24 horas a 37 °C

Características de las colonias: Colonias rojas

Escherichia coli

- Medio de crecimiento (Atlas de Ronald, 1993).

LB	g/L
Extracto de Levadura	15
Triptona	10
NaCl	5
Agar	15
NaOH 1 N	1.0 ml
PH	7.0 ±0.2

ANEXO 2. Análisis Fisicoquímicos

- **Determinación del pH**

1. Pesar en condiciones asépticas 10 g de muestra
2. Añadir 100ml de agua destilada
3. Homogenizar en la licuadora durante un minuto
4. Estandarizar el pH en el potenciómetro con buffer de fosfato con pH 4 y 7
5. Filtrar la mezcla de pescado en manta de cielo para eliminar tejido conectivo.
6. Leer el pH del filtrado

- **Acidez Total Titulable (ATT)**

(expresada como porcentaje de ácido láctico)

1. Pesar 10 g de muestra de pescado
2. Añadir 200 ml de agua destilada
3. Homogenizar en la licuadora durante un minuto
4. Filtrar la muestra en manta de cielo. Colocar el filtrado en un matraz de 250 ml y aforar con agua destilada
5. Tomar 25 ml de solución y colocarla en un matraz Erlenmeyer de 150 ml. Añadir 75 ml de agua destilada
6. Se prepara un blanco usando 100ml de agua destilada.
7. Se informa como % de ácido láctico

Donde: % ácido láctico = $\frac{V(\text{NaOH}) \times N(\text{NaOH}) \times \text{meq}(\text{ac. lác}) \times f}{\text{peso de la muestra}} \times 100$

v= volumen

N= normalidad

f= factor de dilución

donde: f= $\frac{\text{ml aforado (250 ml)}}{\text{alícuota (25 ml)}}$

- Determinación de diaminas biogénicas según Hwang *et al* (1995).

1. Preparación de los estándares

Aminas	mg/mL
Triptamina hidrociorada	122.8
Putrescina dihidrociorada	182.9
Cadaverina dihidrociorada	171.4
Histamina tetrehidrociorada	165.7
Trimetilamina hidrociorada	126.7

Disolver cada estándar en 10 ml H₂O desionizada. La concentración final de cada amina en base libre es 10 mg/mL.

2. Derivatización

(En campana)

- a) 50 µl de cada estandar
- b) Adicionar 1ml de NaOH 2 M
- c) Adicionar 10 µl de cloruro de benzoilo
- d) Mezclar en vortex y dejar reposar por 20 min
- e) Parar la derivatización adicionando 2 ml de solución saturada de NaCl 5 M

- f) Extraer la amina con 3 ml de dietilether
- g) Transferir la fase orgánica (superior) a un tubo
- h) Evaporar a sequedad
- i) Disolver el residuo en 500 μ l de metanol
- j) Analizar alicuotas de 50 μ l

3. Preparación de la muestra y extracción de diaminas

- a) Moler la muestra, tomar 5g
- b) Homogenizar con 20 ml de ácido tricloroacético al 6% durante 3 min
- c) Centrifugar a 12,000 rpm, 10 min 4 °C
- d) Filtrar a través de papel Whatman No 2
- e) Transferir el filtrado a un matraz y aforar a 50 ml
- f) Derivatizar 2 ml del extracto con el procedimiento descrito anteriormente

4. Análisis por HPLC

Como se mencionó anteriormente se utilizó una fase reserva en un detector de 254 nm, con un gradiente de agua metanol con flujo 0.5 ml/min con el siguiente método

GRADIENTE

Duración	Metanol	Agua	Condición
Minutos	porcentaje	Porcentaje	
6	55	45	Isocrática
4	80	20	Gradiente lineal
10	80	20	Isocrática
4	55	45	Gradiente lineal

ANEXO 3. Preparación y almacenaje de membranas de diálisis

Soluciones	Concentración
NaHCO ₃	10 mM
Na ₂ EDTA	10 mM
Etanol	20-50%

1. Remover el tubo de membrana del rollo y cortar en tamaños necesarios (15-20 cm) con guantes para evitar contaminaciones por microorganismos
2. Hervir por varios minutos en solución NaHCO₃ 10 mM
3. Hervir por varios minutos en Na₂EDTA 10 mM. Repetir el proceso de hervir acelera el tratamiento
4. Lavar varias veces con agua destilada
5. Almacenar a 4 °C en etanol 20-50% para evitar el crecimiento de microorganismos celulolíticos.

• Uso de las membranas de diálisis

1. Se toma un tubo de membrana de diálisis del etanol y se enjuaga con agua destilada y se coloca una pinza a uno de los extremos.
2. Se lava la membrana con agua destilada, se toma el extremo sin pinza y se tapa, se oprime para verificar la presencia de agujeros o fugas.
3. Reemplazar el agua de la membrana con la solución a dializar y se coloca la otra pinza.
4. Sumergir el tubo de diálisis en un vaso de precipitado con 4 lt de tampón fosfatos 25 mM a pH 6 y dializar con agitación lenta a 4 °C.
5. Cambiar el buffer cada 6 h.
6. Remover el tubo del tampón y quitar el exceso del tampón en los extremos y sacar la muestra con una pipeta.